

Table des matières

Introduction	10
Chapitre 1 - La cowdriose	
1.1 Historique	13
1.2 Généralités sur la cowdriose	17
1.3 Epidémiologie	19
1.4 Diagnostic	23
1.5 Lutte	25
Chapitre 2 – Contexte général et problématique	
2.1 Présentation de la rickettsie <i>Ehrlichia ruminantium</i>	30
2.2 Présentation du vecteur <i>Amblyomma variegatum</i>	38
2.3 Les zones d'étude	41
2.4 Objectifs de l'étude et démarche scientifique	45
Chapitre 3 - Evaluation de l'importance des infestations par les tiques <i>Amblyomma variegatum</i> et de la diversité génétique de <i>E. ruminantium</i>	
3.1 Mise au point d'outils et analyse de la diversité génétique (Article 1)	54
3.2 Cas des trois îles des Caraïbes : Guadeloupe, Marie Galante et Antigua (Article 2)	65
3.3 Cas du Moyen Ouest Malgache : Région du Bongolava	73
Chapitre 4 – Etude de la Diversité génétique de <i>E. ruminantium</i> : apport de l'étude de plusieurs gènes <i>map</i>	
4.1 Des marqueurs polymorphes pour la caractérisation de la diversité (Article 3)	76
Chapitre 5 – Compréhension des mécanismes de transmissions hôte/vecteur des souches de <i>E. ruminantium</i> par une approche en conditions contrôlées : Application aux observations de terrain	
5.1 Mise au point d'outils moléculaires	89
5.2 Mécanismes de transmission de souches hôte/vecteur et typage de souches lors d'infections multiples	91
Chapitre 6 : Discussion générale, conclusions et perspectives	102
Références bibliographiques	110

Liste des abréviations

ADN / DNA	Acide désoxyribonucléique
ARC/OVI	Agricultural Research Council / Onderstepoort Veterinary Institute
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transport
BIOS	Systèmes biologiques
CAP	Caribbean Amblyomma Program
CaribVET	Caribbean animal health network
CDS	Coding DNA Sequence
CE	Corps élémentaires
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CIRDES	Centre International de Recherche Développement sur 'Élevage en zone subhumide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CRVOI	Centre de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes dans l'Océan Indien
dN	Taux de substitutions non synonymes dans les sites non synonymes
dS	Taux de substitutions synonymes dans les sites synonymes
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>ER</i>	<i>Ehrlichia ruminantium</i>
Erga	Génome complet de la souche Gardel
Erwe	Génome complet de la souche sud africaine Welgevonden
Erwo	Génome complet de la souche Welgevonden (cultivée sur cellules en Guadeloupe)
IBET	Instituto de Biologia Experimental e Tecnologica
IFI	Immunofluorescence Indirect
IFN γ	Interféron gamma
INRA	Institut National de Recherches Agronomiques
Kb	Kilobase
LT	Lymphocytes T
MAP1	Major Antigenic Protein 1
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multilocus VNTR Analysis
MSP1a	Membrane Surface Protein 1a
OMP	Outer Membrane Protein
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Réaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction of Fragments Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

Liste des figures

Figure 1 : Situation actuelle des infestations par <i>Amblyomma variegatum</i> et statut de la cowdriose dans les Petites Antilles (d'après Ahoussou et al, 2009).....	15
Figure 2 : Arbres phylogénétiques des séquences : <i>pCS20</i> (A) ; <i>groESL</i> (B) (d'après Allsopp et al, 2003).....	37
Figure 3 : Présentation schématique de la Famille multigénique <i>map</i>	47
Figure 4 : Les gènes marqueurs utilisés	51
Figure 5 : Présentation schématique du principe de la PCR nichée spécifique de souche	89

Liste des tableaux

Tableau 1 : Amorces, tailles d'amplicons et génotypes ciblés dans les PCR nichée <i>map1</i> classique et PCR nichée <i>map1</i> spécifique de souche.....	90
Tableau 2 : Cinétique des infections lors d'inoculations simultanées des souches Gardel et Lamba 479	93
Tableau 3 : Typage des souches dans les tiques gorgées sur chèvres infectées en simultanée (Expérience 1)	94
Tableau 4 : Typage des souches dans les tiques gorgées sur chèvres infectées en simultanée (Expérience 2)	94
Tableau 5 : Typage dans les tiques gorgées sur chèvres infectées (Expérience 2)	94
Tableau 6 : Détection des souches dans le sang des animaux immunisés avec Gardel et challengés avec la souche Sankat 430	95
Tableau 7 : Détection des souches dans le sang des animaux immunisés avec Gardel et challengés avec la souche Bekuy 255	95
Tableau 8 : Typage dans les tiques mises à gorger sur des chèvres vaccinées challengées avec la souche Sankat 430	96
Tableau 9 : Typage dans les organes des chèvres mortes en phase clinique	97
Tableau 10 : Proportion de tiques adultes infectées après infections successives à différents stades de développement	98

Introduction

Ehrlichia ruminantium (Dumler *et al.* 2001) auparavant dénommée *Cowdria ruminantium*, bactérie transmise par les tiques du genre *Amblyomma*, est l'agent pathogène responsable de la maladie appelée cowdriose ou heartwater qui affecte principalement les ruminants domestiques et sauvages. L'existence de la maladie est rapportée pour la première fois de manière officielle en Afrique du Sud en 1876 (Webb cité par Provost et Bezuidenhout, 1987) suite à des mortalités importantes chez des moutons et des chèvres ; mais elle avait déjà été décrite auparavant par Trichardt dans ses notes personnelles de 1838 (Neitz, 1968). L'essentiel des travaux de recherches sur la cowdriose a été effectué, de ce fait et jusque dans les années soixante principalement, en Afrique du Sud qui fut le premier pays en Afrique à élever une forte concentration de populations d'animaux sensibles provenant d'Europe. Les populations locales de ruminants, en particulier les bovins, paraissaient en revanche moins affectées par la cowdriose, conséquence probable d'une longue sélection naturelle d'animaux plus résistants (Uilenberg, 1996). Depuis, l'existence de la cowdriose a été confirmée par différents auteurs dans une quarantaine de pays d'Afrique, ainsi qu'à Madagascar et dans les Iles Mascareignes. Les Caraïbes avec trois îles affectées (Guadeloupe, Marie-Galante et Antigua) constituent la seule région hors continent africain où la maladie est présente.

Si beaucoup de connaissances ont été acquises concernant les aspects épidémiologiques ou cliniques en ce qui concerne la pathogénicité ou la symptomatologie, le diagnostic et les moyens de lutte restent encore à améliorer et nécessitent des recherches plus approfondies. La cowdriose, comme toutes les maladies transmises par les tiques, représente un obstacle aux programmes d'intensification de l'élevage basés sur l'utilisation de races animales génétiquement améliorées (races exotiques). Le manque de tests de diagnostic spécifiques et sensibles, notamment sérologiques, ou de vaccins efficaces et peu coûteux, rendent difficile la conduite d'élevage d'animaux plus productifs dans les pays où la majorité de la population vit encore sous le seuil de pauvreté. Les séquences complètes du génome des souches Gardel et Welgevonden isolées respectivement en Guadeloupe et en Afrique du Sud sont aujourd'hui disponibles, apportant des informations majeures contribuant à la mise au point de tests de diagnostic et de vaccins.

Les vaccins contenant une unique souche expérimentés jusqu'à maintenant (inactivés, atténués, recombinants) confèrent une très bonne protection contre la souche homologue, mais une protection beaucoup plus variable vis-à-vis des souches hétérologues (totale, partielle voire nulle). Cette variabilité de protection croisée révèle l'existence d'une grande diversité antigénique et génétique sur le terrain.

Notre étude se donne comme premier objectif la caractérisation génétique des souches d'*E. ruminantium*, en utilisant comme cibles privilégiés les gènes codant pour les protéines de sa membrane externe. Le but est :

- d'évaluer l'étendue de cette diversité génétique,
- de contribuer à la caractérisation des mécanismes de génération de cette diversité et de son évolution pour des objectifs finalisés de regroupement de souches en clusters de protection croisée permettant à terme d'optimiser les cocktails vaccinaux.

Le deuxième objectif est de contribuer à la compréhension des mécanismes de structuration des populations de souches in situ en étudiant expérimentalement les mécanismes de transmission d'une infection multiple de l'hôte au vecteur.

Chapitre 1 – La cowdriose

Rapport-Gratuit.com

Le terme de “ cowdriose ” désigne la maladie provoquée par *Ehrlichia ruminantium* (Dumler *et al.* 2001), appelée temporairement *Cowdria ruminantium* (Cowdry 1925). *Cowdria* est le nom de genre donné à la bactérie (Moshkovski, 1947) en l’honneur des travaux de EV Cowdry (Cowdry, 1925a, 1925b et 1926) qui l’avait isolée et déterminée comme étant une rickettsie ; il avait alors proposé le nom de *Rickettsia ruminantium*.

1.1. Historique

L’histoire globale de la cowdriose est liée à l’Afrique du Sud et fut très bien décrite (Provost et Bezuidenhout, 1987) lors du premier atelier qui a réuni tous les scientifiques concernés. L’historique relaté ici est celui des deux zones d’étude de notre thèse.

Dans les Iles Caraïbes

L’historique de la cowdriose aux Caraïbes, en particulier dans l’Archipel guadeloupéen, remonte aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles. Des introductions de bovins (zébus sahéliens et taurins N’Dama) originaires d’Afrique de l’Ouest sont alors effectuées dans les Antilles françaises à l’occasion du commerce d’esclaves existant entre l’Afrique et les Caraïbes (Maillard et Maillard, 1998).

La présence de la tique *Amblyomma variegatum* appelée encore « tique sénégalaise », vecteur de la bactérie *E. ruminantium* est signalée pour la première fois en Guadeloupe en 1830. La Guadeloupe, Marie Galante et Antigua seraient les premières îles à avoir été colonisées par *A. variegatum* (Morel, 1966). L’expansion de la tique vers les autres îles s’est faite quand le commerce du bétail s’est beaucoup développé dans la région ; la Martinique est ainsi infestée en 1948. Puis, entre 1967 et 1988, une rapide diffusion de la tique, attribuée à l’action disséminatrice des migrations d’oiseaux (particulièrement des hérons garde-bœuf, *Bubulcus ibis*, hôtes de stades immatures), est observée, conduisant à l’infestation de plusieurs dizaines d’îles des Caraïbes (Barré et al, 1995).

La race bovine Créole, résultat de croisements entre populations d’origines variées (européenne et africaine) introduites et sélectionnée localement (Naves, 2001), ne possédait pas un niveau de production qui permette de satisfaire les besoins dans des échanges commerciaux grandissants de la fin du 19^{ème} siècle. Dans le but d’améliorer la productivité du cheptel de bovins créoles, un recours croissant à des races améliorées

est alors constaté (Rouse, 1977), ce qui a eu pour conséquence d'augmenter la proportion d'animaux sensibles.

En 1932, longtemps après la découverte de la présence de la tique *A. variegatum*, des symptômes similaires à ceux de la cowdriose ont été décrits sur des bovins en Guadeloupe. La maladie est ensuite suspectée à plusieurs reprises (Courmes, 1961 ; Morel, 1966 ; Uilenberg et al, 1984 ; Camus et Barré, 1988). Finalement son existence est confirmée en 1980 en Guadeloupe mais également dans les Mascareignes, à La Réunion et à l'île Maurice (Perreau et al. 1980), puis à Marie Galante (Camus et al. 1984) et à Antigua (Birnie et al. 1985). Sa détection est probablement due à une perte de la stabilité endémique de la maladie parmi les populations animales existantes, due à une introduction de bovins sensibles, l'intervention des vétérinaires sachant la diagnostiquer ayant apporté les confirmations attendues. A la suite de la confirmation de l'existence de la cowdriose aux Antilles et du rôle de la tique *A. variegatum* dans l'aggravation des lésions cutanées dues à la dermatophilose, puis de la découverte du rôle vecteur potentiel de la tique américaine *A. maculatum*, des programmes d'éradication et de contrôle des tiques dans les îles françaises (Programme Poséïdom) et anglophones (CAP, Caribbean Amblyomma program) ont été initiés dans les années 1980 (Barré et al, 1996). La Guadeloupe, Marie Galante et Antigua sont actuellement les îles les plus infestées. Le statut de certaines îles anglaises déclarées indemnes a été modifié après observations de tiques sur ces îles. Depuis, les enquêtes menées dans le cadre du réseau de santé animale dans la Caraïbe, Caribbean animal health network (CaribVET) en collaboration avec le CAP (Caribbean Amblyomma program) a révélé des ré-infestations par la tique *A. variegatum* dans 7 autres îles et une situation "incertaine" avec quelques tiques observées de manière sporadique dans 2 autres (Figure 1).

Des souches ont été isolées en cultures à partir d'homogénats de tiques infectées, inoculées à des animaux sensibles. Lors de l'hyperthermie de ces animaux maintenus en conditions contrôlées, le sang a été prélevé et incubé sur des cellules endothéliales bovines de manière à isoler la souche d'*E. ruminantium*. Il s'agit pour la Guadeloupe de la souche Gardel, du nom de la localité où se trouve la ferme de l'Institut National de Recherches Agronomiques (INRA), dans la commune du Moule en Guadeloupe, isolée à partir d'homogénats de tiques adultes prélevés sur des bovins et inoculés à de veaux (Uilenberg et al, 1985), et Blonde isolée d'une chèvre inoculée avec un homogénat de nymphe *A. variegatum* (données non publiées de Dominique Martinez). Le stock

Antigua a été isolé d'une chèvre inoculée expérimentalement avec le surnageant de broyat d'un mélange de 100 tiques collectées dans différents troupeaux à l'île Antigua (Birnie et al, 1985). Il existe des souches qui n'ont pas été isolées en culture mais pour lesquelles l'ADN a été extrait d'organes d'animaux infectés ou de tiques infectées.

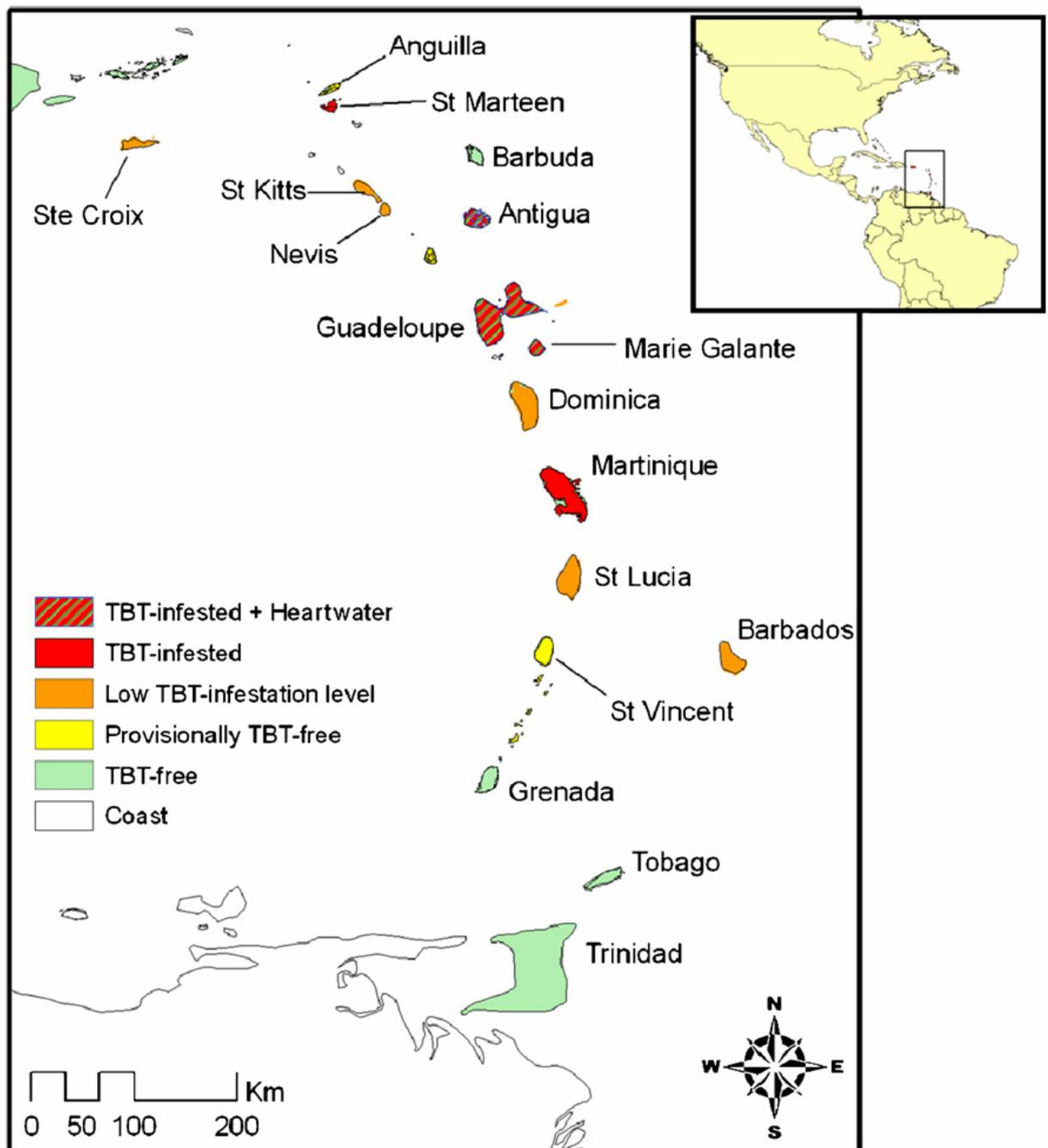


Figure 1. Situation actuelle des infestations par *Amblyomma variegatum* et statut de la cowdriose dans les Petites Antilles (d'après Ahoussou et al, 2010).

A Madagascar

Hypothèses sur la date d'introduction des zébus à Madagascar

Les premiers zébus à bosse auraient été domestiqués il y a 7000 à 8000 ans (Loftus et al, 1994 ; Bradley et al, 1996 ; Bradley & Magee, 2006) dans de centres de domestication situés dans l'actuel Pakistan. L'existence de routes de commerce maritimes aurait favorisé la dispersion de ces animaux à partir de ces centres. Les données de génétique moléculaire montrent que ces zébus auraient été introduits en Afrique grâce à un couloir maritime dans l'Océan Indien (Hanotte et al, 2002 ; Freeman et al, 2006). Les zébus malgaches sont probablement arrivés dans l'île lors d'une seconde grande vague de migration intervenue à partir de l'an 700 de notre ère suite à l'installation de colonies arabes le long de la côte Est africaine (Hanotte et al, 2002), une première vague étant supposée avoir eu lieu 2000 ans avant notre ère.

*Introduction des tiques *Amblyomma variegatum* et de la rickettsie *Ehrlichia ruminantium*.*

L'introduction du vecteur et du pathogène s'est probablement faite en même temps que celle de zébus infestés de tiques infectées d'une part, et porteurs asymptomatiques de l'agent pathogène d'autre part. On n'est pas certain de l'existence d'exportations d'animaux vers la côte Est de l'Afrique par le passé qui supporteraient l'hypothèse d'une introduction de la tique *Boophilus microplus* en Afrique à partir d'animaux importés de Madagascar. Par contre des exportations de bovins vers les autres îles voisines (Réunion, Maurice ?) ont été effectuées pendant la période de migrations de Malgaches partis pour travailler dans les champs de canne à sucre.

La présence de la tique *A. variegatum* à Madagascar a été signalée pour la première fois de manière formelle et écrite par Neumann en 1899 (Uilenberg et al, 1979). Toutes les introductions de bovins provenant de l'Afrique ont été répertoriées à partir de ce moment. Elles venaient essentiellement de l'Afrique du Sud, les animaux étant contrôlés rigoureusement aux frontières. L'infestation des animaux par *A. hebraeum* fut ainsi signalée mais sans installation de la tique (Uilenberg et al, 1979). Le rôle de la tique *A. variegatum* dans la transmission de la cowdriose semble avoir été évoqué pour la première fois par Durieux en 1930, puis Uilenberg l'a confirmé expérimentalement (Uilenberg, 1971).

L'existence de la cowdriose est soupçonnée en 1924 par Poisson et Geoffroy à la suite de pertes observées parmi les moutons à laine importés d'Afrique de Sud, puis confirmée par ces mêmes auteurs (Poisson et Geoffroy, 1925 ; Durieux, 1930 ; Rajaonarison, 1970). Deux souches Kianjasoa 1 et Kianjasoa 2 dont le deuxième est un stock, sont isolées (Ramisse et Uilenberg, 1970). La mise au point de la technique de conservation des rickettsies par la congélation a permis de mettre au point une technique d'immunisation des animaux sensibles par infection suivie de traitement, méthode toujours pratiquée de nos jours dans le Sud de l'Afrique (Ramisse et Uilenberg, 1970).

Actuellement, la tique *A. variegatum* est surtout distribuée dans le Moyen Ouest et le Moyen Est malgache et dans toute la région côtière. Sa présence sur la Côte Est a été confirmée récemment lors d'une enquête épidémiologique sur les maladies transmises par les tiques (Raliniaina et al, 2003) complétant ainsi les données sur la répartition géographique d'*A. variegatum* sur les côtes. Elle est rare sur les Hauts Plateaux où sa présence serait liée à une introduction saisonnière par des animaux infestés mais que les tiques ne s'installeraient pas à cause de la saison sèche et de températures trop rigoureuses à partir d'une altitude qui reste à déterminer.

La cowdriose sévit toujours dans les régions où la tique est présente selon les rapports des services vétérinaires. Les animaux les plus sensibles sont les bovins de races exotiques, les animaux issus de croisements de ces races avec le Zébu Malgache, et les petits ruminants.

Le détiquage, manuel ou chimique, permet de limiter les effets des infestations massives des tiques sur la productivité des animaux. Il n'est pas fait pour lutter directement contre la cowdriose et présente, avec des traitements acaricides menés plus ou moins correctement par les éleveurs eux-mêmes, le risque de sélectionner des souches de tiques résistantes, surtout chez la tique *Boophilus microplus* (qui n'est pas un vecteur de la cowdriose mais de l'anaplasmose et des babésioses). La méthode d'immunisation par infection - traitement, qui n'est pas sans danger pour les animaux, n'est plus pratiquée car le stock Kianjasoa 2 (K2) isolé à la Station de Recherche de Kianjasoa (Uilenberg, 1971a) et qui était utilisé à cette fin est maintenant perdu.

1.2. Généralités sur la maladie

La cowdriose ou heartwater est une maladie infectieuse, virulente, inoculable et non contagieuse quoiqu'elle soit classée en France parmi les Maladies Réputées Légalement

Contagieuses, depuis sa découverte en 1980 aux Antilles, à cause des risques d'extension non seulement à toute la région des Caraïbes mais aussi au continent américain. La maladie est due à la rickettsie *Ehrlichia ruminantium*, appartenant à l'Ordre des *Rickettsiales*, Famille des *Anaplasmataceae*.

La cowdriose est transmise par diverses espèces de tiques du genre *Amblyomma* et affecte principalement les ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins et buffles) et sauvages (bovidés). Ces animaux représentent également les réservoirs sources d'infections des tiques.

La maladie est cliniquement caractérisée par une augmentation brusque de la température avec forte fièvre suivie, dans les formes suraiguë et aiguë, de symptômes nerveux aboutissant souvent à la mort. Dans la forme subaiguë, le taux de guérison est assez élevé. Le tableau clinique peut être différent selon l'espèce et la race de l'animal et selon la souche d'*E. ruminantium*. Ainsi, les animaux les plus sensibles à la maladie sont-ils, par ordre décroissant, les chèvres, les moutons et les bovins, surtout ceux de races améliorées ou provenant de régions indemnes. A l'autopsie le tableau lésionnel se caractérise par la présence d'un épanchement séreux dans le péricarde, d'où le nom de "heartwater", et d'un autre dans la cavité thoracique.

La cowdriose est largement répandue en Afrique sub-saharienne. Elle existe également dans les îles autour de l'Afrique (Madagascar, Ile Maurice, La Réunion, Les Comores - dont Mayotte -, Zanzibar, Sao Tomé et Cap Vert) et dans plusieurs îles des Caraïbes (Guadeloupe, Marie Galante et Antigua). La distribution géographique de la cowdriose dans le monde se superpose à celle des tiques *Amblyomma* reconnues comme vecteurs.

La cowdriose, comme les autres maladies transmises par les tiques, représente un handicap sérieux pour les programmes d'amélioration génétique du bétail dans les pays où elle est endémique. La mortalité et la réduction de la productivité dans les élevages atteints sont autant de pertes économiques occasionnées par la maladie. Les stratégies de lutte actuelles contre la cowdriose consistent à traiter les animaux malades avec des antibiotiques (tétracyclines) si le diagnostic est établi rapidement, en un contrôle chimique des vecteurs par les acaricides et en la pratique de l'infection - traitement. Cependant les acaricides sont chers et des phénomènes de résistance des tiques peuvent également apparaître lors de traitements menés de manière intensive recommandés pour une lutte efficace contre la cowdriose en signalant toutefois qu'une seule nymphe ou tique adulte peut transmettre la maladie. Par ailleurs, l'infection - traitement présente des risques pour les animaux, la mort pouvant survenir si le traitement est appliqué trop

tardivement, et en fonction de la virulence de la souche utilisée (Ball 3) sur les différentes espèces et de la sensibilité individuelle des animaux, des cas fatals peuvent être observés.

Les recherches visant à développer des vaccins efficaces sont en cours. Il est désormais bien établi que *E. ruminantium* est un microorganisme présentant une diversité génétique et antigénique forte, le niveau de protection conféré par une souche vis-à-vis d'une autre variant entre la protection totale et l'absence de protection. Pour être mené à bien, le développement de vaccins nécessite par conséquent des connaissances plus approfondies sur l'agent pathogène.

1.3. Epidémiologie

Spectre d'hôtes

Les ruminants domestiques (van de Pypekamp et Prozesky, 1987) et sauvages (Mebus et Logan, 1988 ; Peter et al, 2002) souvent atteints de formes cliniques fatales, ont été pendant longtemps considérés comme les hôtes préférentiels d'*E. ruminantium* d'où probablement son nom d'espèce. La mise en évidence du fait que des animaux non ruminants peuvent être naturellement ou expérimentalement réceptifs et sensibles (Oberem et Bezuidenhout, 1987) mais généralement sous des formes subcliniques, a changé ce concept. Cependant, Peter et al ont révisé en 2002 la liste de ces animaux et l'ont limitée à deux rongeurs sauvages, les autres animaux testés (pintade, tortues léopards) s'étant révélés réfractaires expérimentalement (Peter et al, 2001), ainsi que la mangouste (Camus et al, 1996). Des tests moléculaires ont montré que l'infection de carnivores tels que les chiens (Allsopp et Allsopp, 2001), de rongeurs (Peter et al, 2002), de reptiles comme les tortues léopards et les vipères (Kiel et al, 2006) ne seraient pas due à *E. ruminantium* mais à des espèces proches. L'extension de ce spectre d'hôtes à l'homme avec des cas fatals en Afrique du Sud (Allsopp et al, 2005) serait plutôt préoccupante. Cependant, il a été établi récemment que la PCR pCS20 utilisée dans ces études présente des réactions croisées avec *E. chaffensis* et *E. canis* (Steyn et al, 2008), ce qui amène à reconsidérer ces résultats.

Pouvoir pathogène d'*E. ruminantium*

Pour une même espèce, les formes cliniques de la cowdriose varient selon les souches d'*E. ruminantium* en cause. Les diverses souches n'infectent pas non plus les différents hôtes de la même manière. Ainsi le stock Kumm, hautement pathogène pour la chèvre

et la souris, ne provoque-t-il pas de maladie chez les bovins (Du Plessis et Kümm, 1976 ; Bezuidenhout et al, 1994). Ces différences de virulence et de pathogénicité sont à relier à l'hétérogénéité génétique au sein de l'espèce. Cependant, la connaissance du génotype ne permet pas actuellement de prédire la pathogénicité.

Les manifestations pathogéniques sont également différentes en fonction des espèces et des races des animaux affectés. Ainsi, les ruminants domestiques autochtones apparaissent-ils beaucoup plus résistants que ceux importés et *Bos indicus* est beaucoup moins sensible que *Bos taurus* (van der Merwe, 1979).

Concernant les petits ruminants, des chèvres natives de Guadeloupe, éloignées depuis plusieurs années de leur région d'origine où la cowdriose est endémique, restent peu sensibles. Elles semblent donc avoir acquis une certaine forme de résistance, probablement associée à un gène récessif lié au sexe, par une sélection naturelle de gènes de résistance (Matheron et al, 1987).

Modes de transmission

Deux modes de transmission sont actuellement admis pour *E. ruminantium* : la transmission vectorielle et la transmission verticale de la mère au nouveau-né. Les tiques du genre *Amblyomma* sont les vecteurs exclusifs qui transmettent la cowdriose. Cinq vecteurs naturels sont identifiés (Walker et Olwage, 1987 ; Walker et al, 2003), à savoir :

- 1) *A. variegatum*, espèce la plus répandue géographiquement en Afrique et la seule qui se soit installée dans les îles proches, au Yémen et dans trois îles des Caraïbes ;
- 2) *A. hebraeum*, le vecteur majeur dans le sud du continent africain (l'Afrique du Sud et quatre pays limitrophes) ;
- 3) *A. lepidum* en Afrique de l'Est et au Soudan ;
- 4) *A. astrion*, essentiellement sur les buffles ;
- 5) *A. pomposum*, limitée à l'Angola et au sud-ouest de la République Démocratique du Congo.

La capacité vectorielle de cinq autres tiques *Amblyomma* d'Afrique (Walker et Olwage, 1987) ainsi que de deux tiques nord-américaines, *A. maculatum* et *A. cajennense* (Uilenberg, 1982), a été démontrée expérimentalement. Les adultes d'une de ces tiques, *A. marmoreum* infestent essentiellement les tortues. Or, *A. hebraeum*, le principal vecteur de la cowdriose en Afrique du Sud, peut également infester les tortues. Cela pose la question du rôle potentiel des reptiles dans l'épidémiologie de la cowdriose,

d'autant que les stades immatures d'*A. marmoreum* parasitent occasionnellement les ruminants où ils pourraient s'infecter (Uilenberg, 1996). La distribution géographique de la cowdriose semble donc correspondre à celles des 10 espèces de tiques *Amblyomma* reconnues comme ayant la capacité de transmettre *E. ruminantium*. Malgré l'existence d'espèces d'*Amblyomma* en Asie et des deux espèces américaines capables de transmettre expérimentalement la cowdriose (Uilenberg, G, 1982), la maladie n'a jamais été signalée dans ces deux continents. Récemment, *E. ruminantium* a été détectée dans les tiques *A. sparsum* retrouvées sur des tortues importées en Floride, sans que la présence de la maladie ne soit confirmée par l'isolement en cultures de la rickettsie (Burridge et al, 2000).

Les différents stades, larves, nymphes et adultes, de la tique infestent trois hôtes différents et, selon l'espèce et l'environnement climatique, son cycle biologique peut ne durer que 5 mois mais peut aussi aller jusqu'à trois ans (cas d'*A. hebraeum* en Afrique du Sud). Dans ce cycle trixène, elle peut s'infecter en tant que larve ou nymphe et transmettre la maladie en tant que nymphe ou adulte. Les tiques, ayant plusieurs hôtes, peuvent s'infecter sur diverses sources : sur des animaux malades pendant la phase clinique (Lounsbury, 1900 ; Bezuidenhout, 1987), sur des animaux guéris et porteurs asymptomatiques (Andrew et Norval, 1989 ; Camus, 1992 ; Burridge, 2002) présentant des rickettsiémies par intermittence (les facteurs qui influencent cette re-circulation ne sont pas connus), ou sur des hôtes infectés latents que représente la faune sauvage, ruminants ou non. La transmission étant trans-stadiale et la transmission trans-ovarienne décrite lors d'une expérience avec *A. hebraeum* n'ayant jamais pu être reproduite, la tique elle-même constitue un des réservoirs d'*E. ruminantium* pendant un temps assez long.

La transmission verticale de la mère au nouveau-né, *in utero* ou par voie colostrale, a été pendant longtemps soupçonnée. Les études réalisées sur des veaux (Deem et al, 1996) et sur des agneaux et chevreaux (Faburay et al, 2007b) dans le but d'apporter des explications à l'état réfractaire ou à la tolérance à la cowdriose existant chez certains jeunes animaux indépendamment de l'état immunitaire de la mère, ont permis de constater l'existence d'une infection précoce dans les tout premiers jours après la naissance. Cette " prémunition " semble résulter d'une transmission par la mère puisque

les premières infestations de tiques ne sont observées que quelques semaines après la naissance.

Stabilité endémique

Pour les maladies transmises par les tiques, la stabilité endémique ou enzootique se définit comme l'acquisition de relations stables entre l'hôte, l'agent pathogène, le vecteur et l'environnement, leur coexistence aboutissant à des taux de morbidité et de mortalité faibles (économiquement acceptables) au sein de la population d'hôtes. Trois conditions sont nécessaires à l'installation d'une stabilité endémique : 1) un taux d'infection élevé du vecteur, 2) un grand nombre d'animaux sources d'infection pour les vecteurs, 3) une infection d'hôtes à un moment où ils sont peu sensibles et ne font pas de formes cliniques graves (Deem et al, 1996). Il a été démontré que les animaux malades en phase clinique et les porteurs asymptomatiques constituent des réservoirs de la rickettsie et sont sources d'infection pour les tiques, par conséquent ils ont un rôle important dans la mise en place et le maintien d'une stabilité endémique.

La cowdriose existe dans cette situation d'enzootie stable dans beaucoup de pays de la région subsaharienne d'Afrique (Norval et al, 1992). Lorsque la situation est instable, la maladie peut se présenter sous forme de cas sporadiques mais peut aussi prendre une allure d'épizootie, et ce en différentes circonstances :

Dans une région avec une stabilité endémique :

1. Lors d'une introduction d'animaux sensibles subissant des taux de mortalités très élevés. Ce sont les cas rencontrés dans les mentions historiques de la maladie, en Afrique du Sud, à Madagascar (Poisson et Geoffroy, 1925), en Guadeloupe. De même, quand les animaux d'une région indemne en Afrique (Guey, 1982) ou d'une région où la cowdriose est endémique (Bekker et al, 2001) sont déplacés vers une autre région infectée.
2. Lorsque des animaux immunisés naturellement redeviennent sensibles à la suite d'une dépression immunitaire due à des maladies intercurrentes ou liée à l'âge ou à un état physiologique comme la gestation, particulièrement chez les bovins taurins (Van der Merwe, 1979).

Dans une région avec une endémie instable :

1. Les taux d'infection des tiques infestant les animaux sont trop bas pour que l'acquisition d'une bonne protection pendant la période où les anticorps maternels sont encore présents puisse se faire. Des cas de bovins non infectés à l'âge de deux ans donc

encore sensibles alors qu'ils sont infestés massivement, ont été observés à Madagascar (Uilenberg, 1971).

2. Les niveaux d'infestation sont trop faibles pour que les animaux acquièrent une immunité protectrice pendant la période de faible sensibilité. C'est le cas des petits ruminants, peu infestés par les tiques adultes, au Sénégal, au Burkina Faso mais aussi sans doute à Madagascar.

Dans une région indemne de cowdriose :

Pour le cas particulier du continent américain, les risques proviendraient :

1. De l'introduction d'animaux en phase d'incubation ou porteurs asymptomatiques. La capacité vectorielle d'*A. maculatum*, qui est aussi bon vecteur qu'*A. variegatum*, et à de moindres degrés, de *A. cajennense* et *A. dissimile*, ayant été vérifiée expérimentalement, la maladie pourrait devenir endémique (Uilenberg, 1982 ; Barré et al, 1987 ; Jongejan, 1992 ; Mahan et al., 2000),

2. De l'introduction de tiques infectées par des ruminants ou des animaux réceptifs tels que les tortues (qui peuvent d'autre part être infectées et rester porteurs et infectantes pour d'autres tiques (Burrige et al, 2000)) ou par des animaux comme le héron garde-bœufs qui transporte les formes immatures de la tique (Corn et al, 1993).

1.4. Diagnostic

La cowdriose pose, dans ses formes sévères présentant une évolution rapide vers la mort, un sérieux problème de manque de tests efficaces, rapides et en même temps accessibles aux petits laboratoires et aux éleveurs et qui permettrait de diagnostiquer avec certitude la maladie. Néanmoins, l'ensemble de ce qui existe actuellement devrait donner de bonnes orientations de diagnostic.

Dans une région où la cowdriose est endémique, la suspicion est de règle lors de mortalités brusques sur des animaux infestés par des tiques *Amblyomma* ou lorsqu'ils présentent des signes nerveux au cours ou à la suite desquels ils meurent.

Le diagnostic clinique n'est pas aisé car les symptômes ne sont pas toujours évocateurs et sont souvent confondus avec ceux d'autres maladies. C'est à l'autopsie (liquide d'épanchement dans le péricarde et dans la cage thoracique) et surtout après un examen microscopique post mortem d'étalement de cerveau pour la mise en évidence de corps élémentaires d'*E. ruminantium* et de morula dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Cowdry, 1926 ; Purchase, 1945) qu'une certitude peut être acquise.

L'examen d'un prélèvement biopsique de cerveau (Synge, 1978) donne de tout aussi bons résultats mais il est pratiquement refusé par les éleveurs. Une méthode de diagnostic qui consiste à inoculer du sang de l'animal suspect à un animal sensible, généralement un petit ruminant ou parfois une souris pour certaines souches, pour reproduire la maladie et mettre en évidence la présence d'*E. ruminantium*, a également été pratiquée. Ces méthodes ont l'inconvénient de manquer de sensibilité (étalement de cerveau) ou d'être onéreuses (inoculation à des animaux sensibles).

La biologie moléculaire, et plus particulièrement la détection de la rickettsie par hybridation avec des sondes d'acides nucléiques radioactifs et l'amplification en chaînes par l'enzyme polymérase ou PCR, Polymerase Chain Réaction, a donné naissance à des tests plus spécifiques et surtout plus sensibles. Une sonde radioactive d'ADN, la sonde *pCS20* (région du génome d'*E. ruminantium*), semble très spécifique de la rickettsie et capable de détecter toutes les souches. Elle est par contre moins sensible que la PCR et présente les inconvénients liés à la manipulation d'éléments radioactifs qui devait être réalisée dans des laboratoires spécialisés. Deux PCR ont été développées, la *pCS20* qui amplifie un fragment de 279 à 290 pb de la région génomique évoqué plus haut et la *map1* pour le gène polymorphe du même nom codant pour une protéine de la membrane externe de la rickettsie. Elles sont utilisables aussi bien en diagnostic que pour des études épidémiologiques (Peter et al, 1999). En épidémiologie moléculaire, la PCR *pCS20* est utilisée pour la détection de tiques infectées (Peter, 1995 ; Peter, 2000) ou pour l'identification de porteurs asymptomatiques (Burrige et al, 2002), tandis que la PCR *map1* couplée à une étude du polymorphisme de longueurs de fragments de restriction ou RFLP (Restriction of Fragments Length Polymorphism) ou de la séquence nucléotidique des produits d'amplification permet de déterminer le génotype des souches. Toutefois, la sensibilité et la spécificité de la PCR *map1*, sont moins fortes que celles du test *pCS20* (Faburay et al, 2007b). Ces techniques tout en étant plus sensibles et moins onéreuses qu'une inoculation à des animaux sensibles, nécessitent néanmoins des équipements de laboratoires de biologie moléculaire encore peu nombreux en Afrique. Dernièrement, des gènes tronqués et délétés, identifiés en comparant les génomes complets de deux isolats de phénotypes différents, se sont révélés d'une grande efficacité pour le diagnostic PCR spécifique de souches (Vachiéry et al, 2008).

Quant au diagnostic sérologique, les tests d'Immunofluorescence Indirect (IFI), d'ELISA Indirect et de Western Blot utilisant la rickettsie *E. ruminantium* en entier

comme antigène, ont révélé des problèmes de spécificité par l'existence de réactions croisées avec d'autres espèces d'*Ehrlichia* donc de déterminants antigéniques communs entre elles (Logan et al, 1986 ; Holland et al, 1987 ; Du Plessis et al, 1987 ; Jongejan et al, 1989 ; Martinez et al, 1990). De plus, ces réactions croisées ont été démontées même en utilisant différents stocks de *Cowdria*, Kwanyanga, Kumm, Gardel et Mali (Mackenzie, 1981 ; Du Plessis, 1982 ; Uilenberg, 1985) comme antigènes. Cette communauté antigénique avec *Ehrlichia spp* limite par conséquent l'usage de ces tests en épidémiologie et en diagnostic. Néanmoins l'utilisation de la protéine immunodominante mais non protectrice Major Antigenic Protein1 (MAP1), plus précisément la région MAP1-B de la protéine, pour l'ELISA Indirect, comme antigène, a amélioré la spécificité et la sensibilité par rapport aux tests précédents. Cependant, des réactions croisées avec *E. chaffensis*, agent de l'ehrlichiose monocytique de l'homme et *E. canis* pour l'ehrlichiose canine, existent encore bien qu'elles soient moins importantes (van Vliet et al, 1996 ; Kakono et al, 2003). MAP1 est la protéine immunodominante de la membrane externe d'*E. ruminantium* codée par le gène *map1*. Les résultats sérologiques des tests ELISA MAP1-B Indirect et de l'ELISA MAP1 Compétitive reflètent alors beaucoup plus les prévalences sur les terrains (Katz et al, 1997 ; Mbengue et al, 2007 ; Faburay et al, 2007c). Cependant, une sensibilité moindre de l'ELISA MAP1-B Indirect a été observée en détectant une faible prévalence d'anticorps chez les bovins probablement due à une brièveté de la circulation d'anticorps dans le sang. La non détection d'anticorps peut être interprétée à tort comme une absence d'immunité d'autant plus qu'une réinfection n'est pas systématiquement accompagnée d'une re-circulation d'anticorps (Bell-Sakyi et al, 2003 ; Martinez, 2003). Les résultats de l'ELISA Indirect MAP1 ne donneraient donc pas une indication correcte sur le passé des bovins infectés naturellement (Peter et al, 2001). En tout cas, le développement futur de tests sérologiques spécifiques et sensibles pour la cowdriose est une nécessité.

1.5. Lutte contre la maladie

Sensibilité aux antimicrobiens

La sensibilité d'*E. ruminantium* aux antibiotiques, groupe des tétracyclines, et aux sulfamides, a rendu le traitement de la cowdriose accessible aux éleveurs. Néanmoins son efficacité dépend du moment où il est effectué, de la dose administrée et de la formulation recommandée (Van Amstel et Oberem, 1987). Une antibiothérapie est ainsi

actuellement préconisée avant l'apparition des signes nerveux fatals pour l'animal d'où la nécessité d'un diagnostic précoce. Le produit doit alors être inoculé en formulation longue action et en injection intraveineuse pour une rapide et longue disponibilité de la molécule. Un diagnostic confirmé de la cowdriose devrait être suivi d'une surveillance de tout le troupeau et d'un traitement de ceux qui sont en accès fébrile. Le traitement aux antibiotiques n'empêche pas l'installation de l'immunité (Barré et Camus, 1987). Les tétracyclines sont également utilisées en prophylaxie médicale pour protéger les animaux introduits en zones d'endémie des formes cliniques graves tout en leur permettant l'acquisition d'une immunité active par une infection naturelle.

Contrôle et éradication des tiques

Un détiqage intensif des animaux créant une instabilité endémique, l'essentiel de la lutte contre les tiques *Amblyomma* consiste à réduire les niveaux d'infestation pour limiter les pertes directes économiquement considérables comme l'action spoliatrice, les dégâts sur les mamelles ainsi que les infections bactériennes ou infestations larvaires des mouches sur les points de fixation. Compte tenu du fait qu'une seule tique infectée est capable de transmettre la maladie, que les traitements acaricides sont onéreux et que les risques de développement de souches résistantes chez la tique sont à craindre, il apparaît qu'une prévention de la cowdriose par la lutte contre les tiques est particulièrement difficile à mettre en œuvre en Afrique, d'autant que les installations comme les bains détiqeurs reviennent chers (construction et fonctionnement). Des méthodes alternatives tendant vers l'utilisation d'acaricides en quantité réduite ou à longue rémanence sont aujourd'hui proposées tels que les boucles ou colliers imprégnés de phéromones et d'acaricides (Allan et al, 1996 ; Allan et al, 1998) ou des bains acaricides des pieds uniquement (Stachurski et Lancelot, 2006). Mais ils ne visent pas à lutter contre la cowdriose.

L'éradication de la tique *A. variegatum* dans plusieurs îles des Caraïbes a été tentée grâce au Caribbean Amblyomma Program (CAP) initié dans les années 80 et mis en œuvre à partir de 1994. Malgré plusieurs années de campagne, la tique est toujours présente dans plusieurs îles infectées. Pour la Guadeloupe, le rôle d'hôtes alternatifs des stades immatures que pourrait avoir la mangouste pendant les campagnes d'éradication, a été évoqué (Corn et al, 1994). Ceci souligne l'importance de la faune sauvage dans l'épidémiologie de la cowdriose.

Immunsation

Dans une région de stabilité enzootique de la cowdriose, la première infection, sous une forme clinique inapparente ou bénigne, confère une protection d'une durée variable. Cette protection est renforcée par la suite grâce à des infections répétées dues à un contact permanent avec des tiques infectées, et persiste tant que ce contact est maintenu. L'introduction d'animaux sensibles de races exotiques européennes dans ces zones nécessite une immunsation préalable. C'est pour ces cas que la méthode d'infection - traitement, consistant en une injection de sang de mouton infecté avec le stock Ball3 suivi d'un traitement aux antibiotiques au début de la phase d'hyperthermie, a été mise au point en Afrique du Sud (Neitz et Alexander, 1941). Cette méthode est aujourd'hui la seule utilisée pour immunsier les animaux. Elle bénéficie d'améliorations telles que la lyophilisation du vaccin (Du Plessis et al, 1990) et la production d'antigènes après adaptation sur cultures cellulaires (Brett, 1993 cité par Uilenberg, 1996). L'infection - traitement n'ayant pas procuré de bonnes protections contre les souches virulentes sur le terrain, la recherche de vaccins, atténués, inactivés, recombinants, a été alors entreprise.

Le premier type de vaccins a vu le jour suite à l'obtention de stocks moins virulents après plusieurs passages sur cultures de cellules endothéliales bovines pour les stocks Sénégal et Gardel, et sur cultures de macrophages canins pour Welgevonden. La vaccination avec le stock Sénégal atténué protège totalement des moutons contre l'épreuve virulente homologue et à des degrés divers contre les stocks hétérologues : partiellement contre 3 stocks de l'Afrique de l'Est, Gardel (Guadeloupe) et Ball 3 (Afrique du Sud), et pas de protection contre Welgevonden également de l'Afrique du Sud (Jongejan et al, 1993). Une protection croisée avec la plupart des isolats d'Afrique du Sud est observée (Du Plessis et al, 1989 ; Zweygarth et al, 2005) en conditions expérimentales en utilisant le vaccin Welgevonden atténué. De plus, les tiques *A. hebraeum* s'infectent par ce stock vaccinal et le transmettent à des animaux naïfs qui sont eux-mêmes protégés par la suite. La question sur la possibilité de vaccination par l'intermédiaire des tiques et la substitution de la souche virulente dans le milieu naturel s'est alors posée. Malgré leur efficacité démontrée par les auteurs, les risques de regain de virulence conduisant à l'introduction de nouvelles souches dans les pays qui

utiliseraient ces vaccins et les contaminations microbiennes provenant des cultures cellulaires nécessitent des investigations plus poussées (Shkap et al, 2007)

Le deuxième type de vaccins est basé sur les stocks inactivés, Crystal Spring et Mbizi (Mahan et al, 1998), et Gardel (Martinez et al, 1994 et 1996 ; Martinez, 1997). Les mêmes observations sur les niveaux de protection croisée, totale pour le stock virulent homologue et variés pour les autres stocks sont notées. Néanmoins, la souche Mbizi semble donner de meilleures protections contre les souches du Zimbabwe. Le plus important est que les essais *in vivo* avec le vaccin Gardel inactivé, menés au Burkina Faso, ont révélé l'existence d'une grande diversité génétique d'*E. ruminantium* et dans zones assez restreintes, 7 à 11 génotypes *map1* étant identifiés selon les villages. Les taux de protection différents constatés entre le vaccin Gardel inactivé et le vaccin Sénégal atténué lors d'essais de vaccination en Gambie (Faburay et al, 2007) seraient plutôt due à une divergence génétique de ces souches par rapport aux souches de terrain qu'à une différence de type des vaccins utilisés.

Tous ces vaccins, qui sont "mono – souches", protègent contre la souche homologue mais restent limités contre les souches hétérologues révélant ainsi une diversité génétique inattendue sur le terrain. L'étude de cette diversité, un important facteur à considérer avant tout développement de vaccins contre la cowdriose, constitue l'objet principal de notre thèse.

Chapitre 2 – Contexte général et problématique

2.1 Présentation de la Rickettsie *Ehrlichia ruminantium*

Taxonomie

L'Ordre des *Rickettsiales* inclue deux Familles, les *Anaplasmataceae* et les *Rickettsiaceae*, qui regroupent des bactéries pathogènes intracellulaires obligatoires. Dans leur cycle biologique, interviennent des hôtes vertébrés et des vecteurs invertébrés. Les *Anaplasmataceae* se distinguent par l'existence d'une membrane vacuolaire renfermant les colonies bactériennes alors que les *Rickettsiaceae* sont libres dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Ehrlichia ruminantium a été intégrée dans la Famille des *Anaplasmataceae* sur la base de l'analyse phylogénétique du gène conservé de l'ARN ribosomal 16S qui présente une homologie de séquences de plus de 97,7 % avec ceux des espèces *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*, et *Ehrlichia muris* (Dumler et al, 2001). L'existence de cette homologie avait été auparavant soupçonnée suite à l'observation de réactions croisées entre ces différentes espèces lors des tests sérologiques développés pour la détection d'anticorps dirigés contre *E. ruminantium*.

Aspects morphologiques et cellules cibles

E. ruminantium est une bactérie de 0,2 à 2,7 µm possédant une paroi membranaire de coloration Gram négatif. C'est un organisme intracellulaire obligatoire se présentant au microscope électronique sous deux formes morphologiques distinctes : les corps élémentaires (CE) ou corps initiaux (forme infectante de petite taille et d'aspect très dense) et les corps réticulés (large forme pléomorphe, avec des filaments nucléiques dispersés). La réplication se fait par scission binaire. Les CE pénètrent dans les cellules par un processus ressemblant à la phagocytose. Dans le cytoplasme de la cellule infectée, les bactéries forment une colonie entourée d'une vacuole appelée *morula*. L'augmentation de taille de la *morula* provoque la lyse de la cellule avec libération de corps élémentaires qui vont infecter d'autres cellules.

Chez la tique vectrice *Amblyomma*, l'infection est acquise après ingestion de sang infecté. La bactérie se multiplie d'abord dans les cellules épithéliales de l'intestin. Après le transport par l'hémolymphe (Du Plessis, 1985), *E. ruminantium* est retrouvée dans les acini des glandes salivaires.

L'hôte vertébré s'infecte lors du repas sanguin par l'intermédiaire de la salive d'une tique porteuse de la bactérie. Celle-ci est le plus fréquemment présente dans la matière grise superficielle du cerveau, les reins, la rate, les ganglions lymphatiques (surtout mésentériques) et les poumons. Elle se multiplie dans les cellules endothéliales, dans les polynucléaires neutrophiles, dans les cellules du système réticulo-endothéliale (phagocytaire mononucléé), dans les macrophages et les monocytes. *E. ruminantium* semble être la seule espèce membre de la Famille des *Anaplasmataceae* à parasiter les neutrophiles et les cellules endothéliales de l'hôte vertébré (Logan et al, 1987, Hotopp et al, 2006).

Immunité contre *E. ruminantium*

La cowdriose provoque de forts taux de mortalité quand des ruminants domestiques sensibles sont introduits dans une zone où la maladie est endémiquement stable (c'est à dire où on observe un taux élevé d'infection de tiques, un grand nombre de sources d'infection pour les tiques et de rares formes cliniques sévères). Les animaux qui survivent possèdent une protection forte. Il a été montré que les anticorps circulants n'ont pas de rôle majeur dans l'immunité : une injection de sérum immun à un animal infecté n'a pas d'effets sur l'évolution de la maladie (Neitz, 1939). Néanmoins, le rôle neutralisant de ces mêmes anticorps a été démontré par la diminution de l'infectiosité d'*E. ruminantium* cultivée sur cellules endothéliales (Byron et al, 1993). L'immunité à médiation cellulaire faisant intervenir des lymphocytes T (LT) a été par la suite démontrée contre les souches homologues (Totté et al, 1997). Les essais d'immunisation de chèvres par le vaccin Gardel inactivé ont d'autre part montré que les lymphocytes T CD8⁺ contribuent en synergie avec les CD4⁺ à la production de cytokines, notamment d'interféron gamma (IFN- γ) chez la plupart des animaux vaccinés, et que cette réponse est liée à une protection (Totté et al, 1997, van Kleef et al, 2002 ; Esteves et al, 2004). L'IFN- γ , médiateur important dans l'immunité à médiation cellulaire contre les pathogènes intracellulaires en général et contre *E. ruminantium* en particulier, inhibe fortement leur multiplication dans les cellules endothéliales (Mahan et al, 1996 ; Totté et al, 1996). Cependant, la sécrétion d'IFN- γ dans le sang de chèvres immunisées par le vaccin inactivé Gardel après stimulation des LT *in vitro* n'est pas un bon indicateur de l'acquisition d'une protection (Vachiéry et al, 2006) contrairement à ce qui a été observé dans une expérience préliminaire faite sur quelques animaux (Esteves et al, 2002). Par ailleurs, les granulocytes neutrophiles de chèvres, cellules

cibles d'*E. ruminantium* comme le sont également les cellules endothéliales, en exprimant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de Classe I et II semblent avoir un rôle potentiel de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux lymphocytes (Vachiéry et al, 1999). Mais les techniques d'isolement, les cultures in vitro et le traitement par l'IFN- γ peuvent les moduler, aboutissant à différentes expressions selon les molécules du CMH sur les neutrophiles. Le rôle des neutrophiles en tant que CPA dans les réponses immunitaires par phagocytose et par de libération de molécules cytotoxiques a pourtant été bien établi. De plus, à part son action inhibitrice sur *E. ruminantium* infectant des cellules endothéliales, la cytokine IFN- γ peut induire l'expression des molécules du CMH de Classe II à la surface des cellules endothéliales bovines (Totté et al, 1996). Néanmoins, une réduction de l'expression des molécules de CMH est observée à la surface des cellules endothéliales infectées limitant ainsi un éventuel rôle de CPA de ces cellules (Vachiéry et al, 1998) et par conséquent ce processus pourrait même représenter une forme d'évasion de la bactérie au système immunitaire de l'hôte (Totté et al, 1996 ; Vachiéry et al, 1998b).

Structure génomique et caractéristiques

Le génome d'*E. ruminantium* se présente sous la forme d'un chromosome unique et circulaire. Il est de petite taille, comme chez tous les organismes intracellulaires de l'Ordre des Rickettsiales. Néanmoins de tous les génomes complets actuellement disponibles, celui d'*E. ruminantium* est le plus grand (Hotopp et al, 2006). L'évolution des bactéries libres du groupe α -Protéobacteries vers des organismes adaptés à une vie intracellulaire a dû s'accompagner d'une perte massive de gènes, de l'apparition de pseudogènes (séquence d'ADN ressemblant à un gène ou provenant d'un gène mais ne possédant pas ou plus de fonction codante) et de la réduction de la taille du génome (Moran et Plague, 2001). Elles sont par conséquent dépendantes de leur hôte pour leurs fonctions métaboliques essentielles (Anderson et Kurland, 1998). Les génomes complets actuellement disponibles sont ceux de la souche Gardel (Erga), Welgevonden-CIRAD (Erwo) et Welgevonden-ARC/OVI (Erwe) et leurs tailles sont respectivement de 1499,9 Kb, 1512,9 Kb et 1516,3 Kb (Frutos et al. 2006 ; Collins et al, 2005). L'ordre des gènes est fortement conservé dans les trois génomes malgré leur différence de taille ; une bonne colinéarité, avec cependant quelques interruptions par de grandes inversions, est observée avec l'ordre des gènes dans le génome d'*Anaplasma marginale*, une autre bactérie de la Famille des *Anaplasmataceae* (Frutos et al. 2006). Le plus

intéressant est que la comparaison intra-spécifique des génomes a révélé que les différences de taille de génomes sont dues essentiellement aux différences de tailles de la région intergénique : 13 kb entre Erga et Erwe ; 3 kb entre Erwe et Erwo. L'existence de multiples répétitions de motifs en tandem représentant 59 à 70 % de la région non codante est ainsi démontrée et des mécanismes de variation active par accroissement et réduction du nombre de copies semblent être privilégiés par rapport à la recombinaison homologue (Frutos et al, 2006). Cette variation plastique en continu du génome semble particulière à *E. ruminantium* et lui procurer de rapides réarrangements génomiques lui permettant de faire face à des changements de l'environnement. Collins et al (2005) observent également sur le génome Welgevonden ARC-OVI cette même extension de la région intergénique qui aurait contribué à la réduction de la région codante.

Avec 63 à 64 % du génome, la région codante d'*E. ruminantium* représente la plus faible proportion de tous les génomes bactériens disponibles à ce jour (Hotopp et al, 2006, Frutos et al, 2006). Elle comporte 920 à 958 séquences codantes (CDS) de tailles de 1007 paires de bases (souche Gardel) et de 1032 paires de bases (souche Welgevonden) et dont approximativement 82 % ont des fonctions connues. Parmi les gènes conservés figurent la plupart des gènes de ménage, les ARNt (36), les ARNs (2) et les ARNr (3). Ces derniers sont organisés en un seul opéron, le gène ARNr 16S étant séparé de la paire de gènes 23S – 5S par une séquence de 550 bp (Collins et al, 2005), caractère atypique général chez les bactéries de l'Ordre des *Rickettsiales* et probablement hérité d'un ancêtre commun après leur divergence par rapport aux mitochondries (Lang et al, 1997). *E. ruminantium* possède également des répétitions et des séquences dupliquées dans sa région codante, des gènes impliqués dans des fonctions importantes (sécrétion de type IV, biosynthèse de vitamines majeurs et cofacteurs) ou encore des familles multigéniques dont la famille *map* codant pour de protéines de membrane externe. *Anaplasma spp* et *Ehrlichia spp*, autres bactéries intracellulaires, disposent et exploitent un plus grand nombre de ces familles de protéines qui devaient leur permettre de persister chez l'hôte vertébré pour avoir de meilleures chances de transmission au vecteur tique. La transmission transovarienne n'existe pas en effet chez les tiques vectrices (Hotopp et al, 2006). Une des particularités du génome d'*E. ruminantium* est la présence d'une cinquantaine de CDS qui lui sont uniques, ne correspondant à aucun gène orthologue dans d'autres génomes (Frutos et al, 2006).

Il est établi que les bactéries libres durant leur évolution en pathogènes ou symbiotes acquièrent des gènes étrangers (aliens) par des recombinaisons non homologues ou transferts horizontaux (Ochman et Moran, 2001). Seulement 3 % du génome d'*E. ruminantium* semblent correspondre à ce type de gènes alors que la proportion atteint 10 à 15 % pour d'autres bactéries. *E. ruminantium* ne possède ni plasmides, ni phages, ni séquences d'insertion, ni gènes pour l'assemblage de pili. Néanmoins le gène *recA* impliqué dans la recombinaison homologue ainsi que d'autres gènes utiles pour les réparations d'ADN sont présents.

Sélection sur les gènes

La sélection naturelle, processus conduisant à l'adaptation des organismes à leurs environnements, est une force directrice de l'évolution. Ainsi, la sélection naturelle favorise-t-elle la divergence génétique entre les populations d'une même espèce quand les environnements sont très différents en augmentant l'adaptation de chaque population à son propre environnement (Hartl, 1988). Une évolution fait suite à des différences de survie apportées par des variations génétiques héréditaires. La sélection naturelle agit sur le phénotype global qui résulte en grande partie de l'action de nombreux gènes. Au niveau des gènes, la sélection se traduit par des phénomènes très différents pouvant s'illustrer par trois différentes situations intéressantes, sélection négative, positive et neutre.

Sélection conservatrice

Dénommée aussi sélection purifiante ou négative, elle élimine toute variation défavorable à l'existant. La plupart des gènes impliqués dans les mécanismes fondamentaux de survie des cellules, restés inchangés depuis longtemps, sont sujets à la sélection conservatrice. La grande similitude des séquences de certains gènes orthologues chez des organismes phylogénétiquement très éloignés l'atteste. Parmi ces gènes figurent les gènes de ménages ou domestiques ("Housekeeping genes", des gènes d'entretien indispensables au métabolisme de base de la cellule, à faible taux de mutation limitant l'effet délétère de celles-ci sur le fitness). L'élimination des mutations légèrement délétères dépend principalement de la dérive génétique et de la fréquence de la recombinaison. Mamirova et al (2007) ont comparé l'efficacité de la sélection purifiante entre les protéobactéries ayant différents styles de vie, libre ou intracellulaire stricte (parasite ou symbiote). L'étude a permis de montrer que chez les intracellulaires

obligatoires (petite taille de populations et faible niveau de recombinaison) la sélection purifiante est moins efficace que pour les bactérie libres. Toutefois elle l'est plus pour les parasites intracellulaires que pour les symbiotes (rares transferts horizontaux).

Sélection positive

La sélection positive favorise la diffusion de nouveaux variants. Les gènes impliqués dans les interactions entre le pathogène et son hôte sont typiquement soumis à une telle sélection. La sélection positive peut être seulement focalisée sur quelques sites (codons, acides aminés), la variation n'étant pas la même sur toute la séquence du gène. La sélection peut également ne pas avoir lieu dans toutes les lignées bactériennes (branches) et ne pas exister de manière continue. Chen, Hung et al (2006) ont montré par ailleurs que les gènes d'*Escherichia coli* (Groupe des γ -Proteobacteria) soumis à une sélection positive sont très distincts selon les habitats et les niches qu'occupe la bactérie chez l'hôte, correspondant à des adaptations différentes. Chez *Anaplasma marginale* (Famille des *Anaplasmataceae*, groupe des α -Proteobacteria), bactérie intracellulaire stricte confinée dans une membrane vacuolaire et transmise par des vecteurs notamment les tiques, il a été démontré que la variation du poids moléculaire de la protéine MSP1a de différents isolats se faisait en fonction du nombre de répétitions de 28 à 29 acides aminés en tandem (de la Fuente et al, 2001). La protéine MSP1a, une adhésine pour les érythrocytes des bovins et les cellules de tiques, évolue sous pression de sélection positive (de la Fuente et al, 2003 ; Kocan et al, 2004). Pour *E. ruminantium*, la protéine de membrane externe MAP1 ne semble pas présenter de signature d'évolution par pression de sélection positive (Allsopp et al, 2001). Hughes et French (2007), en comparant le dN (taux de substitutions non synonymes dans les sites non synonymes) et dS (taux de substitutions synonymes dans les sites synonymes) sur toute la région codante entre les génomes de Gardel et Welgevonden, n'ont pas mis en évidence de sélection positive s'exerçant sur le gène *map1*. La proposition que les sites codants subissent une sélection positive (Jiggins et al, 2002) et qui conforterait l'idée que la variation de la séquence protéique de MAP1 est en corrélation avec la variation des propriétés antigéniques (Perez et al, 1998) serait invalide.

Evolution neutre

Le constat est que la sélection positive comme la sélection purifiante génèrent moins de polymorphismes et donc n'apportent pas d'explications à l'existence d'une aussi grande variation génétique que celle observée au sein de la plupart des populations, variation révélée par différentes techniques de biologie moléculaire (allozymes, RFLP). Kimura suggère alors en 1968 que la plupart des polymorphismes observés au niveau moléculaire sont sélectivement neutres (Kimura cité par Hartl, 1988). Les mutations sélectivement neutres sont toutes équivalentes du point de vue de la sélection naturelle et produisent peu d'effets sur la capacité de survie ou de reproduction de l'organisme qui les porte, toute variation par rapport à l'existant étant admissible. La théorie neutraliste qui en sort a été supportée par des développements mathématiques et informatiques permettant son application au niveau de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés qui se produisent dans une molécule au cours de son évolution. La théorie neutraliste de l'évolution se définit comme « l'hypothèse des mutations neutres et de la dérive génétique ». La fixation de mutations sélectivement neutres chez une espèce est déterminée par la dérive génétique. Elles sont à la base d'une grande partie de la diversité génétique des populations au sein d'une espèce.

Diversité antigénique et génétique d'*E. ruminantium*

La caractérisation phénotypique basée sur les protections croisées entre isolats, les tests sérologiques pour la détection d'anticorps ou la pathogénicité chez les souris, a révélé des hétérogénéités chez *E. ruminantium*. Les études plus approfondies de caractérisation génétique soulignent aussi l'existence de cette diversité génétique au sein de l'espèce. Après l'observation selon laquelle les protéines dérivées du gène *map1*, provenant d'isolats de différentes origines géographiques, peuvent varier par leur taille apparente (Barbet et al, 1994), il a été démontré que le polymorphisme au niveau de trois régions hypervariables de la séquence nucléotidiques du gène *map1* pouvait être utilisé pour distinguer génétiquement différents isolats. Ceci a permis de montrer entre autres que, dans les Iles Caraïbes, les isolats Antigua et Gardel présentent des génotypes différents (Reddy et al, 1996). L'analyse phylogénétique sur une trentaine de protéines MAP1 montre que le gène *map1* n'est pas un marqueur géographique et ne semble pas avoir évolué sous pression de sélection positive (Allsopp et al, 2001). Des investigations ont alors été réalisées sur différents gènes conservés : ARN ribosomal 16S bien conservé sauf sur la région V1 Loop, ainsi que *pCS20*, *groESL* et *gltA*, tous trois présentant des SNP (Single nucleotide polymorphism) le long de leur séquence (Steyn et al, 2003 ;

Allsopp et al, 2003). Une faible variation de ces gènes est observée entre les séquences analysées. Tous les isolats de l'Afrique de l'Ouest ont des séquences 16S identiques. L'arbre phylogénétique sur *pCS20* (Figure 2A) semble distinguer néanmoins deux groupes géographiques, le Sud de l'Afrique incluant l'isolat Gardel (Les Caraïbes), et l'Ouest avec une intégration de l'isolat Küm1 (Afrique du Sud). Le gène *pCS20* est beaucoup moins polymorphe dans le groupe Ouest tandis qu'il est plus variable dans le groupe Sud (van Heerden et al, 2004). L'arbre de *groESL* (Figure 2B) donne également les mêmes groupes géographiques, les isolats Gardel, Küm1 et Küm2 étant inclus dans le groupe Ouest. Les analyses par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et de profils de fragments de macrorestriction montrent également cette différenciation génétique (Perez et al, 1996 ; de Villiers et al, 2000). Ce qu'il est intéressant de souligner est que la plupart des résultats sur ces études de caractérisation génétique, indépendamment des isolats utilisés, semblent aboutir aux mêmes remarques et suggèrent l'existence de deux grands groupes géographiques (l'Ouest de l'Afrique d'une part et le Sud et l'Est de l'Afrique d'autre part). Cependant des ambiguïtés sont constatées pour les isolats Küm1 et Küm2 (Afrique du Sud) et l'isolat Gardel (Les Caraïbes) qui se rattachent tantôt dans l'un tantôt dans l'autre groupe en fonction des gènes étudiés. D'autres gènes ont été également étudiés pour caractériser la diversité génétique d'*E. ruminantium*. Ainsi le gène *map1-2* de la famille multigénique *map1* présente un degré de polymorphisme élevé, bien que moindre que celui du gène *map1*. Il n'a pas été observé de déséquilibre de liaison entre ces deux marqueurs génétiques (Barbet et al, 2009). Ceci suggère que la recombinaison génétique entre individus de *E. ruminantium* est suffisamment fréquente pour détruire les déséquilibres de liaison.

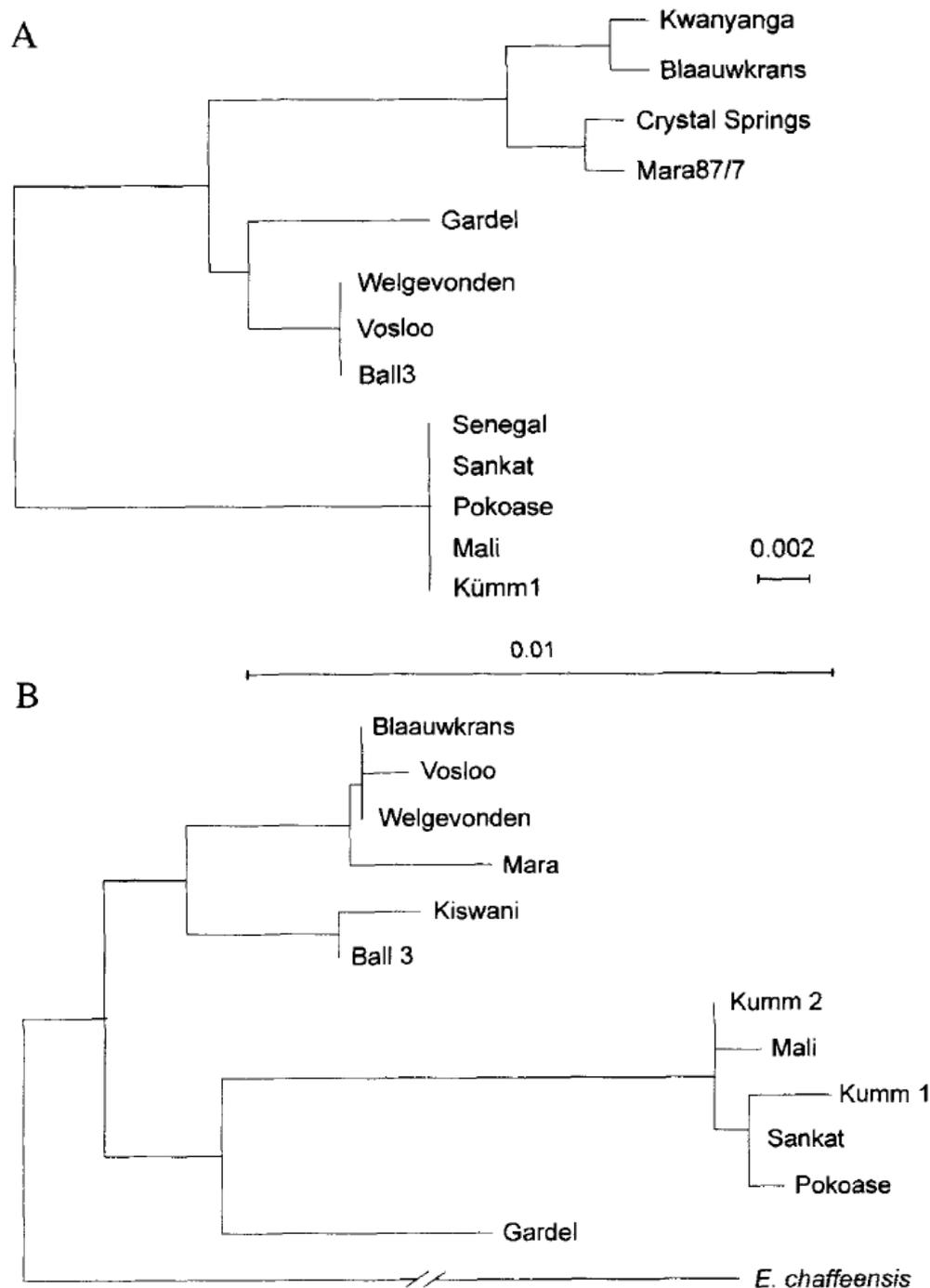


Figure 2 : Arbres phylogénétiques des séquences : *pCS20* (A) ; *groESL* (B) (d'après Allsopp et al, 2003)

Par ailleurs, une étude préliminaire à des essais de vaccination contre la cowdriose au Burkina Faso suivie d'épreuves virulentes par infestation naturelle de tiques a permis d'évaluer l'importance de cette diversité génétique d'*E. ruminantium*. Un fort degré de diversité dans une région géographique limitée, comprenant quatre villages éloignés de

7 à 40 km, est observé. Une douzaine d'allèles au locus *map1* est alors identifiée par une analyse de profils de restriction (RFLP) du produit d'amplification par PCR ou par des analyses d'identités de séquences nucléotidiques du gène *map1* (Martinez et al, 2004). De même, en Gambie, au moins onze géotypes correspondant à des profils de restriction différents du gène *map1*, sont présents dans deux zones agroécologiques (Faburay et al, 2008).

2.2 Présentation de la tique *Amblyomma variegatum*

Les tiques du genre *Amblyomma* appartiennent à l'Embranchement des Arthropodes, Classe des Arachnides, Ordre des Acariens, Sous Ordre des Ixodoidés, Famille des Ixodidés (tiques dures).

Distribution géographique

Plusieurs espèces de tiques du Genre *Amblyomma* peuvent transmettre *E. ruminantium*, *A. variegatum* et *A. hebraeum* étant les deux plus importantes par leur répartition géographique et par leur spectre d'hôtes. La tique *A. variegatum* a non seulement une très bonne capacité vectorielle, mais elle possède aussi une très large distribution.

En Afrique, *A. variegatum* est présente au sud de la zone de transition sahélienne, allant du Sénégal à l'extrême Nord-Ouest de la Somalie en passant par l'Afrique de l'Ouest, la République Centrafricaine, le Sud du Soudan et l'Ethiopie. Elle est également présente en Afrique de l'Est et jusqu'au nord-ouest du Zimbabwe où sa zone de distribution chevauche celle d'*A. hebraeum*. Les aires de distribution de cette tique sont la péninsule arabique (Yemen), les îles autour de l'Afrique dont Madagascar, La Réunion, l'Ile Maurice, Les Comores, Zanzibar, Sao Tomé et le Cap-Vert ainsi que les Iles Caraïbes (Walker et Olwage, 1987).

A. variegatum est présente de 0 à 2500 m d'altitude, avec néanmoins des variations selon les pays : seulement entre 1300 et 2000 m au Yémen, pas au-dessus de 2000 m dans les forêts rwandaises, absence au niveau de la mer au Kenya. Toutefois, *A. variegatum* est la seule espèce rencontrée à plus de 2000 m d'altitude. Quant aux autres espèces d'*Amblyomma*, elles ne dépassent pas 1500 – 1800 m d'altitude.

D'une manière générale, le climat et l'habitat sont les facteurs les plus importants conditionnant la présence des tiques *Amblyomma*. La pluviométrie est l'un des facteurs climatiques déterminants, la tique ne peut pas survivre à moins de 400 mm de pluies par

an. *A. variegatum* est ainsi absente des zones de climat aride. Néanmoins, les facteurs tels la température et la durée de jour influencent probablement le cycle saisonnier d'*A. variegatum* en déclanchant l'activité des mâles avant l'arrivée des pluies (Yeoman, 1968). Comme habitat, les espaces boisés, les steppes cultivées ou les prairies avec de hautes herbes sont les préférés, les zones couvertes d'herbes rases étant néfastes à leur survie.

Cycle biologique d'*A. variegatum* et transmission d'*E. ruminantium*

Dans les conditions expérimentales, une génération de tiques *A. variegatum* dure environ quatre mois (données fournies par Walker, citées par Petney et al, 1987) : pré-oviposition (12 jours), oviposition à éclosion des œufs (53j), gorgement des larves (5j sur lapin), mue en nymphe (14j), gorgement des nymphes (5j), mue en adultes mâle et femelle (19j), repas des femelles (12j). Tandis que dans les conditions naturelles, c'est le nombre ou la durée des périodes de pluies qui détermine le nombre de générations de tiques par an. *A. variegatum* se nourrit sur un très large spectre d'hôtes : les adultes préférentiellement sur des mammifères (*Proboscideae*, Périssodactyles, Artiodactyles) et les immatures souvent sur des reptiles, des oiseaux (surtout ceux qui se nourrissent au sol) et des petits mammifères (Petney et al, 1987). L'hôte n'est donc pas un facteur limitant pour cette espèce qui est l'une des plus importantes tiques des bovins en Afrique, les bovins restant les hôtes préférentiels. Les ovins et caprins sont moins parasités ainsi que les ruminants sauvages. Ces derniers auraient développé une résistance comme pour le cas des zébus.

Les *Amblyomma* sont des tiques trixènes, chaque stade (larve, nymphe, adulte) parasitant un hôte différent. Ainsi une tique qui s'infecte en tant que larve ou nymphe en prenant son repas sanguin sur un hôte infecté transmettra *E. ruminantium* en tant que nymphe ou adulte sur un autre hôte. Contrairement à ce qui se passe pour d'autres tiques *Ixodidae*, les mâles *Amblyomma* prennent un repas sanguin nécessaire à la maturation de leurs gonades et peuvent rester des semaines voire de deux ou trois mois sur le même hôte pour s'accoupler avec plusieurs femelles. Par conséquent, les mâles infectés au stade nymphal jouent un rôle important dans la transmission de la cowdriose. Le repas sanguin de la tique se déroule en deux phases : 1) une première phase lente et progressive consistant en une croissance tégumentaire qui va durer quelques jours selon le stade de développement de la tique ; 2) une deuxième phase rapide de 1 à 2 jours, la prise du repas proprement dit très concentré en cellules

sanguines puisque l'excès de fluide (eau et sels minéraux) est restitué à l'hôte. La quantité réellement prélevée est 3 à 10 fois supérieure au volume de sang ingéré par la tique à la fin du gorgement.

Une transmission transtadiale existe ainsi chez la tique *A. variegatum*. Toutefois la perte de l'infectiosité de la tique parfois observée peut être expliquée par l'absence de la rickettsie au niveau des glandes salivaires qui sont renouvelées après la mue et par le fait que la réinfection à partir des cellules épithéliales de l'intestin ne s'est pas réalisée (Camus et Barré, 1988). La transmission trans-ovarienne n'a pas de rôle dans l'épidémiologie de la cowdriose, malgré une description expérimentale non reproduite chez *A. hebraeum*. Actuellement, il est établi que les bactéries de la Famille des *Anaplasmataceae* transmises par des tiques n'ont pas de gènes leur permettant une transmission par la voie trans-ovarienne (Hotopp et al, 2006).

La tique infectée pouvant survivre jusqu'à 15 mois sans perdre le germe virulent constitue le principal réservoir d'*E. ruminantium* (Ilemobade, 1976). L'hôte peut également jouer le rôle de réservoir et représenter une source d'infection pour la tique notamment pendant la période de rickettsiémie faisant suite à une première infection ou à une réinfection après une baisse de l'immunité (Camus, 1987). Cette circulation du germe dans le sang peut être détectée jusqu'à 60 jours après l'inoculation ; après elle devient intermittente rendant difficile l'infection de la tique (Bezuidenhout, 1987). Le taux d'infection des tiques varie d'une localité géographique à une autre et d'une espèce à une autre. Cette variation est fonction de la disponibilité en hôtes infectés et porteurs sains pour les stades larvaires, de la persistance de l'infectiosité des tiques et de leur capacité vectorielle, ainsi que du pouvoir pathogène des souches (Camus et al, 1996).

2.3 Les zones d'étude

Les deux zones d'étude présentées ici, l'archipel guadeloupéen et la région du Bongolava dans le Moyen Ouest malgache, sont celles où ont été réalisées les enquêtes durant lesquelles des tiques adultes d'*A. variegatum* ont été collectées sur bovins afin de caractériser la diversité génétique des souches d'*E. ruminantium*. Le deuxième sujet abordé dans notre thèse, relatif aux mécanismes de transmission des souches, a été étudié par une approche essentiellement expérimentale. Les expériences ont été réalisées sur des chèvres à la ferme du CIRAD / BIOS située dans le domaine de l'INRA de Guadeloupe.

L'archipel guadeloupéen

La Guadeloupe et Marie Galante, les deux principales îles de l'archipel, représentent avec l'île Antigua les zones des Caraïbes où la cowdriose existe encore. La présence de la tique *A. variegatum* a été récemment encore (2001) signalée dans plusieurs îles malgré les campagnes d'éradication ou d'actions de contrôle effectuées (voir Figure 1).

Distribution géographique d'A. variegatum et espèces sensibles

La cowdriose ainsi que la tique vectrice *A. variegatum*, sont présentes dans tous les districts et communes de Guadeloupe et Marie Galante. En se basant sur les données des cas cliniques, on constate que les chèvres sont les plus sensibles, puis viennent les moutons et les bovins. La race créole constituait il y a une vingtaine d'années la majorité du cheptel bovin (95 %) et sa résistance à la cowdriose par rapport aux races européennes a été démontrée. La cowdriose est actuellement responsable du tiers des cas de morbidité et du quart des mortalités bovines. Les actions de croisements génétiques menées pour l'amélioration de la productivité du cheptel ont conduit à une augmentation de la proportion d'animaux sensibles.

Climat et abondance de vecteurs

Malgré une différence climatique entre les deux îles composant la Guadeloupe, Basse-Terre étant plus humide que Grande-Terre, la pluviométrie moyenne dans l'année est partout suffisante pour assurer une activité continue de la tique. Comme dans les zones à climat humide d'Afrique où *A. variegatum* existe, plusieurs générations peuvent se succéder et engendrer l'apparition de cas cliniques pendant toute l'année. Néanmoins, une légère baisse de leur incidence est constatée au mois d'avril, correspondant à la fin d'une saison sèche peu marquée débutant en février.

Endémicité instable

Avec une occurrence de cas cliniques sévères qui entraîne des morbidités nécessitant des traitements et des mortalités chez les petits ruminants, notamment les chèvres, et chez les bovins de races améliorées, la cowdriose en Guadeloupe et à Marie Galante est dans une situation d'instabilité endémique. Les taux d'infection des tiques observés en utilisant la méthode d'inoculation de broyats de tiques sur animaux sensibles ou la méthode PCR simple sont faibles, entre 1 et 4 % (Barré et Camus, 1984, Martinez et al, 2004). Une très courte durée de rickettsiémie chez l'animal malade source d'infection

des tiques, ainsi que la perte d'infectiosité de la souche présente dans la tique (seulement 60 % des nymphes infectées au stade larvaire transmettent la maladie), ont été les raisons évoquées (Camus et Barré, 1988). Cette situation épidémiologique peut limiter l'acquisition d'une protection naturelle par des infections répétées pendant la période de résistance des jeunes animaux qui fait suite à une protection non spécifique à la naissance et à celle apportée par les anticorps maternels.

Description générale de l'étude

Deux enquêtes ont été réalisées (voir article 2), la première entre mai et août 2003 en Guadeloupe et Marie Galante et la seconde uniquement à Marie Galante entre mai et juillet 2005. Des visites ont été effectuées dans 239 et 67 troupeaux de bovins respectivement pour la Guadeloupe et Marie Galante en 2003 et dans 195 troupeaux à Marie Galante en 2005. Un total de 2501 bovins en 2003 (2024 pour la Guadeloupe et 477 à Marie Galante) et 966 bovins à Marie Galante en 2005, a été observé individuellement pour le comptage des tiques selon les stades de développement afin d'évaluer les taux d'infestation au niveau du troupeau et des individus. Pour la détermination de taux d'infection de tiques, 212 tiques collectées sur 60 bovins appartenant à 35 troupeaux pour la Guadeloupe et Marie Galante (enquête 2003) ont été analysées suivant le protocole de PCR semi - nichée *pCS20* décrit par Martinez et al. (2004) pour la détection d'*E. ruminantium*. Cent trente-six tiques (une par bovin observé) collectées dans 72 troupeaux à Marie Galante en 2005 ont également été testées dans les mêmes conditions de PCR que précédemment mais en utilisant des amorces légèrement modifiées, quelques nucléotides étant remplacés par des nucléotides dégénérés pour améliorer la détection (Molia et al, 2008). Les souches identifiées dans les tiques infectées ont ensuite été typées soit par analyse de séquences nucléotidiques soit par les profils de restriction (RFLP) des produits d'amplification du gène *map1* selon la PCR nichée décrite dans le même article (Martinez et al, 2004) mais aussi avec les amorces modifiées.

Le Bongolava dans le Moyen Ouest malgache

La région du Bongolava, capitale Tsiroanomandidy, a été pendant longtemps la zone de vulgarisation de différentes espèces animales de races améliorées (bovins laitiers, bovins Renitelo, porcs Large White...). Divers programmes d'amélioration génétique ont été réalisés à la Station de Recherche de Kianjasoa qui a également hébergé

différents animaux introduits à cet effet, et ont appuyé techniquement leur diffusion. La savane herbeuse représente la majeure partie du territoire et procure un pâturage propice à l'élevage semi-extensif de bovins en embouche herbager ou "dabokandro". L'enquête rétrospective menée en 2003 sur la race bovine Renitelo (race bovine issue de croisement de Limousine, Zébu Afrikander et Zébu malgache) indique que les maladies à tiques, notamment la cowdriose et les babésioses à *Babesia bigemina* et *Babesia bovis*, constituent la troisième cause de morbidité et de mortalité (données non publiées de Raliniaina M.).

Distribution géographique d'A. variegatum et espèces sensibles

A Madagascar, *A. variegatum* est prévalente dans toute l'île, sauf probablement dans une partie de l'extrême sud où la pluviométrie est très faible. Elle est moins prévalente sur les Hauts Plateaux et sa présence n'est pas signalée dans les zones trop fraîches, la saison sèche et fraîche semble avoir une influence négative sur son cycle biologique mais il n'est pas rare de la retrouver pendant la saison des pluies autour des aires de repos ou le long des routes empruntées par les troupeaux de bovins venant surtout de l'Ouest et destinés à l'abattoir d'Antananarivo (Uilenberg et al, 1979). On observe la même gradation de sensibilité qu'en Guadeloupe : les moutons sont moins sensibles que les chèvres mais plus que les bovins. Toutefois les bovins de races améliorées présentent une sensibilité similaire à celle des petits ruminants.

Climat et abondance des vecteurs

Le Moyen Ouest malgache se situe à une altitude comprise entre 800 et 1800 m et possède un climat de transition entre le "chaud et semi-humide" et le "tropical d'altitude" des Hauts Plateaux avec une saison sèche marquée (avril - mai à octobre). La pluviométrie moyenne annuelle est de l'ordre de 1500 mm. La saison des pluies, sauf sur la côte Est, est unique, d'octobre - novembre à mars. *A. variegatum* ne donne ainsi qu'une seule génération de tiques par an. L'infestation par les tiques mâles commence en août - septembre avant l'arrivée des pluies, moment où débutent les infestations par des tiques femelles. Les pics d'abondance des larves sont observés vers la fin de la saison des pluies et ceux des nymphes en mai-juin, pendant la saison sèche. L'occurrence de la cowdriose suit le cycle du vecteur et correspond généralement aux périodes de pics des nymphes et des tiques adultes mâles et femelles.

Stabilité enzootique ?

Actuellement, le cheptel de ruminants est composé essentiellement de bovins zébus avec quelques centaines de petits ruminants. Le système d'enregistrement ou de recensement des cas cliniques ou de mortalité n'existant pas, les données statistiques fournies dans les rapports d'activité des services vétérinaires ne font apparaître que des tendances. Ainsi, le peu de cas cliniques observés ne signifie pas forcément que la cowdriose est dans une situation de stabilité enzootique dans la zone car les actuelles races présentes notamment bovines (zébus) sont considérées comme résistantes, De faibles taux d'infection des tiques, ne pouvant pas entretenir une immunité correcte malgré des infestations massives, ont été évoqués par le passé dans cette même zone (Uilenberg, 1971).

Description générale de l'étude

Une enquête a été réalisée sur 80 bovins de la Station de Recherche de Kianjasoa et sur quelques 103 bovins dans 11 troupeaux répartis dans 6 localités au Nord de la station. Un prélèvement de sang pour extraction de sérum a été effectué et toutes les tiques adultes ont été prélevées sur chaque bovin des élevages visités. Les taux d'infestation au niveau troupeau et individuel ont été déterminés. Un total de 101 tiques choisies au hasard sur des bovins séropositifs de chaque troupeau puis complétés par des tiques sur les autres animaux de manière à analyser 8 à 10 tiques par troupeau pour la détection d'*E. ruminantium* Le gène *map1* a ensuite été amplifié dans les extraits d'ADN des 12 tiques positives en *pCS20* pour le typage des souches.

2.4 Objectifs de l'étude et démarche scientifique

Les questions soulevées par l'existence de cette diversité génétique d'*E. ruminantium*

Quelle est l'étendue de la diversité ? Est-elle similaire à l'échelle de localités dans les deux zones d'étude, de régions et de continents ?

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'importance de cette diversité génétique des souches dans des régions où les introductions (les Caraïbes et Madagascar), en comparaison avec les mélanges des souches (Afrique), sont différentes. L'hypothèse était que l'isolement géographique en Guadeloupe et à Madagascar devait faire apparaître des divergences génétiques entre les souches existantes dans les deux îles d'une part et par rapport aux souches d'Afrique d'autre part. Le continent africain est

vraisemblablement le berceau de la cowdriose et aussi le lieu de diversification d'*E. ruminantium*. Les Caraïbes représentent un cas d'introduction récente avec des importations de bovins venant de l'Afrique de l'Ouest il y a plus de 200 ans et où aucune introduction n'a été observée depuis au moins 150 ans. Madagascar représente une situation intermédiaire avec une hypothèse d'introduction de bovins zébu provenant de l'Afrique de l'Est à partir du 7^{ème} siècle de notre ère et des introductions récentes d'animaux venant d'Afrique du Sud durant la première moitié du 20^{ème} siècle.

Un passé évolutif similaire ou divergeant des paralogues de la famille multigénique *map*? Les analyses phylogénétiques sur plusieurs gènes polymorphes de la famille multigénique *map* permettent-elles d'identifier des groupes géographiques ou antigéniques ? Quels seraient les mécanismes de génération de cette diversité et de son évolution pouvant contribuer à des fins de regroupement de souches en clusters de protection croisée permettant à terme d'améliorer l'efficacité des vaccins ?

Les gènes conservés tels que la région *pCS20* ou le *groESL* présentent peu de polymorphisme. Néanmoins, les analyses phylogénétiques sur plus de 10 isolats semblent définir deux grands groupes géographiques. Les analyses génétiques par RAPD et profils de macrorestriction ont abouti aux mêmes résultats. Par ailleurs, les analyses du polymorphisme du gène *map1* ont permis de définir des groupes de génotypes qui ne sont cependant pas prédictifs de la protection croisée. De plus, les variants protéiniques MAP1 ne montrent ni de corrélation avec la distribution géographique des souches, ni une évidence d'être sous pression de sélection positive. Toutefois, l'absence de contraintes géographiques suggère que MAP1 est sous une forte pression immunitaire de l'hôte vertébré (Yu et al, 2007). Des analyses génétiques sur plusieurs gènes polymorphes de la famille multigénique *map* seraient intéressantes pour analyser les processus évolutifs qui sont impliqués dans la mise en place de cette diversité génétique au sein d'*E. ruminantium*. Le gène *map1* n'étant pas alors un marqueur géographique et ne mettant pas en évidence des groupes antigéniques, les analyses génétiques sur d'autres gènes polymorphes apportent – elles de meilleures informations sur l'existence de groupes géographiques ou de groupes ayant des propriétés immunogènes homogènes?

De nombreux mécanismes sont en effet utilisés par les bactéries parasites intracellulaires obligatoires ayant subi une réduction du génome par la perte de certains

gènes pour infecter des types de tissus et de cellules variés et s'adapter à une pression immunitaire de l'hôte (Wernegreen, 2005). Les transferts horizontaux de gènes peuvent être des mécanismes importants dans le processus d'acquisition de gènes nécessaires à une évolution vers des associations avec de nouveaux hôtes, or ils paraissent peu utilisés par ce type de bactérie. Ces mécanismes incluent plutôt la sécrétion de type IV (voie de sécrétion qui exporte des ADN ou des protéines destinés à provoquer des changements physiologiques chez l'hôte durant l'infection) associée à la pathogénie et les familles de protéines de surface polymorphes (Palmer, 2002).

Famille multigénique map

Parmi les nombreuses familles de gènes hypothétiques de protéines membranaires identifiées chez *E. ruminantium*, figurent la famille multigénique *map* comprenant 16 paralogues de tailles similaires (Figure 3) qui présentent en moyenne 35 % d'homologies de séquences (Collins et al, 2005). Les familles homologues à celle de *map* existent aussi chez *E. chaffeensis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* et *A. marginale*. La famille de gènes *map1* est flanquée d'un hypothétique régulateur de transcription en amont et d'une translocase de préprotéines (transport de protéines), le gène *secA* en aval (van Heerden et al, 2004). Plusieurs gènes paraissent transcrits mais des différences de traduction existent au niveau des organes de multiplication (intestin et glandes salivaires) chez la tique vecteur comme dans les cultures de cellules de l'hôte et de tiques vecteurs ou non vecteurs (Bekker et al, 2002 et 2005 ; Postigo et al, 2007 et 2008). Ainsi la transcription active des 16 paralogues *map1* a été constatée sur *E. ruminantium* cultivées dans de cellules endothéliales, les paralogues séparés par de courts espaces intergéniques étant transcrits solidairement de manière polycistronique (van Heerden et al, 2004). In vitro, différentes protéines de la famille *map1* sont également exprimées dans les cellules des hôtes mammifères et des tiques vecteurs.

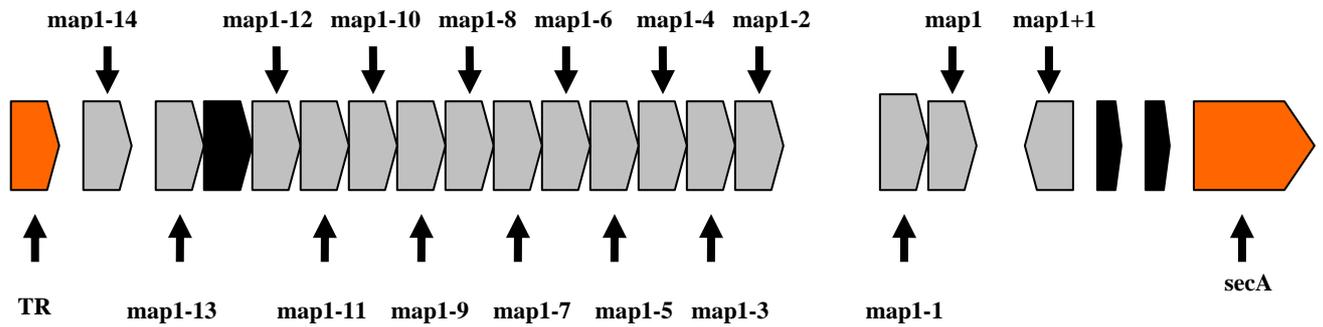


Figure 3 : Présentation schématique de la Famille multigénique *map* : gènes *map* (gris) ; gènes codant pour des protéines hypothétiques (noir), TR, hypothétique régulateur de transcription ; *secA*, gène codant pour une subunité préprotéinique de la translocase

La famille MAP1 appartient au supergroupe des protéines de surface (Outer Membrane Protein ou OMP). Toutefois s'il est établi que des protéines de surface, notamment chez les *Anaplasma* ou d'autres *Ehrlichia*, servent à échapper à la pression de sélection du système immunitaire de l'hôte (Kocan et al, 2004), un rôle similaire des MAP1 reste encore à démontrer pour *E. ruminantium*. Néanmoins, étant qualifiées de "porin", elles représentent les portes d'échanges de molécules indispensables à son métabolisme.

Les substitutions (mutations ponctuelles) dans de séquences nucléotides peuvent entraîner ou non des modifications de la chaîne d'acides aminés correspondante. Ainsi la substitution synonyme au niveau du codon aboutit à un même acide aminé tandis que la substitution non synonyme entraîne un remplacement par un autre acide aminé. Des méthodes (Nei et Gojobori, 1986 ; Yang et Yoder, 1999 ; Yang et al, 2000) basées sur l'estimation de nombre de substitutions synonymes et non synonymes et leur ratio ont été élaborées afin de connaître les types de pressions de sélection (positive, neutre ou négative) auxquelles peuvent être soumis des sites codon ou acides aminés. La comparaison entre les génomes Erga et Erwe faite par Frutos et al (2006) a fourni un nombre suffisant de différences pouvant être utilisées dans des analyses de pression de sélection basées sur les taux des substitutions synonymes versus non synonymes. Les protéines membranaires représentent l'un des cas les plus intéressants dans les résultats de leur étude. Les gènes paralogues *map1* montrent ainsi un grand nombre de substitutions et d'insertion / délétion entre Erga et Erwe/Erwo. Les gènes *map1* et

map1-13 sont les seuls pour lesquels les substitutions synonymes fournissent un signal significatif de pression de sélection.

Les questions posées sur les mécanismes de transmission et leurs influences dans la structure des populations d'*E. ruminantium*

C'est au cours de l'étude d'épidémiologie moléculaire réalisée au Burkina Faso pendant les essais en milieu réel du vaccin Gardel inactivé qu'une description de la distribution des géotypes *map1* chez les moutons vaccinés morts de la cowdriose et les tiques *A. variegatum* récoltées sur ces mêmes animaux a été faite. Des différences de proportions concernant les infections par plusieurs souches de géotypes différentes ont été mises en évidence. Malgré l'existence de 12 géotypes *map1*, seuls 31% des cerveaux des animaux morts et une encore plus faible proportion de tiques (18%), étaient coinfecteds par plusieurs souches. Afin d'expliquer cette situation et de comprendre les mécanismes qui sont à la base de la structure des populations d'*E. ruminantium* en milieu réel, trois séries d'expériences de transmission de deux souches à des tiques mises à gorgier sur des animaux infectés par inoculation ont été réalisées en milieu contrôlé : infection de tiques sur des chèvres naïves coinfecteds par inoculation des souches soit simultanément, soit en décalage de 24 et 48 heures ; infections successives d'une même lignée de tiques à deux stades différents de développement sur deux chèvres infectées distinctes ; inoculation de chèvres vaccinées avec la souche homologue Gardel puis avec une souche hétérologue deux mois à un an après la première et infection des tiques lors de la deuxième infection.

En termes de mécanismes de transmission de l'hôte au vecteur, quatre grandes questions se posent : 1) Quels sont les facteurs qui déterminent la transmission ? ; 2) Quels sont les rôles de l'hôte, de la tique et de la bactérie elle-même dans la transmission des souches ? ; 3) Comment les tiques sélectionnent-elles les souches ? ; 4) De quelle manière les facteurs qui déterminent la transmission pourraient-ils influencer sur la structure des populations du pathogène en milieu réel ?

Les questions subsidiaires concernent la compétence vectorielle de la tique *A. variegatum* (souche guadeloupéenne) vis-à-vis de la transmission de souches d'*E. ruminantium* d'origines géographiques différentes, ainsi que les organes de "stockage" d'*E. ruminantium* pendant le portage asymptomatique chez l'hôte tout en sachant qu'un animal malade guéri spontanément ou traité reste porteur de la bactérie et que la

rickettsiémie n'est pas permanente durant le portage. Néanmoins, en épidémiologie les animaux porteurs asymptomatiques représentent une des sources d'infection de la tique.

La démarche scientifique suivie

Diversité génétique et caractérisation moléculaire

La première étape de notre étude a consisté en un criblage des extraits d'ADN des tiques adultes récoltées sur des bovins pour la détection des tiques infectées. Pour cela, l'amplification par PCR semi-nichée de la région *pCS20*, bien conservée au sein d'*E. ruminantium*, a été le test utilisé. Le locus *pCS20* est constitué de 2 ORF (cadres de lecture ouverts) : ORF1 homologue de l'Oxydase du cytochrome C nécessaire à l'assemblage des protéines et ORF2, homologue du Ribonucléase III. L'ensemble des 2 ORF donne une séquence nucléotidique de 1306 pb. Le locus *pCS20*, présent dans différents organismes, est bien conservé. La région *pCS20* a été utilisée comme sonde ADN dans le but de développer un test plus sensible et plus spécifique pour la détection d'*E. ruminantium* dans les tiques *Amblyomma* et chez les ruminants infectés (Waghela et al, 1991). Le constat est que les différentes sondes *pCS20* utilisées hybrident sur l'ADN génomique de *E. canis* et de *E. chaffensis* (Peter et al, 1995 ; van Heerden et al, 2004) mais que les amorces définies (Mahan et al, 1992 ; van Heerden et al, 2004) jusqu'à maintenant pour la PCR *pCS20* n'amplifient pas l'ADN de ces organismes proches d'*E. ruminantium*. La PCR *pCS20* est avérée, par conséquent, non seulement le test le plus spécifique pour la détection de cette rickettsie, mais également le plus accessible aux laboratoires non équipés dans les manipulations d'éléments radioactifs.

La deuxième étape est basée sur le typage des souches identifiées dans les tiques infectées par RFLP et/ou par analyse des homologies de séquences nucléotidiques des produits d'amplification du marqueur génétique *map1* pour évaluer la diversité génétique. Le gène *map1* de souches (matériel identifié multiplié ou non), d'isolats (matériel isolé et conservé en une seule occasion) ou de stocks (matériel provenant d'un isolat passé sur des animaux, des vecteurs ou des cultures) identifiés dans les deux zones d'étude (Guadeloupe et à Madagascar), à Antigua, au Burkina Faso et au Sénégal a été amplifié puis typé par RFLP et séquencé. Pour permettre des investigations sur la diversité génétique au niveau village, région et continent, les protéines MAP1 dérivées des séquences obtenues précédemment ainsi que les séquences protéiniques de souches de références disponibles, soit un total de 80, ont été analysées selon les méthodes

décrites dans l'article 3 (Ralinaiaina et al, 2010) en Annexe 3. Le gène *map1* appartient à la famille multigénique *map1* et code pour la synthèse de MAP1 (Major Antigenic Protein) (Jongejan et Thielemans, 1989), la protéine immunodominante reconnue en premier par le système immunitaire de l'hôte et qui serait un leurre pour bloquer la réponse immunitaire afin de mieux protéger les autres protéines exprimées par la famille multigénique qui assurent probablement d'importants rôles dans la survie de la bactérie (van Heerden et al, 2004a). Le gène *map1* est toujours transcrit, que ce soit en cultures de cellules endothéliales de l'hôte ou de cellules de tiques, ou dans les tiques *A. variegatum* elles-mêmes (Bekker et al, 2002 et 2005). Le gène *map1* est également transcrit plus massivement aussi bien au niveau des glandes salivaires que de l'intestin d'une tique femelle gorgée (Postigo et al, 2007). La présence de la protéine MAP1 à la surface de la bactérie a pu être démontrée (Jongejan et al, 1991). Ainsi, l'approche protéomique couplant l'électrophorèse et la spectrométrie de masse a révélé l'expression *in vitro* de la protéine MAP1 dans les cultures de cellules endothéliales (Postigo et al, 2008) malgré la prédiction sur le caractère non clivable des peptides terminaux de ces protéines de membrane suggérant qu'elles seraient plutôt des protéines de membrane interne (von Heijne cité par Collins et al, 2005). L'étude de l'importance des substitutions synonymes et non synonymes de nucléotides a révélé que les premières sont réparties le long de la séquence alors que les secondes sont significativement localisées dans la première et la troisième région hypervariable. De plus, les analyses statistiques basées sur les ratios entre les substitutions de bases non synonymes et les synonymes ne montrent pas significativement l'occurrence d'une pression de sélection positive (Allsopp et al, 2001). Néanmoins, le paralogue *map1* est l'un des deux seuls gènes de la famille multigénique *map* qui montre une pression de sélection significative par de substitutions de nucléotides synonymes (Frutos et al, 2006) suggérant une plus forte pression pour maintenir sa séquence protéique et sa fonction. Le gène marqueur *map1* utilisé répondait alors à plusieurs critères de génotypage : il n'est pas soumis à une pression de sélection positive, il est a priori sous pression de sélection négative (biais vers la conservation) et présente un nombre de substitutions synonymes significativement élevé par rapport à ce qui est attendu du seul fait de hasard. Il représentait alors le marqueur idéal pour le typage de souches d'ER : degré élevé de polymorphisme entre les isolats, ne varie pas pendant les passages vecteur - hôte - vecteur (Ralinaiaina, 2002) ou après plus de 150 passages sur cultures cellulaires et paraît conservé dans les isolats provenant de différentes régions.

Les analyses génétiques de cinq séquences d'acides aminés de protéines de surface codées par de gènes polymorphes de la famille multigénique *map1* d'*E. ruminantium* représentent la troisième étape. Les gènes *map1+1*, *map1-2*, *map1-5*, *map1-6* et *map1-14* sont répartis le long du locus (Figure 4). L'amplification n'ayant réussi que sur quelques souches, en fonction des gènes paralogues *map* étudiés, seulement 11 à 15 séquences incluant celles des souches de références sont analysées.

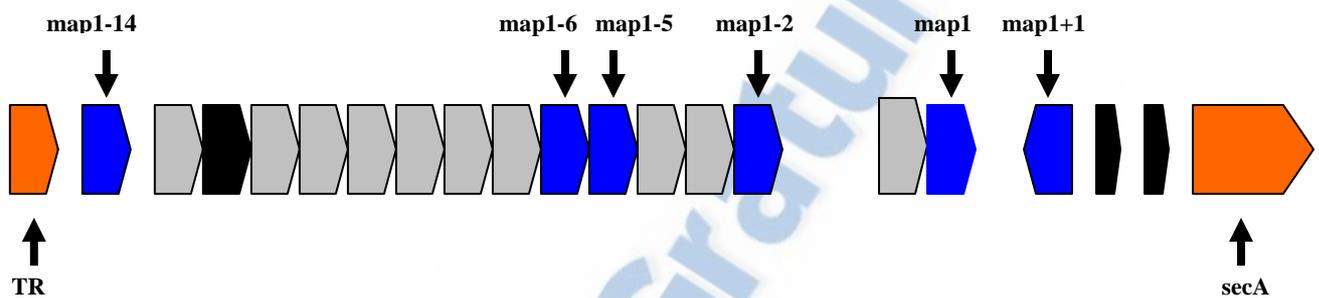


Figure 4 : Les gènes marqueurs utilisés (bleu)

Diversité génétique et mécanismes de transmission des souches

Pour la quatrième étape, des investigations sur des infections multiples de l'hôte et du vecteur ont été explorées par des études expérimentales afin de voir par quels mécanismes plusieurs souches sont transmises de l'hôte au vecteur, quels sont les facteurs qui influent sur cette transmission et quelles seraient les impacts sur la structure des populations de pathogènes sur le terrain ? Des tests de PCR nichées *map1* spécifiques de 6 souches représentant 6 génotypes *map1* différents (Gardel, Kiswani/Ludlow, Sénégal/Pokoase, Antigua, Mali/Sankat et Burkina Faso) ont ainsi été développés afin de détecter *E. ruminantium* aussi bien dans le sang d'animaux infectés que dans les tiques mises à gorger sur ces mêmes animaux.

Les tests de PCR nichées *map1* spécifiques des souches Gardel (génotype Gardel), Lamba 479 (génotype Kiswani/Ludlow) et Sankat 430 (génotype Mali/Sankat) sont ensuite utilisés pour suivre la cinétique de l'infection dans le sang de l'hôte chèvre et typer *E. ruminantium* directement dans les tiques dans trois types d'expérimentations de transmission de la rickettsie qui simulent des modalités pouvant aboutir à une co-infection de la tique.

Chapitre 3 - Evaluation de l'importance des infestations par les tiques *Amblyomma variegatum* et de l'étendue de la diversité génétique de *E. ruminantium*

3.1 Mise au point d'outils et analyse de la diversité génétique

(Article 1 ci-après)

PCRs nichées pour la détection et le génotypage d'*Ehrlichia ruminantium*, utilisation pour l'analyse de la diversité génétique

Martinez D., Vachiéry N., Stachurski F., Kandassamy Y., **Raliniaina M.**, Aprelon R. and Gueye A. 2004. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1026** : 1-8

Résumé d'article

L'agent causal de la cowdriose (heartwater), *Ehrlichia ruminantium* (ER), est une bactérie intracellulaire obligatoire transmise par diverses espèces de tiques Ixodidae du genre *Amblyomma*. Elle infecte les ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins et buffles) et sauvages. La cowdriose est largement répandue en Afrique sub-saharienne. Elle est présente également à Madagascar et dans plusieurs îles des Caraïbes.

L'efficacité des moyens de lutte contre la maladie basés sur la vaccination et mis en œuvre jusqu'à maintenant a été limité par l'existence de la diversité génétique et donc antigénique qui avait été mise en évidence par la technique de Random amplified polymorphic DNA (RAPD) et aussi par le polymorphisme de séquences du gène *map1* codant pour une protéine de membrane immunodominante de la bactérie. Les vaccins

monovalents procurent des niveaux de protection variés qui révèlent une diversité antigénique sur le terrain. L'évaluation du degré de diversité génétique des souches sur le terrain s'est avérée nécessaire pour la formulation de vaccins efficaces. Ainsi, ont été mis au point deux PCR nichées plus sensibles que les tests PCR existants. Ces deux PCR nichées sont utilisées l'une pour le diagnostic et l'autre pour la caractérisation de la diversité génétique. La PCR semi - nichée *pCS20* cible un fragment de gène spécifique d'*ER*, dont la séquence est conservée entre les souches. Lors de la deuxième phase de PCR, les amorces classiques AB128/AB129 déjà testées dans des études précédentes pour leur spécificité sont utilisées. Pour la première phase, AB128 est utilisée tandis qu'une nouvelle amorce AB130 a été dérivée. AB130 a été choisie après alignement de séquences de *pCS20* de trois souches différentes dans une région sans polymorphisme ponctuel, SNP (Single nucleotide polymorphism). Pour la caractérisation génétique des souches, une PCR nichée ciblant le gène *map1*, est utilisée. Ce gène *map1* est très polymorphe et n'est plus soumis à pression de sélection, de plus, il existe un grand nombre de séquences *map1* déjà disponibles dans les bases de données internationales. Il présente les caractéristiques intéressantes d'un marqueur de génotypage. La caractérisation se fait à partir de l'amplicon *map1* soit par digestion enzymatique et identification du profil sur gel (Polymorphisme de longueurs des fragments de restriction) soit par séquençage. Ces deux PCR nichées ont été mises au point pour améliorer respectivement la détection d'*ER* et le typage des souches.

La sensibilité des 2 PCR nichées a été évaluée en utilisant de l'ADN purifié d'*ER* préalablement quantifié. Un gain de 2 Log10 comparé aux PCR simples permet ainsi d'obtenir une limite de détection de 6 corps élémentaires (CE) pour la PCR semi - nichée *pCS20* et 60 CE pour *map1*. En ce qui concerne la PCR semi - nichée *pCS20*, sa sensibilité est comparable à celle des tests de PCR couplés à une hybridation avec des sondes radioactives. Cependant, la PCR nichée évite l'étape laborieuse d'hybridation sur membrane et est utilisable en analyse haut débit pour des études épidémiologiques.

L'efficacité des deux PCRs a été évaluée sur des échantillons de sang, de cerveaux, de poumons frais ou congelés et de tiques fraîches ou conservées dans l'éthanol à 70%. Cela a permis de valider leur utilisation à partir d'échantillons collectés sur le terrain avec des conditions de stockage adaptées. Les PCR nichées détectent *E. ruminantium* aussi bien dans le sang, les cerveaux et les poumons frais ou congelés des animaux infectés que dans les tiques infectées fraîches ou conservées dans l'éthanol sans perte d'intensité de signal. Ces résultats confirment qu'elles peuvent donc être utilisées

comme outils d'analyses dans des études épidémiologiques sur des échantillons de terrain.

Les deux PCR nichées ont servi ensuite dans des études épidémiologiques préliminaires menées au Burkina Faso et en Guadeloupe afin d'évaluer l'importance et l'étendue de la diversité des souches d'*ER*. Dans le cadre d'études accompagnant des essais vaccinaux au Burkina Faso, des nymphes d'*Amblyomma variegatum* ont été récoltées sur des animaux malades dans 4 villages (Sara, Bekuy, Lamba et Bankouma) éloignés chacun de 15 à 40 km. Après la mue, les tiques positives pour *pCS20* ont été testées en *map1*. Sur la base des séquences nucléotidiques des produits de PCR *map1*, un arbre représentant les pourcentages d'homologie entre les souches pour ce gène a été réalisé.

Pour la Guadeloupe, un total de 212 tiques (voir Description de l'étude p 41) *A. variegatum* adultes sauvages récoltées sur des bovins lors d'une enquête épidémiologique, a été analysé. Une nette amélioration de la détection d'*ER* dans les tiques est observée en utilisant la PCR semi - nichée *pCS20*. Le taux d'infection de tiques sauvages obtenu est de 36%, comparé au taux de 1,7% estimé auparavant en utilisant une PCR simple *pCS20*. Avec la PCR nichée *map1*, moins sensible que la *pCS20* semi - nichée, 9 % des tiques positives en *pCS20* se sont révélées négatives en *map1*: 91% des tiques de terrain positives en *pCS20* sont positives pour *map1*. Ce sont quelques tiques sauvages de terrain présentant de faibles intensités de signaux en *pCS20* qui n'apparaissent pas positives pour *map1*. Par contre, toutes les tiques positives en *map1* se sont révélées être positives en *pCS20* ce qui confirme la spécificité du test.

Douze isolats, dont un contient un mélange de quatre souches ont été détectés dans les tiques positives en *map1* au Burkina Faso. Ils proviennent de 8 troupeaux répartis dans les 4 villages de la zone d'étude. L'arbre d'homologie du gène *map1* montre que les allèles *map1* de ces souches sont identiques à ceux déjà présents ailleurs en Afrique et dans les Caraïbes. En Guadeloupe, 9 allèles également présents en Afrique sont identifiés. Une grande diversité génétique d'*ER* existe donc dans des zones géographiques restreintes (cf 4 villages du Burkina Faso). Ceci explique l'efficacité limitée des essais avec le vaccin inactivé sur le terrain au Burkina Faso, la souche vaccinale ne protégeant que partiellement contre les souches qui circulent dans la zone. Même si *map1* est un bon marqueur moléculaire de diversité, il n'est pas un marqueur de protection croisée entre souches. Une étude plus poussée de la cartographie des souches couplée avec des expériences de protection croisée est donc nécessaire pour le développement de vaccins efficaces.

L'obtention du génome de deux souches d'*ER* permet de caractériser l'ensemble du polymorphisme génétique du pathogène et ainsi de tenter d'identifier des gènes potentiellement prédictifs de protection croisées et de développer des vaccins recombinants avec des gènes candidats.

Nested PCR for Detection and Genotyping of *Ehrlichia ruminantium*

Use in Genetic Diversity Analysis

DOMINIQUE MARTINEZ,^a NATHALIE VACHIÉRY,^a FREDERIC STACHURSKI,^b
YANE KANDASSAMY,^a MODESTINE RALINIAINA,^c ROSALIE APRELON,^a
AND ARONA GUEYE^d

^aCIRAD, Guadeloupe, France

^bCIRDES, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

^cFOFIFA, Antananarivo, Madagascar

^dISRA, Dakar, Senegal

ABSTRACT: *Ehrlichia ruminantium*, the agent of cowdriosis transmitted by *Amblyomma* ticks, presents an extensive genetic and antigenic diversity of key importance for vaccine formulation. Two means of nested polymerase chain reaction (PCR) targeting were developed to conduct molecular epidemiology studies in the Caribbean and Africa. The first used a conserved DNA fragment for detection of the pathogen in animals and vectors, and the second relied on the polymorphic *map1* gene for genotyping. As compared to a PCR, the nested PCR showed a 2-Log₁₀ improvement of sensitivity and allowed amplification from ticks, blood, brain, and lungs from infected animals, providing a more accurate picture of the tick infection rate. In Guadeloupe, this rate reached 36% ($N = 212$) instead of 1.7% ($N = 224$), as previously estimated. Genetic typing was done by restriction fragment length polymorphism or sequencing of *map1* amplification products. Molecular epidemiology studies conducted in field sites selected for vaccination trials with inactivated vaccine, revealed the circulation of genetically divergent strains in limited geographical areas. It is known, then, that genetic clustering based on *map1* has no predictive value regarding the protective value of a given strain against a new strain. However, tracing the strains by this technique revealed the extent of *E. ruminantium* diversity that one can expect in a given region, and the method allows differentiation between an inadequate immune response and the challenge by a breakthrough strain on animals dying despite vaccination. Up to now, genetic typing does not avoid cross-protection studies, which were conducted in parallel, although on a more limited scale. The importance of pathogen diversity studies for optimization of vaccine design is discussed as well as the research for new polymorphic genes. These genes may allow better predictions on cross-protection, given the recent completion of the sequence of the full genome of two *E. ruminantium* strains.

KEYWORDS: *Ehrlichia ruminantium*; *Amblyomma* ticks; vaccine development; pCS20; *map-1*

Address for correspondence: Dominique Martinez, CIRAD-EMVT, Domaine Duclos, 97170 Petit Bourg, Guadeloupe. Voice: 590-590-25-59-95; fax: 590-590-94-03-96.
dominique.martinez@cirad.fr

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1026: 106–113 (2004). © 2004 New York Academy of Sciences.
doi: 10.1196/annals.1307.014

INTRODUCTION

Ehrlichia ruminantium, the causative agent of heartwater, is an obligate intracellular bacterium transmitted by *Amblyomma* ticks and infecting wild and domestic ruminants.¹ It is distributed all over sub-Saharan Africa, Madagascar, and some Caribbean islands. The parasite has a high degree of genetic diversity as shown by random amplified polymorphic DNA (RAPD)² and sequencing of the polymorphic *map1* gene.³ The observation of various levels of cross-protection induced between different isolates reveals an antigenic diversity with implications for the development of vaccines.⁴⁻⁶

Besides the identification of protective antigens for vaccination, the evaluation of strain diversity in the field is essential to formulate an appropriate cocktail vaccine. The recent evaluation of an inactivated cowdriosis vaccine in selected field sites in Africa has emphasized the need to conduct such studies on diversity (unpublished data). To do so, it appeared necessary to develop molecular diagnostic tests of improved sensitivity to detect and type *E. ruminantium* in hosts and vectors. On the basis of an existing PCR detection method,⁷ a nested PCR targeting the same portion of gene, pCS20, has been developed. A nested PCR to amplify the polymorphic *map1* gene was also developed for typing by restriction fragment length polymorphism (RFLP) or sequencing of the amplification fragment. The techniques were evaluated on blood, brain, and lungs of hosts as well as tick vectors before being used in molecular epidemiologic studies.

MATERIAL AND METHODS

Samples and DNA Extraction

The PCR methods were primarily developed using *E. ruminantium* DNA purified from *in vitro* cultures and then evaluated using ticks or biological samples from the ruminant hosts. In a first step, *Amblyomma variegatum* ticks fed as nymphs on febrile goats experimentally infected with *E. ruminantium* were used. The blood, brain, and lung samples from the same animals were also processed after death. After this first validation step, field ticks collected during epidemiologic studies on domestic ruminants in Guadeloupe (French West Indies) and Burkina Faso were tested. All samples, ticks and organs, were preserved either frozen at -20°C or in 70% ethanol.

DNA was extracted from ticks and host samples using the QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

pCS20 Nested PCR

The current PCR detection test using AB128 and AB129 primers has already proved to be highly specific.⁸ To avoid an extensive retesting of specificity, AB128 and AB129 were used as internal primers of the nested PCR. AB 128 was also used as the external forward primer, whereas a new primer, named AB130, was selected as reverse external primer. It was selected in a region without single nucleotide polymorphism (SNP) polymorphism after alignment of the corresponding genome fragment of three different strains. After preheating the DNA at 94°C for 3 min, the first

round of PCR with AB128 and AB130 primers was conducted using the following conditions: 35 cycles of a 45-sec denaturation at 94°C, a 45-sec annealing at 50°C, a 45-sec elongation at 72°C, and a final 10-min extension at 72°C. One microliter of pure or 1/10 dilution of the PCR product from the first round was submitted to a second round of PCR with AB128 and AB129 primers consisting of 35 cycles of a 45-sec denaturation at 94°C, a 45-sec annealing at 55°C, and 45 sec elongation at 72°C, followed by a 10-min extension step at 72°C.

map1 Nested PCR

The *map1* was amplified with the following primers:

- external forward (Map1NT) 5'-CTCGTAAGAAGTGCCTTAAT-3'
- external reverse (MapCT1) 5'-TTAAAATACAAACCTTCCTCC-3'
- internal forward (Map1LP) 5'-CTTGGTGTGTCTCTTTCTGA-3'
- internal reverse (Map1CT2) 5'-CCTTCCTCCAATTTCTATAACC-3'

The conditions for the first round of PCR using Map1NT and Map1CT1 primers were identical to those of the first round of the pCS20 nested PCR. One microliter of pure or 1/10 dilution of the PCR product from the first round was used as template in the second round of PCR consisting of 40 cycles of a 1-min denaturation at 94°C, a 1-min annealing at 55°C, and 1 min elongation at 72°C, followed by a 10-min extension at 72°C. Amplification products from all PCR reactions were visualized in 1.5% agarose gels.

RFLP of PCR Amplified map1 Genes

The amplification products obtained from the *map1* nested PCR procedures were digested with the restriction enzymes RsaI, NdeI, XbaI, and PstI. The fragments were separated on agarose and visualized under ultraviolet illumination.

Sequencing of map1 PCR Products

PCR products were extracted from low-melting agarose gels using the "gel extraction kit" (Eurobio, Les Ulis, France) following the manufacturer's recommendations and sent for sequencing to a commercial company (Genome Express, Grenoble, France).

Epidemiologic Studies

The epidemiologic studies aimed at describing the extent of strain diversity. This was done by the isolation of a range of strains originating from a limited geographical area for testing in cross-protection and genotyping studies. In Burkina Faso, the work was conducted in four villages that were separated by a distance of 15 to 40 km (Sara, Bekuy, Lamba and Bankouma). The ticks were collected on animals between October and December during the seasonal peak of *Amblyomma variegatum* nymphs. The resulting adults were fed on sheep, which developed hyperthermia. Blood from reacting sheep was used to isolate *E. ruminantium* in endothelial cells.

Afterwards, cross-protection studies were carried out with these isolates. After feeding on sheep during hyperthermia, engorged nymphs were also collected for typing *E. ruminantium* stocks. In Guadeloupe, 212 ticks (mainly adults) were collected on different herds all around the island and tested for infection by *E. ruminantium*. Positive ones were subsequently typed.

RESULTS

Sensitivity of the Nested PCR

Serial 10-fold dilutions of purified DNA showed a 2-log₁₀ improvement of the sensitivity for both pCS20 and *map1* nested PCR as compared to PCR (FIG. 1). This corresponds to an average detection limit of 6 and 60 *E. ruminantium* elementary bodies respectively for pCS20 and *map1* nested PCR. This difference of sensitivity was confirmed by the comparison of both nested PCR, which showed that 91% of 113 pCS20-positive DNA samples were also positive for *map1*. Conversely, a *map1*-positive reaction was never observed together with a pCS20-negative result. Thus, some weak pCS20-positive samples could not be amplified for *map1* and subsequent typing.

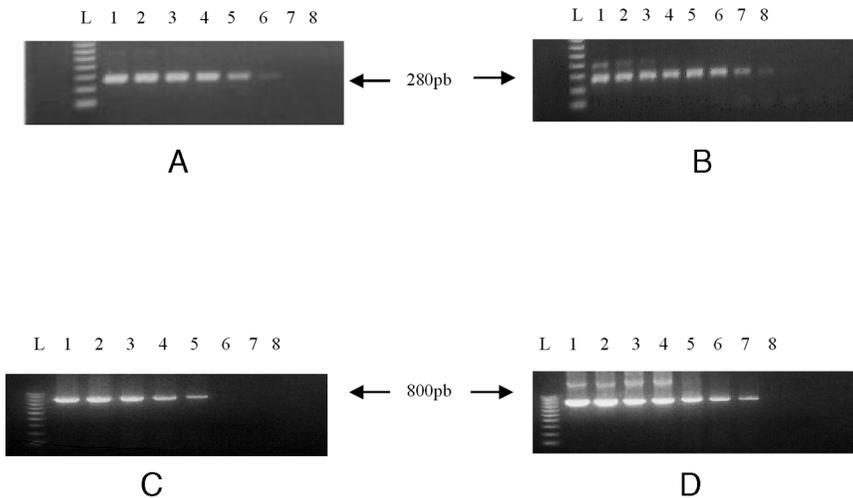


FIGURE 1. Detection limit of pCS20 and *map1* nested PCR. Nested PCR and PCR products from reactions with 10-fold serial dilutions of purified *E. ruminantium* DNA after agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The DNA ladder of 100 bp is shown in lane L. Lanes 1 to 8: serial tenfold dilution of *ER* DNA 6×10^7 to 0.6 estimated *E. ruminantium* elementary bodies. (A) pCS20 PCR. (B) pCS20 nested PCR. (C) *map1* PCR. (D) *map1* nested PCR.

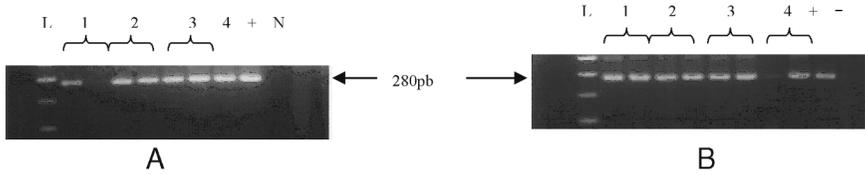


FIGURE 2. pCS20 nested PCR detection of *E. ruminantium* in fresh and frozen blood, lung, and brain samples from goats. (A) Agarose gel electrophoresis of pCS20 nested PCR products representative of reactions with fresh (left lane) and frozen blood (right lane) obtained from febrile reacting goats 1, 2, and 3. Only fresh blood was processed for the goat 4. N: fresh blood from a naive goat. (B) Nested PCR products from lung (left lane) and brain (right lane) samples from goats 1, 2, 3, and 4. +: Nested PCR products of positive *E. ruminantium* DNA. -: Nested PCR products of water. The DNA ladder of 100 bp is shown in lane L.

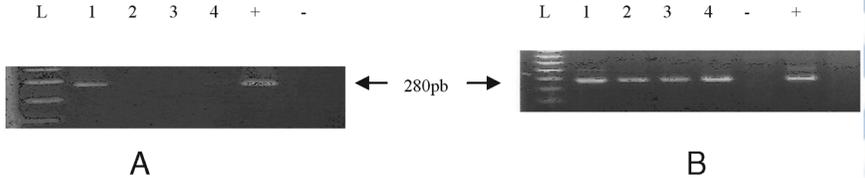


FIGURE 3. Detection of *E. ruminantium* in field ticks by pCS20 PCR and nested PCR. Agarose gel electrophoresis of PCR and nested PCR products representative of reactions. Samples from the same ticks (1, 2, 3, and 4) were processed by (A) PCR or (B) nested PCR. +: Positive reaction control PCR products. -: Negative reaction control PCR products.

Detection of E. ruminantium in the Ruminant Host

The nested PCR techniques were successfully used to detect *E. ruminantium* in the blood of reacting animals as well as brain and lung samples from animals dying from heartwater (FIG. 2). The nested PCR techniques significantly improved the sensitivity of detection in all organs tested, and detection was possible in frozen samples as well as samples preserved in 70% ethanol.

Detection of E. ruminantium in Ticks

The nested PCR techniques were first evaluated on ticks infected by engorgement on animals reacting after experimental inoculation. Ticks collected in the fields were processed afterwards. Here again, the sensitivity was increased (FIG. 3), and detection was possible both in fresh and ethanol-preserved ticks. The improvement of the detection limit by nested PCR provided a more accurate description of the epidemiologic situation. Indeed, the tick infection rate reached 36% ($N = 212$) by nested PCR, whereas it was evaluated around 1.7% ($N = 224$) by PCR.

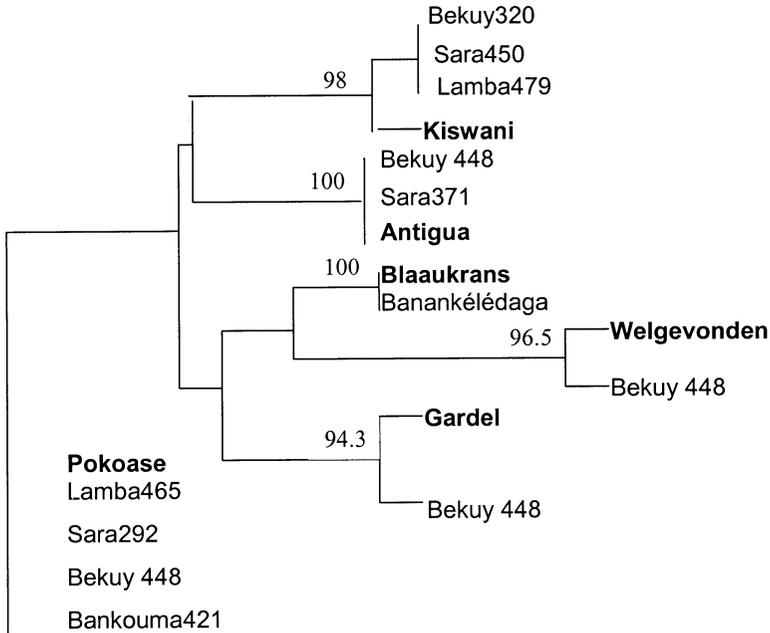


FIGURE 4. The *map1* genetic tree of Burkina Faso isolates. Numbers represent percentage of homology between isolates. Reference strains are indicated in **bold**.

Genetic Diversity in Burkina Faso and Guadeloupe

In Burkina Faso, 12 *E. ruminantium* stocks, from eight different herds distributed among four villages, were sequenced after *map1* nested PCR on *E. ruminantium*-positive tick DNA. As shown in FIGURE 4, which shows the *map1* genetic tree, there was a wide genetic diversity between Burkina Faso isolates. The *map1* genotypes present in Burkina Faso were identical to different strains distributed in all infected Africa and Caribbean countries, such as Pokoase (Ghana), Kiswani (Kenya), and Antigua (Caribbean island). One out of 12 stocks was a mix of four different strains, whereas all the other stocks had a single genotype. In Guadeloupe, DNA from nine *E. ruminantium*-positive ticks was sequenced. As in Burkina Faso, stocks from Guadeloupe were genotypically identical to several African and Caribbean strains. Moreover, only 3 out of 35 *E. ruminantium*-positive ticks had a mix of different genotypes as tested by RFLP or sequencing.

DISCUSSION

In this study, a nested PCR technique for the detection and typing (*map1* gene) of *E. ruminantium* was validated. A 2-Log₁₀ improvement of the sensitivity was obtained for each PCR target (pCS20 and *map1*) as compared to PCR. The detection

limit, found to be around six organisms for the pCS20 nested PCR, is similar to that obtained by another method based on PCR followed by Southern blotting of the pCS20 probe on the amplification fragment.⁷ However, the advantage of a nested PCR is that it does not necessitate the laborious hybridization step and can be easily automated for high-throughput analysis in epidemiologic studies. The *map1* nested PCR was 1-Log₁₀ less sensitive (a detection limit of around 60 organisms) than the pCS20 one. A positive *map1* result was always associated to a positive pCS20 result, confirming the high specificity of the latter. The *map1*-negative results were only observed associated with weak positive pCS20 signals from some field tick samples. However, 91% of pCS20 field-positive ticks gave a *map1* amplification product that could be used for genotyping, which is sufficient in molecular epidemiologic studies in which many samples are analyzed. Moreover, fresh samples, frozen samples, or samples preserved in 70% ethanol could be processed by nested PCR without any loss of signal intensity, confirming the possibility that *E. ruminantium* nested PCR could be used as a new molecular tool for epidemiologic studies.

With these methods, recent studies associated with large-scale field vaccination of the inactivated heartwater vaccine have shown that in a very limited geographical area at least five different *map1* genotypes were present. The breakthrough of immunity could be explained by the diversity as confirmed by cross-protection trials. However, although *map1* is a stable molecular marker useful for tracing strains, clusters obtained in the *map1* genetic distance tree are not predictors of cross-protection between isolates. This emphasizes the need to carry out epidemiologic studies on vaccination trial sites. Moreover, extensive mapping of genotype diversity associated with additional cross-protection studies appears essential to formulate appropriate vaccines.

The recent completion of two full sequences of *E. ruminantium* genomes (Gardel and Welgevonden strains) giving access to polymorphic genes of the pathogen open the way to the identification of predictors of cross-protection and, ultimately, to the development of protective vaccine candidate genes.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the European Union fund of the International Scientific Cooperation Projects (INCO) project contract number ICA4-CT-2000-30026.

REFERENCES

1. OBEREM, P.T. & J.D. BEZUIDENHOUT. 1987. Heartwater in hosts other than domestic ruminants. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 271–275.
2. PEREZ, J.M., D. MARTINEZ, A. DEBUS, *et al.* 1997. Detection of genomic polymorphisms among isolates of the intracellular bacterium *Cowdria ruminantium* by random amplified polymorphic DNA and Southern blotting. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 73–79.
3. REDDY, G.R., C.R. SULSONA, R.H. HARRISON, *et al.* 1996. Sequence heterogeneity of the major antigenic protein 1 genes from *Cowdria ruminantium* isolates from different geographical areas. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**: 417–422.
4. DU PLESSIS, J.L. & L. VAN GAS. 1989. Immunity of tick-exposed seronegative and seropositive small stock challenged with two stocks of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **56**: 185–188.

5. UILENBERG, G., E. CAMUS & N. BARRÉ. 1985. Quelques observations sur une souche de *Cowdria ruminantium* isolée en Guadeloupe (Antilles Françaises). *Rev. Elev. Med. Vet. Trop.* **38**(1): 34–42.
6. JONGEJAN, F., & M.J.C. THIELEMANS. 1991. Antigenic diversity of *Cowdria ruminantium* isolates determined by cross-immunity. *Res. Vet. Sci.* **51**: 24–28.
7. PETER, T.F., A.F. BARBET, A.R.R. ALLEMAN, *et al.* 2000. Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1539–1544.
8. PETER, T.F., S.L. DEEM, A.F. BARBET, *et al.* 1995. Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of *Cowdria ruminantium* infection in *Amblyomma* ticks not detected by DNA probe. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 166–172.

3.2 Cas des trois îles des Caraïbes : Guadeloupe, Marie Galante et Antigua (Article 2 ci-après)

Tiques *Amblyomma variegatum* et cowdriose dans trois îles des Caraïbes : Infection des tiques et diversité génétique d'*Ehrlichia ruminantium* dans les élevages bovins.

Vachiéry N., Jeffery H., Pegram R., Aprelon R., Pinarello V., Kandassamy R.L.Y., **Raliniaina M.**, Molia S., Savage H., Alexander R., Frebling M., Martinez D. and Lefrançois T. 2008 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1149**: 191–195

Résumé d'article

Cet article rapporte les résultats d'une étude épidémiologique réalisée de 2003 à 2005 dans trois îles des Caraïbes, Guadeloupe, Marie Galante, et Antigua, où la tique *Amblyomma variegatum* et la cowdriose sont présentes. Les tiques *A. variegatum* ont été introduites dans la région avec le bétail venu d'Afrique avant le 19^{ème} siècle. Depuis l'abolition de la traite des esclaves vers 1850 dans les Caraïbes, aucune autre introduction n'a été répertoriée. Pour lutter contre cette tique et les maladies transmises ou associées, un programme d'éradication de la tique a été initié dans les îles anglophones dont Antigua depuis 1995 (CAP, Caribbean *Amblyomma* Program), et un programme de contrôle de la tique dans les îles francophones (Guadeloupe et Martinique) a été mené en parallèle. Des enquêtes ont été menées pour déterminer les prévalences actuelles d'infestations des bovins par les tiques *A. variegatum* et plus largement des infections des tiques par *Ehrlichia ruminantium* (ER). Sur les tiques positives pour ER le degré de diversité génétique des souches a été évalué.

Un échantillonnage de 306 élevages de bovins tirés au sort, a été visité en 2003 en Guadeloupe et à Marie Galante et 195 à Marie Galante en 2005. Lors des visites, les tiques à différents stades de développement (nymphe et adultes mâles et femelles) ont été identifiées puis comptées sur chaque individu composant le troupeau. Pour Antigua, les moyennes de prévalences d'infestations trimestrielles entre 2003 et 2005 ont été évaluées.

Les résultats montrent que les troupeaux à Marie Galante sont plus infestés qu'en Guadeloupe, les taux d'infestation moyens des élevages sont de 79,1% (IC à 95% : 67,4-88) et 73,8% (IC à 95% : 67,8-79,8) respectivement en 2003 et 2005 pour Marie Galante, soit environ le double de celui de la Guadeloupe, 35,6% (IC à 95% : 29,8-41,4). En Guadeloupe, les prévalences d'infestation des troupeaux varient d'une région

à une autre. L'hétérogénéité des niveaux d'infestation en fonction des zones pourrait être attribuée à des différences liées aux facteurs d'environnement, au biotope, aux races des animaux et aux pratiques d'élevage. Au niveau de la prévalence d'infestation individuelle estimée sur l'ensemble des effectifs des élevages, le taux moyen d'infestation des animaux est de 44% (IC à 95% : 39,4-48,8) à Marie Galante contre 14% (IC à 95% : 12,5-15,5) en Guadeloupe soit trois fois plus. Ces différences entre la Guadeloupe continentale et Marie Galante pourraient être dues à des systèmes d'élevage différents dans les deux îles. Pour la Guadeloupe, le système d'élevage est un élevage au piquet alors qu'à Marie Galante l'élevage est traditionnel avec mélange des troupeaux autour des points d'eau ce qui favorise la contamination. Les risques de réinfestation des pâturages semblent aussi plus grands à Marie Galante avec 17,9% (IC à 95% : 12,8-23) de prévalence de tiques femelles gorgées au niveau troupeau contre 10,5% (IC à 95% : 6,6-14,4) en Guadeloupe.

La situation est très différente à Antigua avec 2,2% de taux d'infestation de troupeaux et 5,5% au niveau individuel, ce qui est faible en comparaison avec la Guadeloupe. Les conditions environnementales, l'effectif réduit du cheptel et les impacts de la campagne d'éradication d'*A. variegatum* seraient les facteurs qui ont contribué à ce niveau de faible infestation des élevages par les tiques à Antigua.

La PCR semi - nichée *pCS20* a été utilisée pour la détection d'*ER* dans les tiques collectées. Les taux d'infection ont ainsi été déterminés, au niveau de la tique, au niveau des bovins et des élevages. Ils sont élevés en Guadeloupe et à Marie Galante par rapport à Antigua. Pour l'année 2005, le taux d'infection des tiques est de 19,1% (IC à 95% : 12,6-25,6) à Marie Galante avec 24 élevages sur 72 infectés et de 5,8% (IC à 95% : 1,9-9,7) à Antigua avec 5 élevages sur 19 infectés.

Etant donné les prévalences d'infestations par *A. variegatum*, les taux d'infection des tiques par *ER* élevés, et une répartition homogène des prévalences d'infestation sur tout le territoire, les risques de transmission de la cowdriose sont particulièrement grands en Guadeloupe et à Marie Galante. Il ressort d'ailleurs des données statistiques concernant les visites des vétérinaires dans les élevages pour ces deux îles que la cowdriose représente le tiers des pathologies diagnostiquées et le quart des mortalités observées chez les bovins.

Sur les tiques positives pour *ER*, un typage utilisant la PCR nichée *map1* associée soit à une RFLP ou à un séquençage a été réalisé. Une grande diversité génétique de souches d'*ER* est observée comme précédemment lors des études réalisées au Burkina Faso. Sur

les 8 allèles *map1* identifiés pour la Guadeloupe et Marie Galante, 4 sont présents dans les deux îles. Quatre allèles *map1* sont présents sur une même commune. A Antigua sur les trois allèles identifiés, 2 sont communs aux trois îles. Il est certain que le nombre d'allèles augmenterait en analysant un nombre plus important de tiques dans chaque île. Deux allèles nouveaux, un en Guadeloupe et un à Marie Galante, sont également observés, les sept autres, pour les trois îles, étant des allèles déjà connus d'Afrique. Ces résultats suggèrent l'hypothèse d'une introduction simultanée des différentes souches dans les Caraïbes sachant qu'aucune introduction de bétail et donc du pathogène *ER* n'a été effectuée après le 19^{ème} siècle.

Amblyomma variegatum Ticks and Heartwater on Three Caribbean Islands

Tick Infection and *Ehrlichia ruminantium* Genetic Diversity in Bovine Herds

Nathalie Vachiéry,^a Helena Jeffery,^b Rupert Pegram,^b Rosalie Aprelon,^a Valérie Pinarello,^a Ranleen Lloyd Yane Kandassamy,^a Modestine Raliniaina,^c Sophie Molia,^d Hazel Savage,^b Randolph Alexander,^b Mathieu Frebling,^a Dominique Martinez,^d and Thierry Lefrançois^a

^aCentre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Petit Bourg, Guadeloupe, France

^bCaribbean *Amblyomma* Programme and vet services, St. John's, Antigua

^cCentre National Malgache de Recherches Appliquées au Développement Rural, Antananarivo, Madagascar

^dCentre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France

Amblyomma variegatum tick infestation, tick infection by *Ehrlichia ruminantium* (ER), and ER genetic diversity were studied in the Caribbean Islands of Guadeloupe, Marie-Galante, and Antigua between 2003 and 2005. Nested PCR for *pCS20* was used to detect ER, while ER strains were characterized by sequencing or by restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of *map-1* PCR products. In 2003 in Guadeloupe, the prevalence of tick-infested herds was 35.6%. In Marie-Galante 79.1% of herds in 2003 and 73.8% in 2005 were infested, while only an average of 2.2% of the herds were infected in Antigua between this same period. In Marie-Galante, 19.1% of ticks were ER positive, and ER-infected ticks were found in 33.3% of the herds. In Antigua only 5.8% of the ticks were ER positive. High ER tick infection rate combined with a very high level of tick infestation highlight the risk of heartwater in Marie-Galante and Guadeloupe more than in Antigua. The three islands still represent a reservoir for tick and heartwater in the Caribbean. Nine different African and Caribbean *map-1* ER genotypes were identified. This diversity was observed even in restricted areas, and identical *map-1* genotypes were observed on all three islands. This high genetic diversity of ER strains suggests that there was a simultaneous introduction of several strains from African countries into the Caribbean region.

Key words: *Amblyomma variegatum*; *Ehrlichia ruminantium*; heartwater; Caribbean

Introduction

Amblyomma variegatum ticks originated from Africa, infested Guadeloupe, Marie-Galante,

and Antigua in the 19th century, and had spread to nearly all the other islands of the Lesser Antilles by the second half of the 20th century.¹ *Amblyomma* tick species transmit *Ehrlichia ruminantium* (ER). This pathogen, which is responsible for heartwater, is present in sub-Saharan Africa, Madagascar, and the Caribbean Islands, as demonstrated in Guadeloupe and Antigua. The presence of heartwater

Address for correspondence: Nathalie Vachiéry, UMR15 CIRAD-INRA, CIRAD Guadeloupe, Domaine Duclos, Prise d'Eau, 97170 Petit Bourg, Guadeloupe, France. Voice: +590-590255442; fax: 590-590940396. Nathalie.vachiery@cirad.fr

in the Caribbean Islands constitutes a threat to livestock in North and South America where other *Amblyomma* species are present.² Both ticks and heartwater have an important economic impact and break down livestock production.

An eradication program of *A. variegatum* ticks started in 1995 in the English-speaking islands of the Lesser Antilles (Caribbean *Amblyomma* Program [CAP]), while a control program was set up in the French islands (Guadeloupe and Martinique). Several islands were declared provisionally free of *A. variegatum* ticks, but others are still infested, especially Guadeloupe, Marie-Galante, and Antigua.³ Control of heartwater through vaccination is not particularly successful because of the high diversity of the pathogen.⁴ It is therefore important to evaluate the diversity of *ER* in the field in order to design an appropriate vaccine.

A. variegatum tick infestation, tick infection by *ER*, and *ER* genetic diversity were measured in the most infested Caribbean islands (Guadeloupe, Marie-Galante, and Antigua) between 2003 and 2005 in order to evaluate their respective potential role as a reservoir for the spreading of ticks and disease in the Caribbean.

Materials and Methods

Tick Infestation

The level of tick infestation was evaluated through two statistically representative surveys in Guadeloupe and Marie-Galante. The first survey was performed between May and August 2003 in both Guadeloupe and Marie-Galante. An initial total of 545 herds were randomly selected out of the 8025 herds of the EDE (Etablissement Départemental de l'élevage) database, and, because of inaccuracies in the database, a final total of 306 herds were studied. The second survey was performed between May and July 2005 in Marie-Galante. An initial total of 225 herds were randomly selected out of the 1885 herds in the EDE database, and 195 herds were studied.

For both surveys, all studied cattle were individually observed for tick count and the tick stage and sex were determined.

In Antigua, an average infestation level was evaluated by trimester between 2003 and 2005 from the TickINFO database developed within the CAP. This database contains results of active surveillance of *A. variegatum* by vet services and passive surveillance with notifications sent by farmers. This surveillance system, which has been in place for many years in Antigua, gives accurate evaluation of the level of infestation.

ER Infection and Typing in Ticks

In 2003 in Guadeloupe and Marie-Galante, 212 ticks were collected on 60 cattle from 35 herds. During the 2005 study in Marie-Galante, one tick per cattle was collected on 136 cattle coming from 72 herds. These ticks were analyzed by nested PCR to detect and type *ER*. In Antigua, 121 ticks were collected for *ER* detection and typing from November 2004 to February 2005; these came from 19 herds distributed in four out of six parishes. The detection of *ER* was performed using nested PCR for a fragment of the *pCS20* gene, as previously described.⁵ The target gene, which is specific for *ER*, is conserved between different strains, and the sensitivity of this PCR allows a detection of six copies of *ER*.⁵ *ER* strains were characterized by sequencing of the *map-1* PCR product obtained from nested *map-1* PCR, as previously described,⁵ or by restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of *map-1* PCR products. The *map-1* sequences were compared to known *ER* strains from different African and Caribbean countries.

Results

Tick Infestation

In Guadeloupe in 2003, the prevalence of tick-infested herds was 35.6% (85/239). The most infested areas were north of Basse Terre (63.6%), north of Grande Terre (50.8%), and

TABLE 1. Tick Infestation Levels in Guadeloupe and Marie-Galante

	Guadeloupe 2003	Marie-Galante 2003	Marie-Galante 2005
Herd prevalence	35.6% (85/239)	79.1% (53/67)	73.8% (144/195)
Prevalence of herds with engorged female tick	10.5% (25/239)	11.9% (8/67)	17.9% (35/195)
Individual prevalence of cattle	14% (284/2024)	44% (210/477)	42.3% (409/966)
Average number of ticks on infested cattle	6.1	6.7	11.5

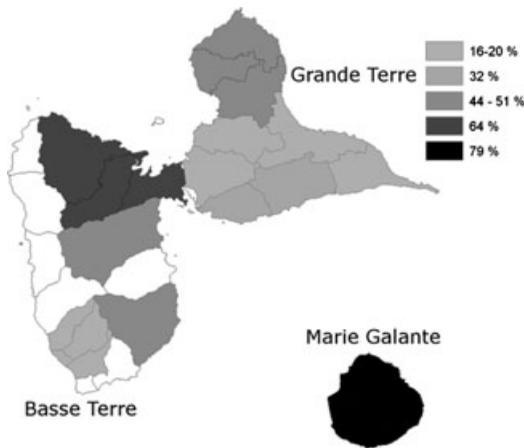


Figure 1. Prevalence of tick-infested herds in Guadeloupe and Marie-Galante

east of Basse Terre (44.8%), followed by south of Grande Terre (32.4%). The less-infested areas were southwest of Basse Terre and east and west of Grande Terre with less than 20% (Fig. 1). The prevalence of infestation per herd, the individual prevalence, and the percentage of herds with engorged female ticks are shown in Table 1 for Guadeloupe and Marie-Galante. In Guadeloupe, engorged female ticks were present in 10.5% of the herds. Individual cattle prevalence was 14.0%. The average number of ticks per infested animal was 6.1. In Marie-Galante in 2003 and 2005, the prevalence of tick-infested herds was 79.1% and 73.8%, respectively. Engorged female ticks were present in 11.9% and 17.9% of the herds, respectively. Individual cattle prevalence was 44.0% and 42.3%, respectively. The average number of ticks per infested animal was 6.7 and 11.5, respectively. In Antigua between 2003 and 2005, the average prevalence of tick-infested herds and tick-infested cattle was $2.2\% \pm 2.9$ and

TABLE 2. *Ehrlichia ruminantium*-infected Herds and Ticks in Antigua as Detected by *pCS20* Nested PCR

Parish	<i>pCS20</i> -positive ticks	<i>ER</i> -positive herds
St. Georges	2/12 (16.7%)	1/3
St. John's	1/11 (9.1%)	1/3
St. Mary	3/82 (3.7%)	2/11
St. Peter	1/16 (6.2%)	1/2
Total	7/121 (5.8%)	5/19

$5.5\% \pm 9$, respectively. In eight of the 12 trimesters, these infestations were below 1.5% and 2.4%, respectively. The average number of ticks per animal was 1.7.

ER Infection in Ticks

In 2003 in Guadeloupe, 51 ticks were found to be *pCS20* positive out of 139 tested (36.7%). These 51 ticks originated from 24 cattle from 14 herds; in Marie-Galante 26 ticks were found to be *pCS20* positive out of 73 tested (35.6%). These 26 ticks originated from 14 cattle from 11 herds. In 2005 in Marie-Galante, 19.1% of ticks were *ER* positive (26/136), and *ER*-infected ticks were found in 33.3% (24/72) of the herds. *ER*-positive ticks were found in all the areas of Guadeloupe and Marie-Galante (data not shown). In Antigua 5.8% of ticks were *ER*-positive, and infected ticks were found in five out of 19 herds within the parishes studied (Table 2).

ER Typing in Ticks

In Guadeloupe and in Marie-Galante in 2003–2005, 23 *pCS20*-positive ticks were found

TABLE 3. *Ehrlichia ruminantium map-1* Genotypes Identified in Guadeloupe, Marie-Galante, and Antigua

<i>map-1</i> genotype	Senegal	Gardel	Antigua	Mara	Kiswani	Banankélédaya	Mali	Unknown 1	Unknown 2
Guadeloupe									
Baie Mahault	x	x	x					x	
Sainte Anne		x							
Petit Bourg		x			x			x	
Port Louis		x							
Lamentin				x					
Marie-Galante									
Grand Bourg	x	x	x	x					
Capesterre			x						x
Saint Louis			x			x			
Antigua									
St. Georges			x						
St. Mary	x						x		

to be also positive for *map-1* nested PCR. These 23 ticks coming from eight parishes were typed for *ER* by sequencing or RFLP (Table 3). Eight different *map-1 ER* genotypes were identified: Senegal (from Senegal), Antigua (from Antigua), Gardel (from Guadeloupe), Kiswani (from Kenya), Banankélédaya (from Burkina Faso), Mara (from South Africa), and two unknown *map-1* genotypes, including one with 98% identity with Banankélédaya. One to four different *map-1* genotypes were observed by parish. In Antigua three *map-1* genotypes were identified. The Antigua *map-1* genotype was found in a tick from St. Georges. Senegal and Mali *map-1* genotypes were found in one tick from St. Mary. Senegal and Antigua *map-1* genotypes were observed on all three islands.

Discussion

For Guadeloupe and Marie-Galante, the level of tick infestation was quite high; prevalence of infested herds was between 35 and 79%, individual prevalence was between 14 and 44%, and cattle were highly infested with six to 11 ticks per animal. Moreover, the pres-

ence of many herds with engorged female ticks (10–18%) constitutes a reservoir for permanent reinfestation of the pasture. Marie-Galante was shown to be much more infested than Guadeloupe both for infestation of herds (twice more) and individual prevalence (three times more). Marie-Galante is known for its very traditional farming system that includes mixing of several herds at shared watering places, which could explain permanent cross contamination between herds. In Guadeloupe, a heterogeneity of the infestation level was observed in the different areas, which could be related to differences in climate, biotope, and breeding types. This relationship warrants further study. In Antigua the situation is more favorable with a much lower level of herd (2.2%) and cattle infestation (5.5%) than in Guadeloupe or Marie-Galante. The number of ticks per infested cattle was also at least three times lower than in Guadeloupe and Marie-Galante. The lower infestation level in Antigua could be related to several factors: (1) There are some differences in climate and environmental conditions between Antigua and Guadeloupe/Marie-Galante. (2) The number of cattle in Antigua has always been much lower than in Guadeloupe (about 10 times less) and is decreasing. (3) The eradication campaign of the

CAP has led to a decrease in infestation prevalence.³ The three studied islands constitute a reservoir for spreading *Amblyomma* ticks to other islands of the Caribbean, in particular through cattle egrets.⁶ This can be a problem for the success of the CAP eradication campaign, especially in surrounding islands that have been declared provisionally free of *Amblyomma* ticks (Dominica, St. Lucia, Anguilla, Barbados, St. Vincent).³

For Guadeloupe and Marie-Galante, whatever the parameter checked (percentage of herds with *ER*-positive ticks, percentage of cattle with *ER*-positive ticks, or percentage of *ER*-infected ticks on the island), the level of *ER* infection was very high. The overall *ER* infection rate of ticks was much higher in Guadeloupe and Marie-Galante (19–36.7%) than in Antigua (5.8%).

High *ER* tick infection rate combined with a very high level of tick infestation highlight the risk of heartwater in Guadeloupe and Marie-Galante compared to Antigua. These results are in accordance with the observed clinical cases of heartwater, which are currently reported in Guadeloupe and Marie-Galante but not in Antigua. In Guadeloupe and Marie-Galante, visits of veterinarians to 1700 herds in 2005 highlighted that farmers consider that about one-third of cattle diseases and one-fourth of cattle mortality are related to heartwater (Guadeloupe Veterinary Services, personal communication).

A high genetic diversity of *ER* strains was observed even within parishes of Guadeloupe, Marie-Galante, and Antigua. This high diversity in a restricted area was already observed in Burkina Faso.⁵ Four *map-1* genotypes were observed in both Guadeloupe and Marie-Galante. Two *map-1* genotypes were observed on all three islands. We suspect that other identical *map-1* genotypes could be found if more ticks were tested. Out of the nine *map-1* genotypes detected, seven were isolated in Africa. Considering that there was no intro-

duction of cattle from Africa since the 19th century,¹ the observed diversity suggests that there was a simultaneous introduction of several strains from African countries in the Caribbean region at that time. This diversity of *ER* strains in the Caribbean Islands represents a major challenge for the control of heartwater by vaccination⁴ and should be further studied by other genetic markers.

Acknowledgments

This work was supported by the European Commission International Cooperation with Developing Countries (INCO-DC or DEV) 4A-CT-2000-30026, INCO-DEV FP6-03713, and veterinary services of Guadeloupe.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Maillard, J.C. & N. Maillard. 1998. Historique du peuplement bovin et de l'introduction de la tique «*Amblyomma variegatum*» dans les îles françaises des Antilles: synthèse bibliographique. *Ethnozootecnie* **61**: 19–35.
2. Barré, N., G. Uilenberg, P.C. Morel & E. Camus. 1987. Danger of introduction heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* **54**: 405–417.
3. Report of the 12th meeting of the *Amblyomma* Council Programme. <http://www.caribvet.net/upload/ReportAPC2005.pdf>.
4. Mahan, S.M., G.E. Smith, D. Kumbula, et al. 2001. Reduction in mortality from heartwater in cattle, sheep and goats exposed to field challenge using inactivated vaccine. *Vet. Parasitol.* **97**: 295–308.
5. Martinez, D., N. Vachiéry, F. Stachurski, et al. 2005. Nested PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*; use in genetic diversity analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1026**: 106–113.
6. Barré, N., G. Garris & E. Camus. 1995. Propagation of the tick *Amblyomma variegatum* in the Caribbean. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **14**: 841–855.

3.3 Cas du Moyen Ouest Malgache : Région du Bongolava

L'enquête a été effectuée sur des bovins de la station de recherche de Kianjasoa et les troupeaux des éleveurs au nord de la station, pendant la période d'abondance des tiques *A. variegatum* mâles au tout début de la saison des pluies. La conduite des troupeaux à la station comme chez les éleveurs est la même : ils sont au pâturage dans la journée et rentrés le soir. Il faut noter que tous les bovins des éleveurs comme ceux de la station parcourent la même aire de pâturage, sauf pour les animaux d'Ankadinondry. Les taux d'infestation observés sont respectivement de 100% et de 68,9% (IC à 95% : 62,4-75,4) au niveau troupeaux et bovin individuel. Le taux d'infection des tiques est de 11,9% (IC à 95% : 5,7-18,1). Sur les 12 tiques infectées, 3 sont positives en *map1*. Les analyses de profils RFLP ainsi que l'arbre donné par l'analyse des distances génétiques des séquences nucléotidiques des 3 souches *E. ruminantium* identifiées, KJSF2, PierP1 et RZFM1, révèlent l'existence de trois allèles *map1*. Deux sur les trois souches présentent des allèles *map1* nouveaux alors que le troisième correspond à l'allèle porté par la souche Antigua. L'allèle porté par la souche KJSF2 présente un pourcentage d'identité de séquences de nucléotides de 95 à 96% par rapport aux souches de références Gardel (Guadeloupe), Lutale (Zambie) et Um Banein (Soudan) et la souche Pier P1 de 96 à 97% par rapport à Mara 87/7 (Afrique du Sud), Crystal Spring et Highway (Zimbabwe). Le polymorphisme de ces génotypes inconnus consiste en des substitutions de nucléotides dans la première région variable du gène *map1* pour KJSF2 et de substitutions tout le long de la séquence et d'insertions pour PierP1. Les premiers résultats obtenus dans une zone aussi restreinte sont en accord avec les études faites au Burkina Faso et dans les Caraïbes.

Notre implication dans les deux premiers articles composants de la thèse

Les encourageants résultats préliminaires de l'étude de la diversité génétique des souches par typage direct dans les tiques sans passer par des isolements sur cultures cellulaires nous ont poussés à poursuivre les travaux déjà commencés dans le cadre de notre mémoire de stage en DEA de Parasitologie en 2002. Toutefois, des mises au point d'outils plus performants s'avéraient indispensables et ont été réalisées afin d'augmenter les rendements de l'extraction ainsi que la sensibilité du test de screening

des tiques infectées pour une meilleure identification des souches d'*E. ruminantium* en petites quantités dans l'extrait total d'ADN de la tique.

Ma contribution dans le premier article (Martinez et al, 2004) porte alors sur trois points :

- L'identification des souches d'*E. ruminantium* a été effectuée dans les tiques *A. variegatum* collectées sur des bovins et conservées dans l'éthanol à 70% et une mise au point de protocole d'extraction a été nécessaire. Elle a consisté en une élimination de l'éthanol par un lavage individuel de chaque tique, 5 lavages avec du PBS stérile à 1% comprenant 5 minutes de trempage chacun. De plus, le temps d'incubation pour la lyse des cellules durant une nuit entière, tout à fait recommandée dans le protocole d'extraction relatif au tissu du kit QIAamp DNA Mini, a été adopté après des essais d'optimisation ; ce qui a permis d'avoir un meilleur rendement en ADN.
- L'optimisation des conditions d'amplification des deux PCRs nichées, *pCS20* et *map1*, pour la détection et le typage de la rickettsie afin d'améliorer tout particulièrement la sensibilité des deux tests, puisque les paires d'amorces utilisés ultérieurement dans les PCR simples sont spécifiques des séquences de gènes ciblés.
- L'analyse des tiques collectées sur des bovins en Guadeloupe et à Marie Galante, au Sénégal et à Madagascar. Les résultats concernant les souches identifiées dans notre première zone d'étude (Guadeloupe et Marie Galante en 2003) ont été abordés de manière globale dans le premier article.

Concernant le deuxième article de la thèse (Vachiéry et al, 2008), l'exploitation en détails faite sur les mêmes résultats d'analyses que précédemment a permis d'évaluer l'étendue de la diversité génétique en Guadeloupe et à Marie Galante en utilisant le polymorphisme du gène marqueur *map1*.

Enfin, les souches de Guadeloupe, de Marie Galante, du Sénégal et de Madagascar dont l'amplification du gène *map1* a été possible, et quelques unes de celles du Burkina Faso sur lesquelles nous avons travaillées, ont été incluses dans notre étude de caractérisation de souches ou isolats utilisant ce gène.

**Chapitre 4 – Etude de la diversité génétique
d'*E .ruminantium* : apport de l'étude
de plusieurs gènes *map***

4.1 Des marqueurs polymorphes pour la caractérisation de la diversité (Article 3 ci-après)

Caractérisation de la diversité génétique d'*Ehrlichia ruminantium* en utilisant la famille multigénique *map*

Raliniaina M, Meyer D, Pinarello V, Sheikboudou C, Emboulé L, Kandassamy Y, Adakal H, Stachurski F, Martinez D, Lefrançois T and Vachiéry N. *Vet Parasitol*, 2010. **167** 187–195

Résumé d'article

Ehrlichia ruminantium (*ER*), bactérie intracellulaire obligatoire transmise par des tiques du genre *Amblyomma*, est l'agent pathogène responsable de la cowdriose (heartwater) chez les ruminants domestiques et sauvages en Afrique subsaharienne, dans les Iles Caraïbes et les Iles de l'Océan Indien (Madagascar, Les Comores, La Réunion, Les Mascareignes et Maurice).

La rickettsie infecte différents types de cellules, les neutrophiles et les cellules réticulo-endothéliales chez l'hôte mammifères, les cellules épithéliales de l'intestin et les acini des glandes salivaires chez le vecteur tique. Seize protéines de la membrane externe d'*ER* sont codées par une famille multigénique *map* (major antigenic protein). L'un de ces gènes, le gène *map1* qui présente un polymorphisme de séquences dans trois régions hypervariables, s'est révélé être un bon marqueur pour étudier de la diversité génétique d'*ER* dans des zones restreintes. L'existence d'une grande diversité génétique des souches d'*ER* présentes sur le terrain est un obstacle majeur à l'élaboration de vaccins efficaces.

Le but de cette étude est de caractériser la diversité génétique de souches d'*ER* isolées en Afrique, dans les Caraïbes et à Madagascar. Cette étude sur trois zones où la dynamique d'introduction du pathogène est différente devrait donner des indications sur l'évolution des souches. Ainsi, au niveau du continent africain, un brassage permanent du bétail et donc des souches est constaté, alors qu'au niveau des îles des Caraïbes aucune introduction de souches n'a eu lieu depuis le 19^{ème} siècle. Madagascar se trouve être dans une situation intermédiaire par rapport aux deux autres zones géographiques précédemment citées avec des introductions de bétail vraisemblablement vers l'an 700 de notre ère et de manière certaine dans la première moitié du 20^{ème} siècle. Des analyses

phylogénétiques ont été effectuées sur les séquences protéiques de 6 gènes polymorphes de la famille multigénique *map* : *map1*, *map1-2*, *map1-5*, *map1-6*, *map1-14* et *map1+1*. La caractérisation génétique portant sur la protéine MAP1 de 80 isolats a montré que les mêmes allèles que dans les souches de référence (Sénégal/Pokoase, Omatjenne, Gardel/Lutale, Burkian Faso/Blaukraans, Mali/Mara etc..) sont présents à l'échelle du village, de la région et du continent. Au cours de cette étude, il est confirmé à partir d'un grand nombre d'isolats qu'il n'existe pas de relation stricte entre les allèles observés et l'origine géographique des souches. Cependant, les séquences MAP1 présentent un polymorphisme fort et permettent de caractériser la diversité génétique locale des souches d'*ER* mais également pour détecter de nouveaux allèles. Des allèles de séquences inconnues ont été en effet identifiés en Guadeloupe, à Marie Galante, à Madagascar (2 sur les 3 souches typées) mais aussi au Sénégal et au Burkina Faso. Le positionnement de ces allèles dans l'arbre MAP1 ne révèle pas de spécificité liée à leur origine géographique. Une approche utilisant la MLST (Multilocus Sequence Typing) devrait permettre une meilleure compréhension de la structuration des isolats en clones et de l'histoire évolutive de ces clones.

Pour Madagascar, l'identification de 2 nouveaux allèles MAP1 sur 3 isolats typés traduit probablement une divergence plus marquée par rapport aux populations d'Afrique et qui mérite d'être étayée par des analyses plus poussées. En effet la caractérisation des allèles présents sur un plus grand nombre d'isolats de Madagascar et des îles de l'Océan Indien est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Comme pour le génotype au locus MAP1, la caractérisation génétique basée sur les séquences des 5 autres MAP pour 11 à 15 isolats d'Afrique et de Guadeloupe montre qu'il n'y a pas de liaison stricte entre génotypes aux différents locus MAP et l'origine géographique. De plus, nous ne détectons pas une différence flagrante entre la situation des Caraïbes (introduction ponctuelle) et la situation africaine (introduction continue) sur l'évolution de la famille *map*. Ceci peut s'expliquer par le choix des gènes neutres.

Pour les cinq gènes *map*, *map1+1* et *map1-14* situés aux extrémités, et *map1-2*, *map1-5* et *map1-6* au centre du locus de la famille multigénique, on constate que les topologies des arbres générés diffèrent selon les protéines MAP considérées : pour un génotype MAP1 donné, les génotypes aux autres locus MAP peuvent être différents. Les résultats montrent également qu'à l'exception de l'arbre MAP1-2 et MAP1+1, les groupes Welgevonden (Afrique du Sud) et Gardel (Guadeloupe) presque toujours associés en un seul clade, sont plus éloignés génétiquement du groupe Sénégal (Afrique de l'Ouest).

Ainsi, les résultats suggèrent que les 6 gènes étudiés, en affichant différents génotypes, évoluent de manière différente au sein de la famille multigénique. L'organisation des gènes de la famille *map* en opéron où chaque gène est régulé de manière différentielle en fonction de l'environnement cellulaire hôte - vecteur a été déjà démontrée. Le différentiel d'expression au niveau protéique a aussi été montré *in vitro* en cellules de tiques et en cellules de mammifères. Ces différentiels d'expression pourraient être associés à des pressions de sélection différentes des membres de la famille MAP. Les analyses de la distribution des mutations silencieuses ou non entre les souches Gardel et Welgevonden montrent que seuls les gènes *map1* et *map1-13* sont sous une forte pression de sélection stabilisatrice, l'essentiel des mutations étant des substitutions synonymes, indiquant une nécessité pour les paralogues *map* de garder leur forme originale et par conséquent leur fonction.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'origine de cette diversité au sein de la famille multigénique : 1) les gènes proviennent de la duplication d'un gène ancestral et ont évolué indépendamment les uns des autres. La possibilité de mutation des gènes neutres permettant de s'adapter à un environnement a été déjà prouvée théoriquement et expérimentalement, le but étant de garder la même fonction et structure originelle avantageuse de la protéine ; 2) des événements de recombinaison homologue probablement peu fréquents, permettent la divergence entre les histoires évolutives des différents locus. L'ensemble de nos résultats suggère que la deuxième hypothèse est la plus vraisemblable.



Mining the genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* using *map* genes family

Modestine Raliniaina^{a,b,1}, Damien F. Meyer^{b,1,*}, Valérie Pinarello^b,
Christian Sheikboudou^b, Loïc Emboulé^b, Yane Kandassamy^b, Hassane Adakal^d,
Frédéric Stachurski^{c,d}, Dominique Martinez^c, Thierry Lefrançois^b, Nathalie Vachiéry^{b,*}

^a FOFIFA, DRZV, Antananarivo, Madagascar

^b CIRAD, UMR15 CIRAD/INRA, Site de Duclos, Prise d'Eau 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

^c CIRAD, UMR15 CIRAD/INRA, Montpellier, France

^d CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

ARTICLE INFO

Keywords:

Ehrlichia ruminantium

Heartwater

Major antigenic proteins (*map*)

Genetic diversity

ABSTRACT

Understanding bacterial genetic diversity is crucial to comprehend pathogenesis. *Ehrlichia ruminantium* (*E. ruminantium*), a tick-transmitted intracellular bacterial pathogen, causes heartwater disease in ruminants. This model rickettsia, whose genome has been recently sequenced, is restricted to neutrophils and reticulo-endothelial cells of its mammalian host and to the midgut and salivary glands of its vector tick. *E. ruminantium* harbors a multigene family encoding for 16 outer membrane proteins including MAP1, a major antigenic protein. All the 16 *map* paralogs are expressed in bovine endothelial cells and some are specifically translated in the tick or in the mammalian host.

In this study, we carried out phylogenetic analyses of *E. ruminantium* using sequences of 6 MAP proteins, MAP1, MAP1-2, MAP1-6, MAP1-5, MAP1+1 and MAP1-14, localized either in the center or at the borders of the *map* genes cluster.

We show that (i) *map1* gene is a good tool to characterize the genetic diversity among Africa, Caribbean islands and Madagascar strains including new emerging isolates of *E. ruminantium*; (ii) the different *map* paralogs define different genotypes showing divergent evolution; (iii) there is no correlation between all MAP genotypes and the geographic origins of the strains; (iv) The genetic diversity revealed by MAP proteins is conserved whatever is the scale of strains sampling (village, region, continent) and thus was not related to the different timing of strains introduction, *i.e.* continuous introduction of strains versus punctual introduction (Africa versus Caribbean islands).

These results provide therefore a significant advance towards the management of *E. ruminantium* diversity. The differential evolution of these paralogs suggests specific roles of these proteins in host–vector–pathogen interactions that could be crucial for developing broad-spectrum vaccines.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ehrlichia ruminantium, a member of the order Rickettsiales, is the etiologic agent of heartwater in ruminants including cattle, sheep, goats and a variety of wild ruminants (Peter et al., 2002). This wide host range might be broader with a recent report of three fatal human cases of suspected ehrlichiosis involving unrelated individuals

* Corresponding authors. Tel.: +590 590 25 54 42;

fax: +590 590 94 03 96.

E-mail addresses: damien.meyer@cirad.fr (D.F. Meyer),
nathalie.vachiery@cirad.fr (N. Vachiéry).

¹ These authors contributed equally to this work.

where *E. ruminantium* DNA was detected in patients (Allsopp et al., 2005).

E. ruminantium is transmitted by ticks of the genus *Amblyomma*, *Amblyomma variegatum* and *hebraeum* in Africa. This deadly Gram-negative intracellular α -proteobacterium is prevalent in the warmer and wetter parts of the world in both hemispheres such as sub-Saharan Africa, Caribbean Islands and in the Indian Ocean Islands of the Comoros, Madagascar, Mascarene, Reunion and Mauritius (Provost and Bezuidenhout, 1987). Heartwater is now also threatening livestock on the American mainland because of the presence of suitable indigenous vectors or adaptation of exotic ticks (Barré et al., 1987; Burridge et al., 2000, 2002).

E. ruminantium presents a broad genetic diversity (Allsopp et al., 1999, 2001; Martinez et al., 2004) which constitutes the main limitation for the development of an efficient vaccine. Moreover, little genetic information is available to discriminate the immunogenic variants of *E. ruminantium*. Up to now, genetic characterization was based preferentially on largely conserved genes such as *pCS20*, *groESL* (Allsopp et al., 2003). A better genetic characterization of representative *E. ruminantium* strains that circulate in the field, using other target genes including polymorphic genes, is necessary. To date, the genomes of three virulent strains of *E. ruminantium* strains have been published (Collins et al., 2005; Frutos et al., 2006, 2007) and three other virulent and attenuated strains are under sequencing by a French consortium Genoscope/CIRAD, making this bacterium a good model for genomic studies in Rickettsiales.

Studies on bacteria from the family *Anaplasmataceae* revealed an important role for the bacterial outer membrane proteins (OMPs) in the stimulation of the host immune response and protection of the host from infection (Lopez et al., 2005; Ohashi et al., 1998). The outer membrane protein MAP1 (Major Antigenic Protein 1) triggers a dominant antibody response of animals infected with *E. ruminantium* (van Vliet et al., 1994). The locus containing *map1* has been characterized and consists of 16 *map1* paralogs, defining thus the *map* genes cluster of *E. ruminantium* (van Heerden et al., 2004). The expression and translation of the *map* genes was studied both in host and tick cells (Bekker et al., 2005; Postigo et al., 2007).

The aim of this study was to characterize the genetic diversity of *E. ruminantium* strains from Caribbean islands, Africa and Madagascar (Indian Ocean island) in order to evaluate the importance of *E. ruminantium* strains diversity in various areas where pathogen introduction and mix were different. Africa is thought to be the original continent of *E. ruminantium* and the birthplace of its diversity (Uilenberg et al., 1984). In Guadeloupe, *E. ruminantium* was introduced from Africa with livestock during the slavery period more than 200 years ago (Uilenberg et al., 1984). None new introduction has been observed since 150 years at least. Madagascar represents an intermediate situation between Africa and Guadeloupe, since heartwater could have been introduced during the migrations of domestic livestock around 1200 years ago and new strains of *E. ruminantium* could have been introduced by recent importations of ameliorated breeds from Africa.

In terms of molecular phylogeny, three major questions arise: (1) Is there a similar or different evolution of the *map*

multigene family? (2) Is the genetic diversity of *E. ruminantium* strains similar at the village scale, between regions and between continents? (3) Does a phylogenetic analysis based on several polymorphic genes such as *map* genes allow the identification of geographic or antigenic groups?

The subsequent question concerning evolutionary genetics is whether differences in genetic diversity of *E. ruminantium* could be associated with the various history of pathogen introduction.

In this context, this study presents the phylogenetic analyses of *E. ruminantium* we performed using the *map1* multigenic family that comprise 16 paralogs (Bekker et al., 2005). To achieve our goal, we analyzed amino acid sequences of 6 MAP proteins, MAP1, MAP1-2, MAP1-6, MAP1-5, MAP1+1 and MAP1-14, localized along the *map* genes cluster (Bekker et al., 2005).

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

E. ruminantium isolates used in this study, their source and their geographic origins are presented in Table 1. Our reference strain Gardel of *E. ruminantium* (Erga) was isolated on the island of Guadeloupe in 1982 from a goat injected with a homogenate of a female *A. variegatum* tick collected from cows (Uilenberg et al., 1985). For cultivated strains, *E. ruminantium* was multiplied successively in bovine umbilical endothelial cells and in bovine aorta endothelial cells grown in Glasgow minimal essential medium complemented with fetal calf serum, tryptose-phosphate broth, and antibiotics (Bezuidenhout et al., 1985) at 37 °C, 5% CO₂, with a weekly passage on fresh cells (Martinez et al., 1990). DNA was extracted as described below.

2.2. DNA extraction, PCR amplifications and sequencing

The QIAamp DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) was used to extract genomic DNA from blood, brain, tick cells or cell culture derived *E. ruminantium* isolates according to manufacturer's instructions. Elementary bodies were purified from culture supernatant, as previously described (Martinez et al., 1994), resuspended in 350 μ l of phosphate-buffered saline containing 0.36 μ g/ml of DNase to remove contaminating host cell DNA, and incubated for 90 min at 37 °C prior to the addition of 25 mM EDTA (Martinez et al., 1990). Extraction of DNA from elementary bodies was done as previously described (Perez et al., 1997).

Primer pairs for amplification of *map1*, *map1+1*, *map1-2*, *map1-5*, *map1-6* and *map1-14* gene coding regions were designed using published sequences. Primer sequences, melting and annealing temperatures used in this study are given in Table 2. A nested PCR was used for *map1* gene as described in Martinez et al. (2004) using modified primers listed in Table 2. The second phase was done using 1 μ l of PCR product from the first phase as matrix. Amplification reactions (25 μ l) contained 1 μ l of each primer (50 ng/ μ l), 2 μ l of 2.5 mM dNTP mix, 1.5 μ l of 50 mM MgCl₂, 2.5 μ l of 10 \times proprietary buffer supplied with the enzyme, 0.1 μ l of

Table 1
E. ruminantium isolates used in this study for *map1*, *map1+1*, *map1-2*, *map1-5*, *map1-6* and *map1-14* genes amplification.

Isolate	Source	Geographic origin	<i>map1</i>	<i>map1-2</i>	<i>map1-5</i>	<i>map1-6</i>	<i>map1+1</i>	<i>map1-14</i>
Caribbean, Car								
AntGeorges	Tick	Antigua	+					
Antigua	Reference	Antigua	+					
BlondeCp7	Cell culture p7	Guadeloupe	+		+	+		+
Gardel	Reference	Guadeloupe	+	+	+	+	+	+
Gardelp230	Cell culture p230	Guadeloupe	+					
Gu509797M1	Tick	Guadeloupe	+					
Gu537782F1	Tick	Guadeloupe	+					
Gu5697Cer	Brain	Guadeloupe	+					
Gu6001F1	Tick	Guadeloupe	+	+	+	+	+	+
Gu665394M1	Tick	Guadeloupe	+					
GuBM1T	Tick	Guadeloupe	+					
GuBM2T	Tick	Guadeloupe	+					
GuBM601T	Tick	Guadeloupe	+					
Mg01503F1	Tick	Marie-Galante	+					
Mg041530F2	Tick	Marie-Galante	+					
Mg0901M1	Tick	Marie-Galante	+					
Mg12861M2	Tick	Marie-Galante	+					
Mg3524106F1	Tick	Marie-Galante	+					
Mg4410M1	Tick	Marie-Galante	+					
Mg83834562	Tick	Marie-Galante	+					
Western Africa, WA								
Ban033F1	Tick	Banankélédaga, Burkina Faso	+					
Ban112Cp7	Cell culture p7	Banankélédaga, Burkina Faso	+	+	+	+	+	+
Ban181T	Tick	Banankélédaga, Burkina Faso	+					
Ban455Cer	Brain	Banankélédaga, Burkina Faso	+					
Bank421Cer	Tick	Banankélédaga, Burkina Faso	+		+	+		
Bek070T1	Tick	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek242T	Tick	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek255Cp5	Cell culture p5	Bekuy, Burkina Faso	+	+	+	+	+	+
Bek282Cer	Brain	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek313Cer	Brain	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek320T	Tick	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek448FC2	Tick*	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek448FC3	Tick*	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek448FC4	Tick*	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek448MC3	Tick*	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek448MC4	Tick*	Bekuy, Burkina Faso	+					
Bek475T	Tick	Bekuy, Burkina Faso	+					
Burkinafa	Reference	Banankélédaga, Burkina Faso	+					
CamerCp9	Reference and cell culture p9	Cameroun	+	+	+	+	+	+
Lamb065SCer	Brain	Lamba, Burkina Faso	+					
Lamb076T	Tick	Lamba, Burkina Faso	+					
Lamb107T	Tick	Lamba, Burkina Faso	+					
Lamb194bCer	Brain	Lamba, Burkina Faso	+					
Lamb229T	Tick	Lamba, Burkina Faso	+					
Lamb350Cer	Brain	Lamba, Burkina Faso	+					
Lamb465T	Tick	Lamba, Burkina Faso	+					
Lamb479Cp14	Tick and cell culture p14	Lamba, Burkina Faso	+	+	+	+	+	+
Mali								
Pokoase	Reference	Ghana	+					
Sara188T2	Tick	Sara, Burkina Faso	+					
Sara292F1	Tick	Sara, Burkina Faso	+					
Sara371T	Tick	Sara, Burkina Faso	+					
Sara409Cer	Brain	Sara, Burkina Faso	+					
Sara445Cer	Tick	Sara, Burkina Faso	+		+	+	+	+
Sara446Cer	Brain	Sara, Burkina Faso	+					
Sara450T	Tick	Sara, Burkina Faso	+					
SenDiaksoa	Tick	Diaksao, Senegal	+					
SenDioumb	Tick	Diambalo, Senegal	+					
Senegal	Reference	Senegal	+	+	+	+	+	+
SenKDB	Tick	Keur Mbir Dao, Senegal	+					
SenM10T	Tick	Niagues, Senegal	+					
SenM12T	Tick	Niagues, Senegal	+					
SenM16T	Tick	Niagues, Senegal	+					
SenM1T	Tick	Niagues, Senegal	+					

Table 1 (Continued)

Isolate	Source	Geographic origin	<i>map1</i>	<i>map1-2</i>	<i>map1-5</i>	<i>map1-6</i>	<i>map1+1</i>	<i>map1-14</i>
Southern Africa, SA								
Ball3	Reference and blood	South Africa	+					
Blaaukrans	Reference	South Africa	+					
Ebostawana	Reference	Botswana	+					
Ludlow	Reference	South Africa	+					
LutaleCp2	Reference and cell culture p2	Zambia	+	+	+	+	+	+
Mara87_7	Reference	South Africa	+					
MaraCp1	Tissue culture p1	South Africa	+	+	+	+	+	+
Kwanyanga	Reference	South Africa	+					
Omatjenne	Reference	Namibia	+					
UmpalaCp2	Reference and cell culture p2	Mozambique	+	+	+	+	+	+
Welgevonden	Reference	South Africa	+	+	+	+	+	+
Eastern Africa, EA								
Umbanein	Reference	Sudan	+					
Kiswani	Reference	Kenya	+					
Indian Ocean, IO								
MadKJSF2	Tick	Kiandjaoa, Madagascar	+					
MadPierP1T	Tick	Ampitilina, Madagascar	+					
MadRZFM1	Tick	Andranonahoatra, Madagascar	+					

Reference strains are shaded in gray. (+) The strain was amplified for the corresponding *map* gene; (p) passage; (*) clones of *map1* PCR product isolated from a tick Bekuy 448 containing a mix of *E. ruminantium* strains. Geographic notations: WA, Western Africa; EA, Eastern Africa; SA, Southern Africa; Car, Caribbean (West Indies).

5 U/μl Taq polymerase (EurobioTaq ADN polymerase, Eurobio) and 1 μl of DNA. Reactions conditions were as follows: initial denaturation 3 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 50 s denaturation at 95 °C; 50 s annealing at the appropriate temperature; 50 s extension at 72 °C, with a final extension 10 min at 72 °C; hold at 4 °C. All reactions were performed in an icycler thermal cycler (BioRad). PCR products were visualized after electrophoresis on 1.5 % agarose gels. Single amplicons of the expected size around 700–800 bp were purified and automatically sequenced (200 ng of DNA) using the gold standard ABI 3730xl DNA Analyzer platform (Applied Biosystems) by COGENICS corporation. DNA and protein sequences were analyzed using the Vector NTI package. Homology searches were performed using the NCBI BLAST server.

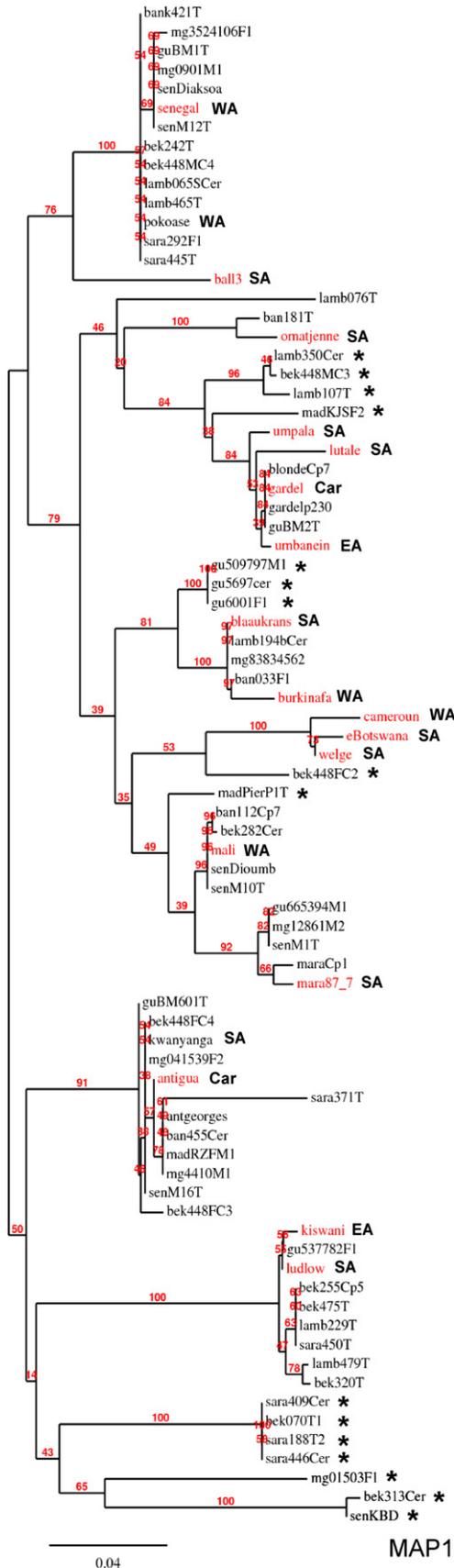
2.3. Phylogenetic analyses

Amino acid sequences for MAP1, MAP1+1, MAP1-2, MAP1-5, MAP1-6 and MAP1-14 were aligned and phylogenetic trees were reconstructed by the neighbor-joining method. The Phylogeny.fr platform was used to carry out the multiple alignments of amino acid sequences, the phylogenetic reconstruction and the graphical representation of the inferred tree (Dereeper et al., 2008). The 'A la Carte' mode which offers more flexibility and sophistication allowed us to select and set up all the required steps for our analysis. The MUSCLE program (Edgar, 2004a,b) was used for multiple alignments of the nucleotide sequences. The unmatched ends were deleted to obtain a homogeneous matrix of characters and thus increase the reliability of the tree

Table 2

Primers used for the amplification of *map1*, *map1+1*, *map1-2*, *map1-5*, *map1-6* and *map1-14* genes.

Gene	Primer	Primer sequence	Annealing temperature (°C)
<i>map1</i>	NT	5'-ATGAATTGCAAGAAAATTTTATAACAAG-3'	50
	CT1bis	5'-TTAAAATACAAACCTTCTCCAATTC-3'	
<i>map1-2</i>	LP	5'-CCTGGTGTGCTCTTTCTGA-3'	55
	CT2bis	5'-CCTTCTCCAATTTCTATACCGAAATGGC-3'	
<i>map1+1</i>	mapX11F2	5'-GGTGTTACATTAAGTGATTGTTG-3'	40
	EcoMapX11GR*	5'-(GGAATTC)CTATAAGAAAATCTAATCCCAAC-3'	
<i>map1-2</i>	map1-2F2	5'-CTCATTGCAACAGGTATAGTATTAA-3'	45
	KpnMap1-2GR*	5'-(GGGGTACC)TTATAACTTTAATCCAAATCTTATTCC-3'	
<i>map1-5</i>	mapX8F2	5'-GGTAGTGAAATTGGATTAAG-3'	48
	mapX8R2	5'-CCTCAATTAATTGCAATTTATAGTC-3'	
<i>map1-6</i>	mapX7F2	5'-CAGTTAACATATTATAGGAGC-3'	45
	mapX7R2	5'-CTTAATCCAATTTCACTACC-3'	
<i>map1-14</i>	mapX12F2	5'-TGGCACATAATGCATTTTCATC-3'	42
	mapX12R2	5'-GTAAGCAAAAGCTTAAACTC-3'	



obtained. Sequence alignments as obtained by MUSCLE alignment program were given to PROTDIST program in the Phylip format. The phylogenies were constructed and the trees built by the BioNJ method (Gascuel, 1997) with the Jones–Taylor–Thornton (JTT) distance measure matrix (Jones et al., 1992) as implemented in the PHYLIP PROTDIST program (Felsenstein, 1989). PROTDIST computed a distance matrix from a sequence alignment using the JTT model for amino acids substitution. This matrix is an empirical one that scales probabilities of change from one amino acid to another, assuming that the total change between the two amino acid sequences is 1%. The robustness of the tree's topology and the reliability of each clade were assessed by bootstrap analysis of the neighbor-joining method using SEQBOOT, PROTDIST and NEIGHBOR programs based on 1000 repeated samplings. Finally, the bootstrap trees were extracted using the CONSENSE program and the resulting tree can be drawn using NJPLOT program (Perriere and Gouy, 1996; Persson, 2000). The bootstrap procedure is a sound and accurate way to obtain robust phylogenetic trees, and its use is greatly facilitated by the speed of distance methods.

2.4. Determination of clusters of genotypes

For each MAP protein, *E. ruminantium* strains were clustered when they were supported by a minimal bootstrap value of 60, thus defining various genotypes.

3. Results

We completed PCR amplification and sequencing of target genes for strains from African and Caribbean areas in order to generate phylogenetic trees with the neighbor-joining method. The comparison of whole-protein amino acids sequences, using alignments generated by MUSCLE (Edgar, 2004a,b), showed that these proteins are well conserved between each other and among *E. ruminantium* strains.

3.1. Genetic characterization of *E. ruminantium* using map1 gene

The phylogenetic tree generated with MAP1 sequences of 80 strains of *E. ruminantium* clearly shows that *E. ruminantium* strains can be subdivided into several major groups that do not correspond to their geographic origin. (Fig. 1; Table 1). We observed the same MAP1 genotypes for isolates from Guadeloupe, Burkina Faso, Senegal, e.g. the MAP1 genotype Antigua. The MAP1 tree topology obtained by BioNJ analysis is in accordance with Maximum Likelihood phylogenetic tree previously obtained with

Fig. 1. Neighbor-joining (NJ) tree with bootstrap values of MAP1 sequences from 80 strains of *E. ruminantium*. Phylogenies were created by neighbor-joining analysis (BIONJ), using distance matrix (PROTDIST) with JTT substitution model. Bootstrap values over 50 based on 1000 replicates are considered for each node and the branch length index is indicated below the phylogeny (0.04 substitutions/site). Notations indicate geographical origins: WA, Western Africa; EA, Eastern Africa; SA, Southern Africa; and Car, Caribbean (French Antilles). New isolates that do not correspond to any known genotype are indicated by an asterisk.

fewer strains (Allsopp et al., 2001). Thus, we found the same clades of reference strains as follows for isolates from different geographical areas: Senegal/Pokoase, Omatjenne, Gardel/Lutale/Umbaneim/Umpala, Burkina Faso/Blaaukrans, Cameroun/E. Bostwana/Welgevonden, Mali/Mara, Antigua/Kwanyanga and Kiswani/Ludlow (Fig. 1). Some strains formed a unique group (without a reference strain), e.g. Guadeloupe strains Gu509797M1, Gu5697Cer and Gu6001F1 or two out of three strains from Madagascar island, MadKJSF2 and MadPierP1T. We observed several strains that belong to the same clade, which originate from different areas, e.g. SenKBD and Bek313 from Senegal and Burkina Faso (Bekuy village) or Sara409Cer, Bek070T1, Sara188T2, Sara446Cer from Sara and Bekuy villages. The very high bootstrap value indicates that this clustering is not due to a random phenomenon. These new strains correspond to new genotypes when analyzed by RFLP using *map1* gene (data not shown).

We then characterized the polymorphisms of these new genotypes in comparison with known MAP1 genotypes in order to point out the generation of the diversity. MAP1 amino acids sequences present three hypervariable regions, each about 10–15 amino acids long (Allsopp et al., 2001). The polymorphism between each group of unknown strains and the closest reference strains is mainly due to amino acid substitutions or deletions in the first polymorphic region whereas the polymorphism inside these groups of unknown strains is localized all along the protein (data not shown).

3.2. Genetic characterization of *E. ruminantium* using other map genes

The MAP proteins were used to characterize 11 strains for MAP1-2 (Fig. 2A), 15 strains for MAP1-5 (Fig. 2B), 14 strains for MAP1-6 (Fig. 2C), 12 strains for MAP1+1 (Fig. 2D), and 13 strains for MAP1-14 (Fig. 2E). The first

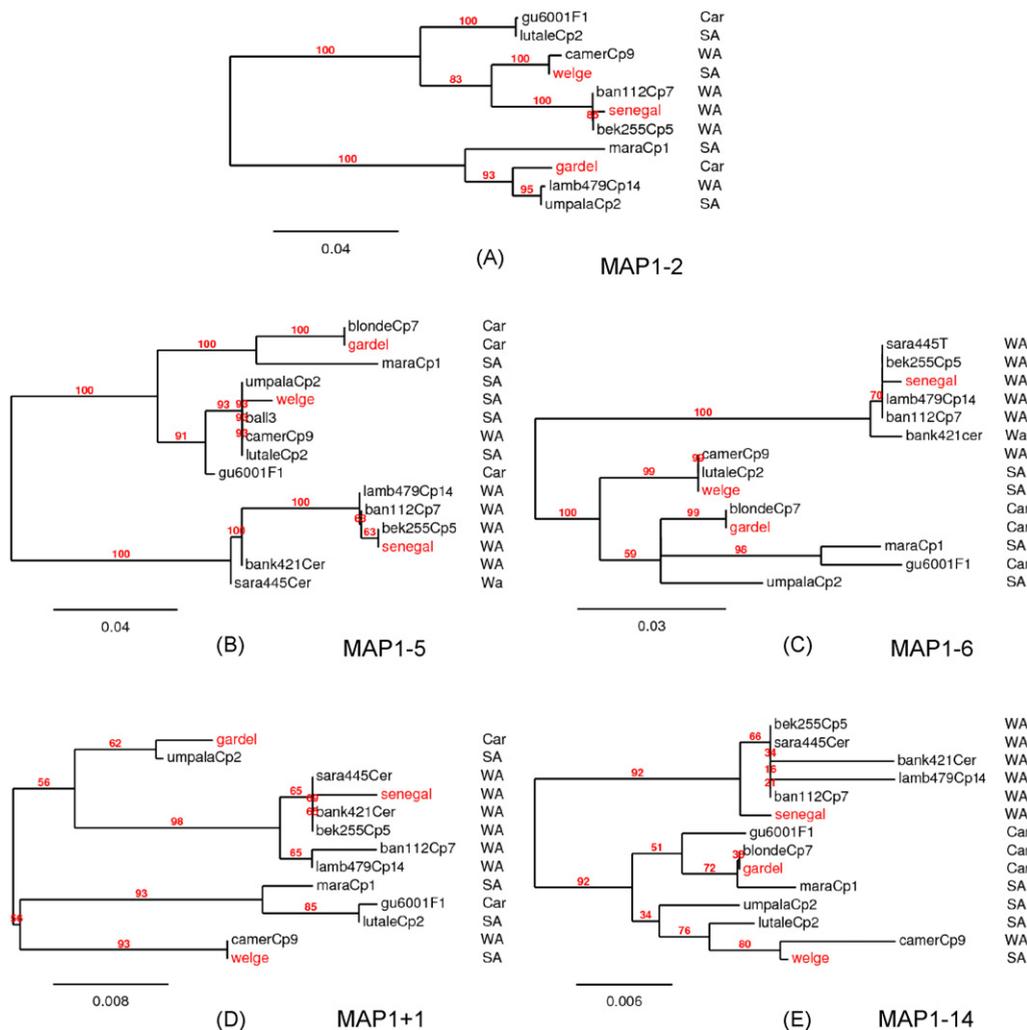


Fig. 2. Neighbor joining (NJ) trees with bootstrap values of MAP sequences from strains of *E. ruminantium*. Phylogenies were created by Neighbor joining analysis (BIONJ), using distance matrix (PROTDIST) with JTT substitution model. Bootstrap values over 50 based on 1000 replicates are represented for each node and the branch length index is indicated below the phylogeny (number of substitutions/site). (A) MAP1-2 sequences from 11 strains; (B) MAP1-5 sequences from 15 strains; (C) MAP1-6 sequences from 14 strains; (D) MAP1+1 sequences from 12 strains; (E) MAP1-14 sequences from 13 strains. Notations indicate geographical origins: WA, Western Africa; SA, Southern Africa; Car, Caribbean (French Antilles).

result to note for the phylogenetic trees of MAP1+1, MAP1-2, MAP1-5, MAP1-6 and MAP1-14 amino acid sequences is that their topologies are clearly different (Fig. 2). Indeed, one single strain could share different genotypes depending on the selected MAP. This was observed for Mara, Guad6001, Lamba479, Lutale and Umpala. This result demonstrates that *map* genes are hypervariable and that there is no conservation of one given strain genotype among *map* paralogs.

All the strains of the Senegal genotype defined by the MAP1 phylogenetic tree have also the Senegal genotype when analyzed with MAP1+1, MAP1-2, MAP1-5, MAP1-6 and MAP1-14 and are clustered together (Fig. 2). All these strains originated from Western Africa. Inversely, Ban 112Cp7 and Bekuy 255Cp5 which were respectively Mali and Kiswani MAP1 genotypes belong to Senegal genotype for other MAP genes.

With the exception of MAP1-2 tree, the Senegal cluster shows a greater genetic distance when compared to the Gardel or Welgevonden cluster indicating a relative independence in the evolution of the corresponding strains. Moreover, Welgevonden and Gardel clusters are more closely related to each other.

Strains originated from Caribbean were often grouped with strains from Southern Africa, especially for trees based on MAP1-5, MAP1-6 and MAP1+1 sequences.

We identified new genotypes, of which the corresponding strains did not group with any reference strains: Gu6001F1/LutaleCp2 with MAP1-2 sequences (Fig. 2A), Gu6001F1 with MAP1-5 (Fig. 2B), Umpala with MAP1-6 (Fig. 2C) and Lamb479Cp14/BlondeCp7 with MAP1-14 sequences (Fig. 2E).

4. Discussion

E. ruminantium has a *map1* multigene family that consists of 16 copies of homologous genes encoding 28–30 kDa outer membrane proteins. The *map1*-related genes are highly diversified among strains of *E. ruminantium* (Yu et al., 2007). We provide evidences that *map* paralogs have different discriminatory abilities for genotyping of *E. ruminantium* strains, due to their high genetic variability. Thus, for one given strain, each MAP protein could define a different genotype, whatever the position of the *map* paralogs inside the *map* cluster. However, MAP1 sequences have a better resolution than other MAP sequences and therefore constitute a gold marker to characterize the genetic diversity of *E. ruminantium*. A limited sequence of MAP1 (around 750 pb) was sufficient to type *E. ruminantium* strains accurately. The tendency is then to characterize genetic diversity using polymorphic markers such as MAP1 rather than other genes previously used such as *pCS20* and *groESL* genes that show very little variation among *E. ruminantium* isolates (Allsopp et al., 2003). Moreover, our data also indicate that *map1* gene is a robust tool to identify new emerging isolates of *E. ruminantium*. The origin of the Caribbean strains of *E. ruminantium* could be further assessed using MLST approach.

The genetic diversity described using this MAP sequences phylogenetic analysis is conserved indepen-

dently of the geographic scale considered. Particularly, it is possible to find different MAP1 genotypes in the same village, and the same genotypes could also be found at the region and continent level. Beside these results we were not able to find a significant correlation between MAP genotypes and the geographic origins of the strains. This absence of link between geographical origin and *map1* genotypes reinforce previous data obtained with a smaller sampling of *E. ruminantium* strains (Allsopp et al., 2001; Martinez et al., 2004).

Using MAP markers, our results demonstrated that there was no influence of the timing of introduction of *E. ruminantium* strains (continuous or punctual introduction) on the evolution of *map* multigene family. Same genotypes are present in Africa and in the Caribbean islands where strains introduction was punctual and stopped more than 150 year ago. This could be due to the neutral selective pressure of the target MAP proteins. For Madagascar strains, 2 out of 3 isolates had new MAP1 genotypes. This could be due to a divergent evolution of Madagascar strains compared to African strains. However, further genetic characterization on larger *E. ruminantium* strains from Madagascar and other Indian Ocean islands is necessary.

The genetic variability among *map* paralogs is surprising for a multigene family that is organized. This could be related to the function of the different MAP proteins. Previous work has shown that *map* genes of *E. ruminantium* are organized in a particular operon in which genes are differentially regulated, depending on host and vector cell environment (Bekker et al., 2005). For instance, *map1-1* and *map1+1* genes are expressed in vectoring ticks, non-vectoring ticks and also in bovine endothelial cells whereas two other paralogs (*map1-11* and *map1-3*) were never found to be transcribed in Gardel and Welgevonden strains (Bekker et al., 2005). Furthermore, four *map* paralogs are transcribed in non-vector ticks and endothelial cells but not in vectoring ticks (Bekker et al., 2005), and out of the 16 *map* paralogs examined in another transcription analysis, only transcripts from *map1* and *map1-1* were detected in ticks (Postigo et al., 2007). At the protein levels similar observations have been made of differential expression of MAP1 family proteins *in vitro* in mammalian cells and tick cell cultures (Postigo et al., 2008). Differential expression could be associated with different selection pressure (evolutionary forces) leading to genetic variability among the MAP family members.

Comparative analyses of mutational trends between Gardel strain and Welgevonden strain of *E. ruminantium* revealed that only *map1* and *map1-13* genes display significant selective pressure toward synonymous substitutions (Frutos et al., 2006). These data indicate that *map* paralogs should be conserved in their original form to maintain the proteins function. Overall, it is very likely that the *map* genes cluster could be the result of gene duplications from an ancestral gene where copies could have been maintained and are under divergence driven by progressive accumulation of point mutations, according to Ohno's model (Bershtein and Tawfik, 2008; Ohno, 1970). The homologous proteins created in this way by duplication and divergence form a family whose members can

have similar functions or not. Thus each MAP protein could have a peculiar role during the interaction of *E. ruminantium* with its vector or its host. This is in accordance with the permanent ongoing process of genome plasticity shown for *E. ruminantium* (Frutos et al., 2006). This is also supported by numerous theoretical, computational, and experimental works that indicate that mutations of adaptive potential can occur under “neutrality” (Amitai et al., 2007; Nei, 2007)—namely, under selection to maintain the original function and structure. Phenotypic changes under neutrality support the notion that neutral sequence changes (non-adaptative) in a current context could facilitate adaptation under changing conditions, by both providing an immediate advantage, and reducing the number of mutations required for the divergence of new functions (Amitai et al., 2007).

The understanding of the evolutionary mechanisms of such multigene families could have an obvious implication in the adaptation of *E. ruminantium* to its vector tick and/or to its ruminant host. Therefore, extensive biodiversity and phylogeography analyses would help to understand the genetic and geographic structure of *E. ruminantium*.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgement

The research described in this manuscript was supported by the European Union grant Inco-Dev #FP6-003713: “Epigenevac”.

References

- Allsopp, M.T., Dorfling, C.M., Maillard, J.C., Bensaid, A., Haydon, D.T., van Heerden, H., Allsopp, B.A., 2001. *Ehrlichia ruminantium* major antigenic protein gene (*map1*) variants are not geographically constrained and show no evidence of having evolved under positive selection pressure. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4200–4203.
- Allsopp, M.T., Hattingh, C.M., Vogel, S.W., Allsopp, B.A., 1999. Evaluation of 16S, *map1* and *pCS20* probes for detection of *Cowdria* and *Ehrlichia* species. *Epidemiol. Infect.* 122, 323–328.
- Allsopp, M.T., Van Heerden, H., Steyn, H.C., Allsopp, B.A., 2003. Phylogenetic relationships among *Ehrlichia ruminantium* isolates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 685–691.
- Allsopp, M.T.E.P., Louw, M., Meyer, E.C., 2005. *Ehrlichia ruminantium*: An emerging human pathogen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 358–360.
- Amitai, G., Gupta, R.D., Tawfik, D.S., 2007. Latent evolutionary potentials under the neutral mutational drift of an enzyme. *HFSP J.* 1, 67–78.
- Barré, N., Uilenberg, G., Morel, P.C., Camus, E., 1987. Danger of introducing heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54, 405–417.
- Bekker, C.P., Postigo, M., Taoufik, A., Bell-Sakyi, L., Ferraz, C., Martinez, D., Jongejan, F., 2005. Transcription analysis of the major antigenic protein 1 multigene family of three in vitro-cultured *Ehrlichia ruminantium* isolates. *J. Bacteriol.* 187, 4782–4791.
- Bershtein, S., Tawfik, D.S., 2008. Ohno's model revisited: measuring the frequency of potentially adaptive mutations under various mutational drifts. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2311–2318.
- Bezuidenhout, J.D., Paterson, C.L., Barnard, B.J., 1985. In vitro cultivation of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 52, 113–120.
- Burridge, M.J., Simmons, L.A., Allan, S.A., 2000. Introduction of potential heartwater vectors and other exotic ticks into Florida on imported reptiles. *J. Parasitol.* 86, 700–704.
- Burridge, M.J., Simmons, L.A., Peter, T.F., Mahan, S.M., 2002. Increasing risks of introduction of heartwater onto the American mainland associated with animal movements. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 269–274.
- Collins, N.E., Liebenberg, J., de Villiers, E.P., Brayton, K.A., Louw, E., Pretorius, A., Faber, F.E., van Heerden, H., Josemans, A., van Kleef, M., Steyn, H.C., van Strijp, M.F., Zweggarth, E., Jongejan, F., Maillard, J.C., Berthier, D., Botha, M., Joubert, F., Corton, C.H., Thomson, N.R., Allsopp, M.T., Allsopp, B.A., 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 838–843.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucl. Acids Res.* 36, W465–469.
- Edgar, R.C., 2004a. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinform.* 5, 113.
- Edgar, R.C., 2004b. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.
- Frutos, R., Viari, A., Ferraz, C., Morgat, A., Eychenie, S., Kandassamy, Y., Chantal, I., Bensaid, A., Coissac, E., Vachiere, N., Demaille, J., Martinez, D., 2006. Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. *J. Bacteriol.* 188, 2533–2542.
- Frutos, R., Viari, A., Vachiere, N., Boyer, F., Martinez, D., 2007. *Ehrlichia ruminantium*: genomic and evolutionary features. *Trends Parasitol.* 23, 414–419.
- Gascuel, O., 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14, 685–695.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275–282.
- Lopez, J.E., Siems, W.F., Palmer, G.H., Brayton, K.A., McGuire, T.C., Norimine, J., Brown, W.C., 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect. Immun.* 73, 8109–8118.
- Martinez, D., Maillard, J.C., Coisne, S., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1994. Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 153–163.
- Martinez, D., Swinkels, J., Camus, E., Jongejan, F., 1990. Comparison between 3 antigens for the serodiagnosis of heartwater disease by indirect immunofluorescence. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 43, 159–166.
- Martinez, D., Vachiere, N., Stachurski, F., Kandassamy, Y., Raliniaina, M., Aprelon, R., Gueye, A., 2004. Nested PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*: use in genetic diversity analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 106–113.
- Nei, M., 2007. The new mutation theory of phenotypic evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12235–12242.
- Ohashi, N., Zhi, N., Zhang, Y., Rikihisa, Y., 1998. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* 66, 132–139.
- Ohno, S., 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Allen & Unwin, London.
- Perez, J.M., Martinez, D., Debus, A., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1997. Detection of genomic polymorphisms among isolates of the intracellular bacterium *Cowdria ruminantium* by random amplified polymorphic DNA and Southern blotting. *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 73–79.
- Perriere, G., Gouy, M., 1996. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78, 364–369.
- Persson, B., 2000. Bioinformatics in protein analysis. *EXS* 88, 215–231.
- Peter, T.F., Burridge, M.J., Mahan, S.M., 2002. *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol.* 18, 214–218.
- Postigo, M., Taoufik, A., Bell-Sakyi, L., Bekker, C.P., de Vries, E., Morrison, W.I., Jongejan, F., 2008. Host cell-specific protein expression in vitro in *Ehrlichia ruminantium*. *Vet. Microbiol.* 128, 136–147.
- Postigo, M., Taoufik, A., Bell-Sakyi, L., de Vries, E., Morrison, W.I., Jongejan, F., 2007. Differential transcription of the major antigenic protein 1 multigene family of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. *Vet. Microbiol.* 122, 298–305.
- Provost, A., Bezuidenhout, J.D., 1987. The historical background and global importance of heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54, 165–169.
- Uilenberg, G., Barre, N., Camus, E., Burridge, M.J., Garris, G.I., 1984. Heartwater in the Caribbean. *Prevent. Vet. Med.* 2, 255–267.

- Uilenberg, G., Camus, E., Barre, N., 1985. A strain of *Cowdria ruminantium* isolated in Guadeloupe (French West Indies). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 38, 34–42.
- van Heerden, H., Collins, N.E., Brayton, K.A., Rademeyer, C., Allsopp, B.A., 2004. Characterization of a major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia ruminantium*. *Gene* 330, 159–168.
- van Vliet, A.H., Jongejan, F., van Kleef, M., van der Zeijst, B.A., 1994. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.* 62, 1451–1456.
- Yu, X.J., McBride, J.W., Walker, D.H., 2007. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Vet. Parasitol.* 143, 337–346.

Chapitre 5 – Compréhension des mécanismes de transmissions hôte/vecteur des souches d'*E. ruminantium* par une approche en conditions contrôlées : Application aux observations de terrain

5.1 Mise au point d'outils moléculaires

Lors de plusieurs études épidémiologiques réalisées pour identifier la diversité génétique d'*E. ruminantium*, le typage des souches ciblant le génotype *map1* a été utilisé grâce à la PCR nichée *map1* couplée à une RFLP à la fois chez l'hôte infecté ou chez les tiques, (Martinez et al, 2004, Faburay et al, 2008). Cependant les tests de sensibilité effectués au laboratoire du CIRAD/BIOS (Données non publiées) révèlent que cette méthode ne permettait pas de typer un mélange de souches quantitativement déséquilibrées. Ces tests ont montré que dans un mélange de souches où le rapport entre les concentrations en corps élémentaires est inférieur à 10^{-2} , la souche en faible quantité n'est pas détectée par PCR nichée *map1*/RFLP. Dans notre étude sur la transmission des souches, le développement et l'optimisation de six PCR nichées *map1* spécifiques de souches s'est avérée nécessaire afin d'améliorer la sensibilité de détection des souches lors de mélange de souches. Les allèles les plus fréquemment rencontrés sur le terrain ont été principalement ciblés : Sénégal, Kiswani, Gardel, Welgevonden, Antigua, Sankat, Banankélédaga.

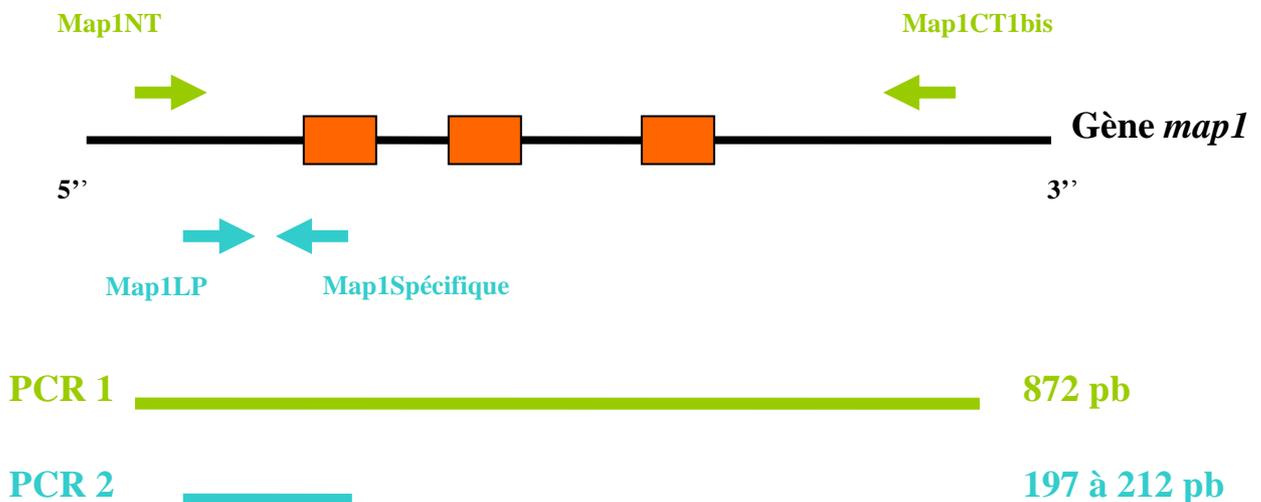


Figure 5 : Présentation schématique du principe de la PCR nichée spécifique de souche

Il faut noter que par rapport à la PCR nichée *map1* décrite précédemment (Martinez et al, 2004), l'amorce anti-sens de la première phase a été légèrement modifiée (Tableau 1). L'amplification spécifique se fait lors de la deuxième phase, l'amorce sens de la deuxième phase est inchangée par rapport à la PCR nichée *map1* classique, par contre,

l'amorce anti-sens dérivée à partir de séquences nucléotidiques de la première région variable du gène *map1* et spécifique de souche est utilisée (Figure 5). Les séquences des amorces spécifiques de souches, les tailles des amplicons obtenus et les génotypes ciblés sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Amorces, tailles d'amplicons et génotypes ciblés dans les PCR nichée *map1* classique et PCR nichée *map1* spécifique de souche.

Amorces		Séquences		Tailles de l'amplicon	Génotypes <i>map1</i>
PCR nichée <i>map1</i> Première phase*	Map1NT	Sens	5'-ATGAATTGCAAGAAAATTTTATAACAAG-3'	872 pb	Tous génotypes
	Map1CT1bis	Anti-sens	5'-TTAAAATACAAACCTCCTCCAATTTC-3'		
PCR nichée <i>map1</i> Seconde phase	Map1LP	Sens	5'-CTTGGTGTGCCTTTTCTGA-3'	804 pb	
	Map1CT2bis	Anti-sens	5'-CCTTCCTCCAATTTCTATACCGAAATGGC-3'		
PCR nichée <i>map1</i> spécifique, Seconde phase**	Map1LP	Sens	5'-CTTGGTGTGCCTTTTCTGA-3'		
	Map1GR3	Anti-sens	5'-ATACTATTGTTACCGCTATCTGA-3'	205 pb	Gardel
	Map1LB479R1	Anti-sens	5'-CAGTAAAAATAGTATTGCTATTTCC-3'	198 pb	Kiswani / Ludlow
	Map1SR1	Anti-sens	5'-AATTGAATTGGTGTACCC-3'	206 pb	Pokoase / Sénégal
	Map1AntiguR1	Anti-sens	5'-TGTATTGCTACTACTTGTTTTAACTC-3'	197 pb	Antigua
	Map1SankR1	Anti-sens	5'-TGTAGAATGATTGCTAGAATCTG-3'	212 pb	Mali / Sankat
	Map1BFR1	Anti-sens	5'-GTTACTGTTTTCTGATGTTGGTAC-3'	202 pb	Burkina Faso

* Première phase commune aux deux PCR ; ** Amorce Map1CT2bis remplacée par les amorces spécifiques des six souches dans la seconde phase.

Les amorces anti-sens utilisés lors de la deuxième phase, Map1GR3, Map1LB479R1, Map1SR1, Map1AntiguR1, Map1SankR1, Map1BFR1 permettent de distinguer ces souches entre elles car hybridant seulement avec leurs souches respectives. Nous pouvons donc utiliser ces amorces pour suivre le devenir de ces souches lors des infections contrôlées au laboratoire. Le seuil de détection des PCR nichées spécifiques pour les souches Gardel, Lamba 479 et Sankat 430 est de 60 copies par échantillon, la sensibilité de la PCR nichée spécifique est équivalente à la PCR nichée classique, commune à toutes les souches. Par contre, la PCR nichée *map1* spécifique, contrairement à la méthode *map1*/RFLP, a permis de détecter les souches présentes dans des mélanges en de fortes disproportions

de concentration, soit dans un rapport de 10^{-4} , et avec un seuil de détection compris entre 6 et 60 copies par échantillon pour la souche en plus faible quantité. De plus, la PCR nichée *map1* spécifique permet de typer directement la souche sans étape RFLP.

5.2. Mécanismes de transmission de souches hôte/ vecteur et typage de souches lors d'infections multiples

Les objectifs des expériences décrites ci-dessous sont l'évaluation :

- de l'influence de l'hôte, des tiques ou des souches dans la dynamique de distribution des souches.
- de la capacité de re-circulation de souches sur des animaux porteurs asymptomatiques lors d'une nouvelle infection et capacité de transmission aux tiques.
- des souches typées dans les organes des animaux successivement infectés et morts lors de la phase clinique ou dans les organes des animaux porteurs asymptomatiques.
- de la capacité des tiques à s'infecter aux différents stades de développement.

Plus globalement, ces expériences devraient permettre de mieux comprendre les observations de terrain lors d'infection multiples des hôtes et des tiques et aussi les influences que peuvent avoir les mécanismes de transmission de plusieurs souches d'un hôte infecté au vecteur tique *A. variegatum* sur la structure des populations d'*E. ruminantium*.

5.2.1. Stratégies expérimentales

Trois types d'expériences ont été réalisés :

- Huit chèvres naïves ont été co-infectées en conditions contrôlées avec les souches Gardel et Lamba 479 (97% génotype *map1* Kiswani/Ludlow) à concentrations égales en corps élémentaires (15 000 corps élémentaires vivants de chaque souche par chèvre) en deux expériences séparées : *Expérience 1* : uniquement en infection simultanée (n=2 chèvres), *Expérience 2* : en infection simultanée (n=2 chèvres) ou en infection décalée de 24 (n=2 chèvres) ou de 48 heures (n=2 chèvres), Lamba 479 étant inoculée en premier. Des nymphes naïves et à jeun, par lot de 22 à 50, ont été ensuite installées pour le repas

sanguin sept jours après l'inoculation de manière à avoir une infection des tiques pendant la phase d'hyperthermie des animaux. Une évaluation de l'infection par les deux souches à la fois chez l'hôte et dans les tiques, au cours du temps, a été réalisée en utilisant les PCR *map1* spécifiques de souches.

- Inoculation, lors de trois expériences, de souches hétérologues (Bekuy 255, 97% génotype *map1* K/L ; Sankat 430, génotype *map1* Mali/Sankat ; Banan 112, génotype Mali/Sankat) à sept chèvres immunisées contre Gardel. Les chèvres ont été vaccinées avec le vaccin inactivé puis infectées lors d'un challenge homologue avec Gardel virulente, la deuxième infection avec la souche hétérologue a été réalisée de 2 mois à un an après l'infection homologue. Un animal naïf témoin a été inclus lors de l'infection avec la souche hétérologue. Des larves et des nymphes ont été mises à gorger au moment de l'hyperthermie de manière à mesurer la capacité vectorielle des tiques vis-à-vis de Sankat 430 et Bekuy 255. Pour le challenge Sankat 430, 300 larves et 31 nymphes naïves à jeun ont été mises à gorger sur quatre des 7 chèvres immunisées pour déterminer si les tiques s'infectent également avec la souche Gardel. Les organes (cerveau, poumons, rate et ganglions mésentériques) des chèvres mortes au cours de l'expérience et de survivantes abattues quelques mois plus tard ont été prélevés afin de déterminer les souches présentes.
- Infections successives d'une lignée de tiques à différents stades de développement : infection par la souche Banan 112 (génotype *map1* Mali/Sankat) à une chèvre naïve et installation de 600 larves pour infection, puis gorgement des nymphes issues de la mue sur une autre chèvre naïve inoculée avec la souche Gardel pour déterminer le taux de co-infection des tiques adultes.

A l'exception des expériences sur la co-infection, toutes les expériences décrites dans ce chapitre ont été menées au cours des tests de challenge hétérologue sur des chèvres immunisées avec le vaccin inactivé Gardel, expliquant que les mêmes souches ne sont pas testées dans les différents essais. De plus, des contraintes liées aux préparations des inocula à partir des cultures cellulaires (insuffisance de la dose) et à l'élevage des tiques (nombre de tiques dans les différents stades insuffisants) ont été rencontrées entraînant le report de l'essai ou parfois la modification du protocole. Néanmoins, pour chaque essai, les souches utilisées avaient toujours des génotypes qui permettaient une bonne discrimination entre les souches lors des tests PCR.

Pour toutes ces expériences, la détection des souches dans le sang, les tiques et les organes a été faite par la PCR semi - nichée *pCS20* et la détermination des génotypes des souches présentes par la PCR nichée *map1* spécifique de souches.

5.2.2. Résultats

Circulation des souches dans le sang : Effet sur l'infection des tiques

La détection d'*E. ruminantium* dans le sang se fait entre trois jours avant l'hyperthermie jusqu'au premier jour d'hyperthermie. Inoculées à des concentrations égales chez la chèvre et simultanément, la souche Lambda 479 est détectée plus tôt que Gardel dans le sang, l'intervalle de détection entre les deux souches dans le sang variant de 1 à 2 jours ou de 2 à 4 jours respectivement dans les deux expériences et en fonction des chèvres (Tableau 2). La proportion de tiques infectées avec Lambda 479 est plus importante qu'avec Gardel au cours

des deux expériences. Pour l'expérience 1, la majorité des tiques sont infectées avec les deux souches 73 et 75% des tiques sont co-infectées et 20 et 25% des tiques sont infectées uniquement avec Lambda 479 (Tableau 3). Dans l'expérience 2, les tiques sont majoritairement infectées avec la souche Lambda 479 (Tableau 4). Dans les deux expériences, une faible proportion des tiques est infectée avec Gardel, la deuxième souche détectée chez l'hôte : de 4 à 7% des tiques sont infectées avec Gardel.

Tableau 2: Cinétique des infections lors d'inoculations simultanées des souches Gardel et Lambda 479

Chèvres	Souches	Jours post-inoculation															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0128*	L	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
0160*	L	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
0403**	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0555**	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

* : Expérience 1 ; ** : Expérience 2 ; G : Gardel ; L : Lambda 479

Tableau 3 : Typage des souches dans les tiques gorgées sur chèvres infectées en simultanée (Expérience 1)

Chèvre	PCR nichée <i>map1</i> spécifique
0128	11/15 G+L (73%) 3/15 L (20%) 1/15 G (7%)
0160	3/4 G+L (75%) 1/4 L (25%)

G : Gardel L : Lamba 479

Tableau 4 : Typage des souches dans les tiques gorgées sur chèvres infectées en simultanée (Expérience 2)

Chèvre	PCR nichée <i>map1</i> spécifique
0403	1/23 G+L (4%) 17/23 L (75%) 1/23 G (4%)
0555	1/17 G+L (6%) 13/17 L (76%) 1/17 G (6%)

G : Gardel L : Lamba 479.

Tableau 5 : Typage dans les tiques gorgées sur chèvres infectées (Expérience 2)

Inoculations des souches	Chèvre	PCR nichée <i>map1</i> Gardel		PCR nichée <i>map1</i> Kiswani/Ludlow	
		Récolte du J13	Récolte du J15 et J16	Récolte du J13	Récolte du J15 et J16
Simultanée	0403	0 / 15 (0 %)	1 / 8 (12,5%)	9 / 15 (60%)	8 / 8 (100%)
	0555	0 / 15 (0 %)	1 / 2 (50%)	11 / 15 (73,3 %)	2/2 (100%)
Décalées de 24 heures	0408	ND		ND	
	0412	0 / 10 (0 %)		7 / 10 (70 %)	
Décalées de 48 heures	0523	ND		ND	
	0533*	0 / 5 (0 %)		5 / 5 (100 %)	

* : Détection toutes tiques confondues (récolte du J13 et J14 pi)

Compétence vectorielle de la tique A. variegatum, souche de Guadeloupe, vis à vis des souches d'E. ruminantium africaines

Les taux d'infection des tiques mises à gorger sur deux chèvres naïves inoculées par Bekuy 255 et Sankat 430 sont de 100% (n=16) et de 92% (IC à 95% : 63,9-99,8), n=13 lors de la détection par la PCR semi - nichée *pCS20*.

Typage des souches dans le sang de chèvres vaccinées inoculées avec des souches hétérologues et dans les tiques

Au cours des expériences d'inoculations successives de chèvres immunisées avec la souche Gardel puis par une souche hétérologue 10 à 11 mois plus tard, lorsqu'une rickettsiémie est détectée, seule la dernière souche inoculée (la souche hétérologue) est détectée dans le sang chez l'hôte lors de l'hyperthermie (Tableau 6 et 7). . Aucune tique adulte issue de la mue des nymphes mises à gorger sur les quatre chèvres challengées avec la souche Sankat 430, n'est infectée par Gardel. (Tableau 8).

Tableau 6 : Détection des souches dans le sang des animaux immunisés avec Gardel et challengés avec la souche Sankat 430

Chèvres	0324					0336								0338						
	J0	8	11	13	15	J0	8	11	13	15	18	20	22	25	J0	6	8	11	13	15
<i>pCS20</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>map1G</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>map1 M</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	-	-	+	+

J0 : Inoculation ; pi : post-inoculation ; G : génotype Gardel ; M : génotype Mali/ Sankat ; ND : Non déterminé

Tableau 7 : Détection des souches dans le sang des animaux immunisés avec Gardel et challengés avec la souche Bekuy 255

Chèvres	0331						0333								0346								
	J0	7	9	11	13	14	J0	7	9	11	13	14	16	18	21	J0	7	9	11	13	14	16	18
<i>pCS20</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>map1G</i>	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-
<i>map1K</i>	ND	ND	ND	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-

J0 : Inoculation ; pi : post-inoculation ; G : génotype Gardel ; K : génotype Kiswani/Ludlow ; ND : Non déterminé

Tableau 8 : Typage dans les tiques mises à gorger sur des chèvres vaccinées challengées avec la souche Sankat 430

Chèvres	Tiques adultes testées	<i>pCS20</i>		<i>map1</i> Gardel		<i>map1</i> Sankat 430	
		(+)	(%)	(+)	(%)	(+)	(%)
0324	12	12	100	0	0	12	100
0335	12	11	91,7	0	0	11	91,7
0336	12	10	83,3	0	0	10	83,3
0338	12	12	100	0	0	12	100

Typage dans les organes des chèvres mortes au cours du challenge hétérologue ou survivantes porteurs asymptomatiques

Des analyses de PCRs nichées *map1* spécifiques de souches ont été effectuées sur quatre organes de prédilection de *E. ruminantium* (poumons, rate, ganglions mésentériques et cerveau) prélevés sur des chèvres mortes pendant les expériences de challenge hétérologue et sur des chèvres ayant survécu et abattues comme porteurs asymptomatiques de souches. La souche Gardel inoculée auparavant en challenge homologue n'est pas détectée dans les organes pendant la phase clinique provoquée par la souche hétérologue. Selon les expériences considérées, les souches Sankat 430, Bekuy 255 et Banan 112, sont les seules à être détectées (Tableau 9). Par contre, dans les organes des animaux porteurs asymptomatiques abattus plusieurs mois après le challenge hétérologue, aucune souche n'est détectée, les organes sont négatifs à la fois en PCR semi - nichée *pCS20* et *map1*.

Typage des souches dans les tiques adultes infectées aux stades larvaire et nymphal

Les larves d'une génération de tiques *Amblyomma variegatum* sont mises à gorger pendant la phase d'hyperthermie de la chèvre 0337 inoculée avec la souche Banan 112. Le taux d'infection dans un échantillon de 4 nymphes à jeun issues de la mue de larves gorgées est de 100%. Puis des nymphes à jeun appartenant à la même population sont installées pour gorgement sur la chèvre 0517 inoculée avec la souche Gardel. Le Tableau 10 montre les résultats des analyses par PCRs nichées spécifiques de souches sur les tiques adultes à jeun issues de la mue des nymphes gorgées récoltées et révèle une proportion de 75% de tiques coinfectedes par les deux souches.

Tableau 9. Typage dans les organes des chèvres mortes en phase clinique

Challenge I	Challenge II	Chèvre	Organe	PCR nichée <i>map1</i> spécifique		Génotype <i>map1</i>
Gardel	Sankat 430 11 mois p.c.	324	Poumon	G -	M+	M
			Rate	G -	M+	
			Ganglion	G -	M+	
			Cerveau	G -	M+	
Gardel	Sankat 430 11 mois p.c.	338	Poumon	G -	M+	M
			Rate	G -	M+	
			Ganglion	G -	M+	
			Cerveau	G -	M+	
	Sankat 430	402*	Poumon		M+	M
Rate				M+		
Ganglion				M+		
Cerveau				M+		
Gardel	Bekuy 255 10 mois p.c.	331	Poumon	G -	K+	K
			Rate	G -	K+	
			Ganglion	G -	K+	
			Cerveau	G -	K+	
	Bekuy 255	340*	Poumon		K +	K
Rate				K +		
Ganglion				K +		
Cerveau				K +		
Gardel	Banan 112 11 mois p.c.	323	Poumon	G -	M +	M
			Rate	G -	M +	
			Ganglion	G -	M +	
			Cerveau	G -	M +	
Gardel	Banan 112 11 mois p.c.	330	Poumon	G -	M +	M
			Rate	G -	M +	
			Ganglion	G -	M +	
			Cerveau	G -	M +	
Gardel	Banan 112 11 mois p.c.	344	Poumon	G -	M +	M
			Rate	G -	M +	
			Ganglion	G -	M +	
			Cerveau	G -	M +	
	Banan 112	337*	Poumon		M +	M
Rate				M +		
Ganglion				M +		
Cerveau				M +		

G : Gardel, M : Mali, K : Kiswani ; * Chèvres témoins mortes pendant l'expérience.
p.c. : post challenge avec la souche Gardel.

Tableau 10. Proportion de tiques adultes infectées après infections successives à différents stades de développement

Chèvre	Nb de tiques	Souche Banan 112	Souche Gardel
0337	% <i>map1</i> spécifique	100 (4/4)	
0517	% <i>map1</i> spécifique	75 (12/16)	100 (16/16)

5.2.3. Discussion

La transmission est effective à partir du moment où la souche est détectée dans le sang circulant, correspondant à un seuil de concentration que nous n'avons pas pu évaluer faute de tests PCR d'analyse quantitative mais qui serait néanmoins intéressant à déterminer. Ce seuil serait vraisemblablement très proche de celui observé au moment de la détection. Le taux d'infection des tiques plus faible pour les tiques tombées au tout début de la détection dans le sang augmente avec l'élévation de la température durant la cinétique suggérant que la température augmente si la rickettsiémie augmente. La transmission dépend donc de la cinétique de l'infection dans le sang mais elle est surtout dose dépendante.

En observant les différences d'intervalles entre les moments de détection pour les deux souches, dans les deux expériences de co-infection en simultanée, on constate qu'elles peuvent varier selon les chèvres entre 1 à 2 jours pour l'expérience 1 ou 2 à 4 jours pour l'expérience 2. Lamba 479 qui est détectée en premier semble plus adaptée que Gardel dans l'hôte et possède une vitesse de multiplication supérieure à celle de Gardel. Ceci pourrait lui procurer momentanément une meilleure valeur sélective (capacité relative à survivre et à être transmis).

Le pourcentage de tiques infectées par cette première souche qui circule est en effet plus élevé et il est d'autant plus élevé que les moments de circulation dans le sang des deux souches sont éloignés. Par conséquent, il semble que la souche Lamba 479 serait plus facilement transmise au prochain hôte que Gardel. Un certain parallélisme avec ce qui est observé sur le terrain est en effet intéressant à noter. L'allèle *map1* de Lamba 479 est l'un des plus fortement représentés dans les populations de *E. ruminantium* dans les quatre villages du Burkina Faso chez l'hôte (publication soumise à Vaccine, CIRAD/CIRDES/IBET). Tandis que l'allèle *map1* de Gardel figure parmi les allèles rarement rencontrés. La capacité de certaines souches à se développer de manière

optimale chez l'hôte pourrait ainsi avoir une influence sur leur distribution et leur dominance sur le terrain. Ceci nécessite une confirmation par la conduite d'autres expériences de co-infection mais cette fois-ci entre une souche ayant un allèle *map1* de fréquence élevée et une autre d'un allèle rare d'une même région.

Les tiques *A. variegatum* utilisées dans ces expériences en conditions contrôlées sont de souches guadeloupéennes élevées dans les conditions de laboratoire (température de 27°C, hygrométrie à 98%). Pour l'étude de la compétence vectorielle, le nombre de tiques analysées est peu nombreux pour pouvoir émettre des conclusions. Néanmoins, les taux d'infection de cette souche de tiques (60 à 100% pour Lamba 479 ou de 13 à 80% pour Gardel en fonction de l'intensité de la rickettsiémie) témoignent d'une bonne compatibilité non seulement, comme attendu, vis-à-vis de la souche locale de *E. ruminantium* Gardel mais surtout de la souche africaine allochtone Lamba 479 isolée au Burkina Faso, donc d'une bonne compétence vectorielle globale de la tique *A. variegatum* pour ces deux souches. La compatibilité de la souche de tique de Guadeloupe ne se limite pas à des souches d'*E. ruminantium* du Burkina Faso (Bekuy 255, Banan 112) donc l'Afrique de l'Ouest, mais également à des souches de l'Afrique de l'Est telle que la souche Sankat 430 isolée au Ghana (Bell-Sakyi et al, 1997). La bonne capacité vectorielle d'*A. variegatum* pour les souches isolées dans son aire géographique a déjà été démontrée auparavant. Il ne semble pas y avoir de phénomènes de spécificité d'une souche de tiques à une souche d'*E. ruminantium*, ce qui montre la possible dispersion du pathogène quelque soit la souche de ce vecteur. Les expériences inverses souches d'*E. ruminantium* de Guadeloupe infectant des souches de tiques africaines n'ont pu être réalisées.

La co-infection des tiques n'est observée que lorsque les deux souches sont simultanément détectées dans le sang de la chèvre sur laquelle elles se sont gorgées. Les taux de tiques co-infectées sont alors tout à fait similaires suggérant que la présence simultanée des deux souches et la dose circulante dans le sang sont des facteurs déterminants dans la transmission d'une co-infection de l'hôte au vecteur. Les résultats des expériences d'inoculations des deux souches en décalage de 24 et 48 heures, suggèrent un rôle de l'hôte ou de la première souche détectée qui auraient un effet sur la multiplication et la circulation de la deuxième souche. Ce contrôle d'une souche préexistante sur les autres souches a été observé dans les infections à *A. marginale*, et a

été qualifié de “mécanisme d'exclusion d'infection ” (Kocan et al, 2004). Les multi-infections par des souches de génotypes différents sont alors de fréquences rares (Palmer et al, 2004). La co-infection observée sur le terrain des tiques adultes peut résulter également de l'infection de la même tique, successivement au stade larvaire puis au stade nymphal, sur deux animaux différents infectés la première par une souche et la seconde par une autre souche. Lors des expériences en conditions contrôlées des infections successives de tiques, 100% des nymphes issues de la mue des larves se sont infectées sur la première chèvre et 75% des adultes issus des nymphes nourries sur la deuxième chèvre sont infectées par les deux souches. La taille des échantillons analysés, trop petite, ne permet pas d'émettre des conclusions mais seulement de dire que ceci constituerait une alternative dans la coinfection des tiques à ne pas négliger.

Nous avons montré qu'un animal déjà infecté et ayant survécu à l'infection lors d'une deuxième infection n'aura pas, dans son sang, de circulation de la première souche par laquelle il a été infecté. Seule la deuxième souche inoculée est détectée dans le sang et infecte les tiques. Donc s'il y a des observations sur le terrain d'infection multiple des tiques, cela ne serait probablement pas dû au gorgement de ces tiques sur un animal qui a été successivement malade.

Ceci conforte les observations faites par d'autres auteurs concernant la disparition d'*E. ruminantium* dans le sang circulant des animaux malades et guéris spontanément ou traités. Des re-circulations par intermittence de la rickettsie ont été néanmoins observées mais les tiques s'en infectent difficilement (Camus, 1992). De plus, un rôle quelconque de la tique ou de la souche inoculée en dernier dans l'hypothèse d'une re-circulation de la souche inoculée auparavant et dont l'hôte serait porteur, n'a pas pu être établi. Les typages dans les organes des animaux morts de cowdriose au cours de ces expérimentations montrent que seule la souche hétérologue (la seconde souche inoculée) est présente alors que dans les organes des chèvres ayant survécu à l'épreuve hétérologue et abattues plusieurs mois après, aucune souche n'est détectée. L'hypothèse est que si l'infectiosité du sang pour les tiques n'est pas continue dans le temps mais se fait de manière intermittente pendant le portage, les rickettsies seraient alors stockées dans d'autres parties du corps. L'absence de la rickettsie dans ces principaux organes de prédilection, pourrait signifier que le cerveau, les poumons, la rate et les ganglions mésentériques ne sont pas les organes où est localisée *E. ruminantium* pendant le portage asymptomatique. Il serait intéressant de déterminer les organes de l'hôte où le pathogène niche.

En essayant d'expliquer la situation épidémiologique selon laquelle il y a beaucoup moins de tiques co-infectées que d'hôtes co-infectés sur le terrain, il ressort de notre étude expérimentale qu'une tique co-infectée résulte beaucoup plus sûrement d'un repas sanguin pris sur un animal co-infecté avec présence simultanée des souches dans le sang que sur un animal ayant été infecté par deux souches successivement dans le temps. L'autre possibilité serait que la même tique s'infecte à deux différents stades (larve et nymphe) de son cycle biologique. La probabilité de se nourrir successivement sur deux animaux infectés au bon stade pour assurer une transmission, reste toutefois faible, car les souches portées par les animaux guéris ou traités suite à la cowdriose infectent difficilement les tiques.

Les observations sur les mécanismes de transmission ont aussi permis de montrer que : 1) la précocité d'une souche à entraîner une concentration détectable dans le sang peut lui procurer un avantage pour l'infection des tiques ; 2) les souches circulant à de faibles doses infectent moins de tiques donc seront peu transmises. Par conséquent, à un moment donné, des souches seraient plus représentées dans la population et auront donc des fréquences alléliques ou génotypiques plus élevées comparées aux autres souches. En Gambie, des souches dont les profils de restriction sont similaires au génotype *map1* de la souche isolée à Kerr Siringe et portant le même nom, sont identifiées dans les trois zones agroécologiques et montrent la plus forte distribution de fréquence (Faburay et al, 2008). Ce qui suggère une évolution par une sélection fréquence dépendante (se définissant comme le processus évolutif par lequel le fitness d'un allèle, un génotype ou un phénotype va dépendre de sa fréquence relative par rapport aux autres allèles ou génotypes dans une population donnée). C'est une hypothèse qui mérite d'être démontrée par des études sur le terrain et qui pourrait fournir des informations sur la manière dont les souches de génotypes divers fluctuent dans le temps.

Les résultats acquis dans ce chapitre 5 fait déjà l'objet d'un article en cours de rédaction. Le titre proposé est "The mechanisms of transmission of *Ehrlichia ruminantium* multiple strains : Applications on field data to explain the pathogen populations structure ", Il sera soumis à la revue Veterinary Microbiology. Les auteurs sont **Raliniaina M**, Pinarello V, Aprelon R, Kandassamy Y, Sheikboudou C, Stachurski F, Adakal H, Lefrançois T, Martinez D et Vachiéry N.

Chapitre 6 - Discussion générale, conclusions et perspectives

En nous référant à nos deux zones d'étude où les dynamiques des populations de tiques diffèrent en fonction de la durée des périodes de pluies, on constate que les taux d'infestation des élevages et des animaux sont différents. En Guadeloupe et à Marie Galante, les tiques sont actives toute l'année et engendrent plusieurs générations. Les taux d'infestation moyens des élevages sont de 35,6% en Guadeloupe et 79 % à Marie Galante et les taux d'infestation individuelle des bovins sont de 14 et 44 % en 2003 (Vachiéry et al, 2008). En 2005, à Marie Galante, la prévalence d'infestation des élevages et la prévalence d'infestation individuelle sont équivalentes aux observations de 2003 (73.8% et 42.3%). Ces prévalences sont néanmoins nettement plus faibles que dans notre zone d'étude représentant la région du Bongolava dans le Moyen Ouest malgache. Les taux d'infestations observés en début de la période d'abondance des tiques (septembre), sont respectivement de 100 % et de 68,9 % pour les élevages et les bovins. Des traitements acaricides pratiqués périodiquement sur les animaux en Guadeloupe pourraient expliquer la différence d'infestation même s'il est apparu que les traitements à l'amitraz tels qu'effectués semblent inefficaces (Molia et al, 2008). A Madagascar, le plus souvent, c'est lors d'infestations massives observées sur les animaux que le détiqage est fait à la main pour les zébus tandis que les animaux de races améliorées sont traités par pulvérisation d'acarides mais généralement sur les parties en déclive du corps. La deuxième différence entre les deux zones d'étude, concerne les taux d'infection des tiques par *E. ruminantium* qui sont plus élevés en Guadeloupe et Marie Galante, 36,7 % et 19,1% (Martinez et al, 2004 ; Vachiery et al, 2008) et que dans la région du Bongolava, où la prévalence d'*E. ruminantium* dans les tiques est plus faible (11,9 %). Ce taux d'infection des tiques dans le Bongolava est similaire à ceux observés au Burkina Faso, 9 % (données non publiées d'Adakal H) et en Gambie, 1,6 à 15,1 % (Faburay et al, 2007). Les trois régions présentent des dynamiques de populations de tiques identiques avec une unique période de pluies dans l'année. En revanche, aux Comores sous un climat similaire à celui de la Guadeloupe, le taux d'infection des tiques de 26 % (communication personnelle de Vachiéry N) est tout aussi élevé. Il existe des disparités des taux d'infection des tiques par *E. ruminantium* entre îles où les climats sont identiques : à Antigua, le taux d'infection des tiques est faible 5,8%. Plusieurs facteurs pourraient avoir une influence sur le taux d'infection des tiques par *E. ruminantium* dont la saisonnalité des pics d'infestation. Une étude plus

poussée à la fois sur les facteurs environnementaux et les niveaux de prévalence de la maladie chez l'hôte serait nécessaire pour évaluer l'impact de ces facteurs.

Cependant, ces différences de taux d'infestation ou de taux d'infection de tiques ne semblent pas influencer le polymorphisme génétique de *E. ruminantium* qui est relativement élevé pour des zones d'étude aussi restreintes. En incluant les nouveaux allèles de séquences inconnues, on a détecté 12 allèles au locus *map1* dans quatre villages au Burkina Faso distant d'une vingtaine de kilomètres (Article en Annexe 1, Martinez et al, 2004 ; Article en Annexe 3, Raliniaina et al, 2010), 8 allèles dans l'archipel guadeloupéen, 3 à Antigua (Article en annexe 2, Vachiéry et al., 2008) et 3 allèles dans le Bongolava, Moyen Ouest malgache (Article en Annexe 3, Raliniaina et al., 2010). Faburay et al. (2007) observent également un polymorphisme élevé en identifiant au moins 11 génotypes *map1* différents en Gambie avec une fréquence de distribution majoritaire pour une des souches déjà isolées, Kerr Seringe.

Les familles de gènes paralogues codant pour des protéines polymorphiques de surface membranaires existent dans de fortes proportions chez les bactéries pathogènes ayant des génomes de petites tailles et joue probablement un rôle important, principalement dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (Palmer et al, 2002), mais aussi dans les interactions en général avec leur hôte et leur vecteur. Six gènes polymorphes, *map1+1*, *map1*, *map1-2*, *map1-5*, *map1-6* et *map1-14*, de la famille multigénique *map* ont ainsi été choisis pour la caractérisation de la diversité génétique d'*E. ruminantium*. L'arbre obtenu par la méthode du Neighbor - Joining à partir des séquences protéiques de ces gènes montre une bonne discrimination des souches. L'utilisation des séquences de la protéine MAP1 permet de faire le typage génétique de souches de même origine géographique ou d'origine géographique différente, ainsi que l'identification de nouveaux allèles ayant de séquences inconnues, sinon de génotypes, et qui sont présents dans toutes les zones étudiées. En comparant les séquences d'acides aminés de la protéine dérivée du gène *map1* appartenant à un nouvel allèle et celle de la souche de référence la plus proche, de petites variations (substitutions et délétions) sont observées suggérant que ce gène est encore sous pression de sélection. Différentes souches d'origines géographiques diverses peuvent présenter un même allèle au locus *map1* et ces allèles *map1* peuvent être retrouvés à l'échelle de village, de régions et de continent indépendamment des périodes d'introduction (comme dans les Caraïbes) ou des brassages et échanges continuels (Afrique). Par conséquent, le gène *map1* n'est pas un

marqueur géographique même s'il reste un bon outil de typage. Le cas de Madagascar (2 nouveaux géotypes sur 3) nécessite néanmoins des études plus approfondies, le nombre d'isolats identifiés étant trop faible pour émettre des hypothèses sur la génération de souches de géotypes inconnus. Les 2 allèles identifiés à Madagascar sont proches des allèles présents sur le continent.

Les six gènes que nous avons utilisés sont des gènes non sélectionnés [de pression de sélection neutre] permettant de détecter beaucoup plus de diversité génétique par conséquent la coexistence de nombreux variants. Nos travaux ont alors montré que :

- L'ensemble des prélèvements présentant un même allèle MAP1 peut différer aux cinq autres loci MAP. Toutes les souches originaires d'Afrique de l'ouest ayant un géotype MAP1 Sénégal restent de géotype Sénégal aux autres locus MAP, mais la souche Lamba 479 p14 de géotype MAP1 Kiswani, présente les allèles Sénégal pour MAP1-14, MAP1-6, MAP1-5, MAP1+1, mais pas au locus MAP1-2. De plus, des souches de géotypes MAP1 Mali (Banan 112 p7) et Kiswani (Bekuy 255 p5) présentent également un géotype Sénégal pour les cinq autres MAP. La variabilité génétique observée au sein des paralogues est surprenante pour une famille multigénique ainsi organisée. Ceci pourrait être expliqué par un événement de recombinaison homologue par le passé. Un tel mécanisme évolutif qui serait bien plus fréquent chez *E. ruminantium* par rapport à ce qui avait été soupçonné, a été signalé auparavant par Hughes et French (2007) et dans des analyses phylogénétiques de gènes acquis par transferts horizontaux et partagés par les membres d'une espèce donnée, les "core function" (Allsopp et Allsopp, 2007). Cependant la souche Cameroun p9 et la souche Welgevonden (Afrique du Sud) se regroupent ensemble à tous les locus, ce qui suggère qu'elles appartiennent à un même clone initial, répandu à travers l'Afrique. Pendant très longtemps, on a pensé que les bactéries, de par leur mode de multiplication par fission binaire, ne pouvaient évoluer que par accumulation de mutations ponctuelles, et donc que leur évolution était clonale. L'origine du polymorphisme génétique à un locus avait donc eu pour origine unique la mutation dans la population. Maintenant, il est établi qu'elles utilisent une forme peu commune d'évolution sexuée, décrit comme étant du sexe localisé (Maynard-Smith et al, 1991), consistant en un remplacement d'une région du génome ou des gènes d'une lignée clonale par une région ou de gènes

correspondants provenant d'une autre lignée clonale d'une même espèce. Dans notre étude, l'existence de complexes clonaux (groupes de clones qui ont les allèles identiques au moins à cinq gènes marqueurs *map*) stables dans le temps est démontrée. Mais la non congruence constatée en comparant les arbres générés par les différentes protéines MAP tendent à confirmer également de l'existence de la recombinaison homologe entre les clones. Comme la plupart des bactéries, *E. ruminantium* n'est donc ni strictement asexuée ni entièrement sexuée. Les analyses par la méthode MLST (Multi Locus Sequence typing) de gènes de ménage sur quelques espèces de bactéries (Hanage et al, 2006) démontrent que la recombinaison homologe est plus importante que les mutations ponctuelles dans leur évolution. Sur des souches de *E. ruminantium* du Burkina Faso, l'occurrence de cas de recombinaison et de déséquilibre de liaison a été démontrée en utilisant également des gènes de ménage (Adakal et al, 2009). Des études montrent que l'exceptionnelle stabilité de certains organismes intracellulaires comme les *Ehrlichia* n'interdit cependant pas les flux de gènes (Wernegreen et al, 2005). L'hypothèse de Allsopp et Allsopp (2007) est que la recombinaison aurait lieu dans la lumière intestinale de la tique *Amblyomma* après un repas sanguin sur un hôte infecté. Il faut noter également l'existence de recombinaison entre paralogues, évoquée chez *E. ruminantium* lors d'une étude sur deux sub-populations de l'isolat Gardel maintenues dans deux différents laboratoires qui a montré la recombinaison entre *map1-3* et *map1-2* dans une des sub-populations avec délétion d'un gène entier (Bekker et al, 2005). Il a été montré lors d'études précédentes, des variations d'expression de gènes de la famille *map* suivant la présence du pathogène chez l'hôte ou le vecteur. Les différentiels d'expression observés peuvent être associés à des forces de pression de sélection différentes qui conduisent à de la variabilité génétique des gènes *map* ;

- En utilisant les marqueurs MAP, nous avons montré qu'il n'y a pas d'influence de la durée de l'introduction des souches (ponctuelle pour la Caraïbe et continue pour l'Afrique et Madagascar) sur l'évolution de la famille multigénique MAP puisque aucune distinction n'est possible via les MAP entre les souches de la Caraïbe et les souches d'Afrique.
- Les trois gènes paralogues *map1-14*, *map1-6* et *map1-5*, situés en amont du locus de la famille multigénique pourraient être des marqueurs géographiques en

regroupant dans deux clades distincts les souches de l'ouest et les souches du sud de l'Afrique et des Caraïbes. Ce regroupement en deux clades a été évoqué pour des analyses phylogénétiques des gènes conservés d'*E. ruminantium* (Steyn et al, 2003 ; Allsopp et al, 2003) ou de gènes de " core function ", (Allsopp et Allsopp, 2007). Le nombre de souches caractérisées dans toutes ces études ainsi que l'existence de régions plus représentées que d'autres laissent néanmoins penser à un biais d'échantillonnage. La recherche de l'origine géographique des souches nécessitera d'autres études utilisant deux approches différentes : la MLST utilisant des gènes de ménage et le Multiple Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) donc un typage de répétitions de tandem polymorphes. Ces deux approches complémentaires devraient permettre de faire des études de phylogénie et de phylogéographie des souches d'*E. ruminantium*.

Durant notre travail, nous avons également mis au point des outils moléculaires plus sensibles (PCRs nichées *pCS20* et *map1*) et plus spécifiques (PCRs nichées *map1* spécifiques de souches) qui peuvent être utilisés dans le diagnostic de la cowdriose et pour le typage des souches d'*E. ruminantium*, lorsque la diversité locale des clones est limitée ou lors d'expériences d'infections multiples utilisant des souches de laboratoire en conditions contrôlées.

Concernant les PCRs nichées *map1* spécifiques de souches, elles permettent de typer directement des souches, mêmes en de faibles concentrations, lors d'infections en milieu contrôlé avec souches multiples mais connues, chez l'hôte mammifère comme chez la tique vectrice. De façon générale, pour que la transmission d'*E. ruminantium* de l'hôte à la tique soit effective, une présence détectable dans le sang circulant ne serait pas suffisante : il faudrait qu'une dose seuil, qui reste à déterminer, soit atteinte. La transmission serait donc dose dépendante, le taux d'infection des tiques augmentant avec la dose circulante. La capacité vectorielle de la tique est également importante dans la transmission. Ainsi la compétence vectorielle globale de la tique *A. variegatum* guadeloupéenne vis-à-vis de différentes souches aussi bien autochtones ou allochtones (Afrique), a été démontrée.

La tique peut être ainsi multi - infectée suivant deux processus distincts : 1) sur un hôte multi - infecté avec présence détectée et en simultanée des souches et à partir d'une certaine dose circulante dans le sang, par conséquent la transmission simultanée d'une infection multiple se fait en fonction de la dose circulante de chacune des souches ; 2)

par des infections séparées de différents stades de développement (larves et nymphes) de la tique sur deux hôtes infectés différents mais la deuxième infection dépendra de la probabilité de rencontrer le second hôte infecté. Ces états de faits peuvent expliquer que les tiques infectées par des souches multiples sont présentes en de faibles proportions dans le milieu réel, 6 à 8 % si on se réfère aux études faites dans le cadre de notre travail (Martinez et al., 2004 ; Vachiéry et al., 2008) et dans des études réalisées en Gambie (Faburay et al., 2007a).

Nous avons également montré que lors d'une infection par des souches multiples, certaines souches sont avantagées par une vitesse de multiplication plus grande qui résulte en une transmission à un plus grand nombre de tiques. Le taux d'infection des tiques par cette souche est alors plus élevé. La deuxième souche circulant à faibles doses, est peu transmise voire pas du tout. Lors d'études sur le terrain, l'allèle Kiswani de la souche Lambda479 représente l'un des allèles les plus fréquemment rencontrés dans les quatre villages au Burkina Faso, alors que l'allèle Gardel est présent à faible fréquence. Ainsi à un niveau local, les allèles de fréquence relative élevée semblent être favorisés, et pourraient constituer des valences vaccinales. Signalons que dans les expériences de challenge homologues sur des animaux vaccinés, la réinfection par la souche vaccinale (Gardel ou Sénégal inactivées, Welgevonden atténuée) est observée. Les animaux présentent toutefois une hyperthermie fugace et de symptômes moins sévères. Si un même clone de fréquence relative élevée peut réinfecter le même hôte et être facilement transmis au vecteur, pourrait-on dire que la sélection des clones dans les populations naturelles est fréquence dépendante favorisant ainsi les allèles communs? De plus, les différences dans les cinétiques d'infection suggèrent aussi bien des influences de l'hôte mais également de la première souche présente dans le sang qui, dans le cas de notre étude, pourrait entraîner un phénomène d'exclusion d'infection, comme cela a été évoqué chez *A. marginale*, une autre rickettsie transmise par les tiques. Les facteurs impliqués dans les mécanismes de transmission des souches de l'hôte au vecteur ainsi que leurs éventuelles conséquences sur les structures et l'évolution des populations d'*E. ruminantium* dans le temps ont commencé à être analysés, L'étude du rôle des tiques et de l'hôte dans la distribution des souches et leur structuration mérite d'être poursuivie sachant que les modèles expérimentaux et les outils de détection sont en place.

La cowdriose, maladie qui sévit principalement dans les élevages de rente des ruminants, a un impact économique important. Une lutte contre la tique vectrice seule s'avère insuffisante en ce sens qu'une seule tique infectée peut transmettre la maladie. Les essais de vaccination ont buté sur l'existence d'une grande diversité génétique de l'agent pathogène *E. ruminantium* sur le terrain. Notre étude a permis de montrer que des protéines polymorphes de membrane externe de la famille multigénique *map* sont des outils efficaces pour la caractérisation de cette diversité génétique d'*E. ruminantium*, le gène *map1* étant un excellent marqueur. Les mécanismes évolutifs à l'origine de cette diversité mélangeraient à la fois évolution de lignées clonales stables dans le temps avec accumulation de mutations ponctuelles et mécanismes de sexualité par la recombinaison homologe. La combinaison de ces mécanismes pourrait être à l'origine de la plasticité adaptative et de la diversité antigénique de la bactérie. Des regroupements géographiques paraissent exister mais nécessitent une étude sur un plus grand nombre d'isolats et en utilisant des marqueurs génétiques plus appropriés pour confirmation.

Perspectives

Dans le cas de Madagascar, des tests de détection et de typage d'ER à haut débit dans les tiques *A. variegatum* sont effectués pour une étude spatio-temporelle des géotypes. Le développement d'outils de typage moléculaire, MLST et MLVA, est actuellement en cours dans le cadre du Projet CRVOI / Introduction et endémisation de la cowdriose dans les îles de l'Océan indien : étude de la diversité génétique d'*Ehrlichia ruminantium* et de sa tique vectrice *Amblyomma variegatum*, et devrait permettre de mieux connaître la structure des populations du pathogène et de faire un géotypage. Un échantillonnage plus représentatif des zones agroécologiques de Madagascar sera alors fait, pour ainsi également actualiser les données épidémiologiques.

Dans un objectif final de modélisation de la transmission, les expériences sous conditions contrôlées seront poursuivies :

- Pour la coinfection, des essais avec un cocktail de plus de deux souches affinés avec des effets doses pour valider les différences de comportement entre les souches,
- En surinfection des tiques, des essais également avec plus de souches,
- Pour la compétence vectorielle des *A. variegatum* de Guadeloupe, des essais de transmission hôte -vecteur avec des doses plus faibles d'ER pour déterminer la dose

seuil à laquelle les tiques arrivent à s'infecter et donc leur compétence à capter la rickettsie ; puis l'étendre à d'autres populations de tiques comme celles de Madagascar,

- Pour compléter toute cette étude de compétence vectorielle, des essais de transmission vecteur – hôte afin de déterminer les souches transmises et la variabilité de cette transmission,
- Concernant le portage asymptomatique, des essais sur des porteurs sains pour valider leur statut et déterminer le taux d'infection des tiques.

Notre objectif final est l'amélioration de l'efficacité des vaccins contre la cowdriose. Or, les six gènes *map* utilisés n'ont pas permis de mettre en évidence des groupes géographiques ou de protection croisée. La recherche de marqueurs qui caractériseraient des groupes phénotypiques (virulence, protection croisée ...) est envisagée. Trois génomes complets sont maintenant disponibles.

Ainsi le choix de souches vaccinales protégeant contre un panel de souches pourrait être facilité.

Références bibliographiques

- Adakal H, Meyer DF, Carasco-Lacombe C, Pinarello V, Allègre F, Huber K, Stachurski F, Morand S, Martinez D, Lefrançois T, Vachiery N, Frutos R. 2009. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso. *Infect, Genet Evol.* **9** : 1320–1328
- Ahoussou S, Lancelot R, Sanford B, Porphyre T, Bartlette-Powell P, Compton E., Henry L, Maitland R, Lloyd R, Mattioli R, Chavernac D, Stachurski F, Martinez D, Meyer DF, Vachiery N, Pegram R, Lefrançois T. 2010. Analysis of *Amblyomma* surveillance data in the Caribbean: Lessons for future control programmes. *Vet Parasitol.* **167** : 327–335
- Allan SA, Barré N, Sonenshine DE, Burridge MJ. 1998. Efficacy of tags impregnated with pheromone and acaricide for control of *Amblyomma variegatum*. *Med Vet Entomol.* **12**(2):141-50.
- Allan SA, Norval RA, Sonenshine DE, Burridge MJ. 1996. Efficacy of tail-tag decoys impregnated with pheromone and acaricide for control of bont ticks on cattle. *Ann N Y Acad Sci.* **23**;791:85-93.
- Allsopp M.T. & Allsopp B.A. 2007. Extensive genetic recombinaison occurs in the field between different genotypes of *Ehrlichia ruminantium*. *Vet Microbiol.* **124** : 58–65.
- Allsopp M.T., Dorfling C.M., Maillard J.C., Bensaid A., Haydon D.T., van Heerden H. & Allsopp B.A. 2001. *Ehrlichia ruminantium* major antigenic protein gene (*map1*) variants are not geographically constrained and show no evidence of having evolved under positive selection pressure. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 4200-4203.
- Allsopp M.T., van Heerden H., Steyn H.C. & Allsopp B.A. 2003. Phylogenetic relationship among *Ehrlichia ruminantium* isolates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **990**: 685-691.
- Allsopp MT, Allsopp BA. 2001. Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa. *J Clin Microbiol.* **39**(11):4204-7.
- Allsopp MTEP, Louw M & Meyer EC. 2005. *Ehrlichia ruminantium*: An emerging human pathogen? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1063**: 358-360.
- Andersson SG and Kurland CG. 1998. Ancient and recent horizontal transfer events: the origins of mitochondria. *APMIS*, **84**:5-14. Review.
- Andrew HR & Norval RAI. 1989. The carrier status of sheep, cattle and African buffalo recovered from heartwater. *Vet. Parasitol.* **34**: 261 -266.
- Barbet AF, Byrom B and Mahan SM. 2009. Diversity of *Ehrlichia ruminantium* major protein 1-2 in field isolates and infected sheep. *Infect Immun.*, **77**(6):2304-10.
- Barbet AF, Semu SM, Chigagure N, Kelly PJ, Jongejan F and Mahan SM. 1994. Size Variation of the Major Immunodominant Protein of *Cowdria ruminantium*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **1** (6) : 744-746.
- Barré N et Camus E. 1984. Etude épidémiologique de la cowdriose (heartwater) aux Antilles. Rapport annuel 1983. Antilles-Guyane. Mission IEMVT. 25 p
- Barré N, Camus E, Fifi J, Fourgeaud P, Numa G, Rose-Rosette F, Borel H. 1996. Tropical bont tick eradication campaign in the French Antilles. Current status. *Ann N Y Acad Sci.* **791**:64-76.
- Barré N, Camus E. 1987. The reservoir status of goats recovered from heartwater. *Onderstepoort J Vet Res.*, **54**(3):435-7.

- Barré N, Garris G, Camus E. 1995. Propagation of the tick *Amblyomma variegatum* in the Caribbean. *Rev Sci Tech.* **14**(3):841-55.
- Barré N, Ulilenberg G, Morel PC & Camus E. 1987. Danger of introducing heartwater onto the American mainland: Potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J. vet. Res.* **54**, 397-403
- Bekker CP, Vink D, Lopes Pereira CM, Wapenaar W, Langa A, Jongejan F. 2001. Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) as a cause of postrestocking mortality of goats in Mozambique. *Clin Diagn Lab Immunol.* **8**(4):843-6.
- Bekker CPJ, Postigo M, Taoufik A, Bell-Sakyi L, Ferraz C, Martinez D and Jongejan F. 2005. Transcription Analysis of the Major Antigenic Protein 1 Multigene Family of Three In Vitro-Cultured *Ehrlichia ruminantium* Isolates. *J Bacteriol.* **187** (14) 4782–4791.
- Bekker, CP, Bell-Sakyi LPaxton EA, Martinez D, Bensaid A and Jongejan F. 2002. Transcriptional analysis of the major antigenic protein 1 multigene family of *Cowdria ruminantium*. *Gene*, **285**:193–201.
- Bell-Sakyi L, Koney EB, Dogbey O, Sumption KJ, Walker AR, Bath A, Jongejan F. 2003. Detection by two enzyme-linked immunosorbent assays of antibodies to *Ehrlichia ruminantium* in field sera collected from sheep and cattle in Ghana. *Clin Diagn Lab Immunol.* **10**(5):917-25.
- Bezuidenhout DL, Prozesky JL, Du Plessis L, Van Amstel SR. 1994. Heartwater. In *Infectious Diseases of Livestock. With Special Reference to Southern Africa.* Coetzer JAW, Thomson G R, Tustin RC & Kriek NP, Eds.: 351 -370. Oxford University Press. Oxford, England.
- Bezuidenhout JB. 1987. Natural transmission of heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 349-51.
- Birnie E.F., Burrige M.J., Camus E. and Barré N. 1985. Heartwater in the Caribbean: isolation of *Cowdria ruminantium* from Antigua. *Vet Rec.* **116**(5):121-3.
- Bradley DG and Magee D. 2006. Genetics and the origins of domestic cattle. In M.A. Zeder, E.Emshwiller, B.D. Smith & D.G. Bradley, eds. *Documenting domestication: new genetics an archaeological paradigm*, California, USA. University of California Press, 317–328.
- Bradley, D.G., MacHugh, D.E., Cunningham, P. and Loftus, R.T. 1996. Mitochondrial DNA diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**(10): 5131–5135.
- Burrige MJ, Simmons LA, Allan SA. 2000. Introduction of potential heartwater vectors and other exotic ticks into Florida on imported reptiles. *J Parasitol.* **86**(4):700-4.
- Burrige MJ, Simmons LA, Peter TF, Mahan SM. 2002. Increasing risks of introduction of heartwater onto the American mainland associated with animal movements. *Ann N Y Acad Sci.* **969**:269-74.
- Burrige MJ, Simmons LA, Simbi BH, Peter TF, Mahan SM. 2000b. Evidence of *Cowdria ruminantium* infection (heartwater) in *Amblyomma sparsum* ticks found on tortoises imported into Florida. *J Parasitol.* **86**(5):1135-6.
- Byrom B, Mahan SM and Barbet AF. 1993. The development of antibody to *Cowdria ruminantium* in mice and its role in heartwater disease. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.* **46** : 197-201.
- Camus E et Barré N. 1988. La cowdriose (Heartwater). *Revue générale des connaissances. Etudes et synthèses de l'IEMVT.* Cirad, 152p.

- Camus E, Barré N, Birnie EF, Burrige MJ and Uilenberg G. 1984. Répartition de la cowdriose (heartwater) aux Antilles. *In* : Les maladies de la chèvre. Colloque Int. Niort, France, 9-11 oct 1984.
- Camus E, Maillard JC, Ruff G, Pepin L, Naves M et Matheron G. 1996. Genetic resistance of Creole goats to cowdriosis in Guadeloupe. Status in 1995. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **791**:46-53.
- Camus E. 1987. Contribution à l'étude épidémiologique de la cowdriose (*Cowdria ruminantium*) en Guadeloupe. Thèse Doct. Sci., Université de Paris-Sud. Orsay. 202 p.
- Camus E. 1992. Asymptomatic carrier state of Creole goats and cattle after recovery from *Cowdria* infection in Guadeloupe. *Rev. Elev. Med.Vet. Pays Trop.* **45** (2), 133-135.
- Camus E, Maillard JC, Ruff G, Pepin L, Naves M and Matheron G. 1996. Genetic resistance of Creole goats to cowdriosis in Guadeloupe. Status in 1995. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **791**:46-53.
- Chen SL, Hung C-S, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, Blasiar D, Bieri T, Meyer RR, Ozersky P, Armstrong JR, Fulton RS, Latreille JP, Spieth J, Hooton TM, Mardis ER, Hultgren SJ and Gordon JI. 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. *PNAS*, **103** (15): 5977–5982.
- Collins NE, Liebenberg J, de Villiers EP, Brayton KA, Louw E, Pretorius A, Faber FE, van Heerden H, Josemans A, van Kleef M, Steyn HC, van Strijp MF, Zweygarth E, Jongejan F, Maillard JC, Berthier D, Botha M, Joubert F, Corton CH, Thomson NR, Allsopp MT and Allsopp BA. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *PNAS* **102** (3): 838–843
- Corn J.L., Barré N., Thiebot B., Creekmore T.E., Garris G.I., Nettles V.F. 1993. Potential role of cattle egrets, *Bubulcus ibis* (Ciconiformes: *Ardeidae*), in the dissemination of *Amblyomma variegatum* (Acari: *Ixodidae*) in the eastern Caribbean. *J. Med. Entomol.* **30**, 1029–1037.
- Corn JL, Snyder BD, Barré N, Garris GI. 1994. Effect of acaricide treatment of cattle on *Amblyomma variegatum* (Acari: *Ixodidae*) infestation of mongooses (Carnivora: *Viverridae*: *Herpestes auropunctatus*) in Guadeloupe, French West Indies. *J Med Entomol.* **31** : 490-5.
- Courmes E. 1961. Rapport technique. Archs. Inst. Pasteur, Guadeloupe, 40-41
- Cowdry EV. 1925a. Studies on the etiology of heartwater : I. Observation of a *Rickettsia*, *Rickettsia ruminantium* (n. sp.) in the tissues of infected animals. *J. exp. Med.*, **42**, 231-252.
- Cowdry EV. 1925b. Studies on the etiology of heartwater : II. *Rickettsia ruminantium* (n. sp.) in the tissues of ticks transmitting the disease. *J. exp. Med.*, **42**, 253-274.
- Cowdry EV. 1926. Studies on the etiology of heartwater : III. The multiplication of *Rickettsia ruminantium* within the endothelial cells of infected animals and their discharge into the circulation. *J. exp. Med.*, **44**, 803-814.
- De La Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Rodríguez SD, García MA, Kocan KM. 2001. Evolution and function of tandem repeats in the major protein 1a of ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim Health Res Rev.*, **2**(2):163-73.
- De la Fuente J, Van Den Bussche RA, Prado TM and Kocan KM. 2003. *Anaplasma marginale msp1a* genotypes evolved under positive selection

pressure but are not markers for geographic isolates. *J Clin Microbiol.* **41**(4) : 1609–1616

- De Villiers EP, Brayton KA, Zwegarth E and Allsopp BA. 2000. Genome size and genetic map of *Cowdria ruminantium*. *Microbiology*, **146**, 2627–2634.
- Deem et al, 1996. Demonstration of vertical transmission of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, from cows to their calves. *Vet Parasitol.* **61**(1-2):119-32.
- Du Plessis JL, 1982. Mice infected with a *Cowdria ruminantium* agent as a model in the study of heartwater. Thesis, Veterinary Science, University of Pretoria, South Africa.
- Du Plessis JL, Kumm NA. 1971. The passage of *Cowdria ruminantium* in mice. *J S Afr Vet Med Assoc.*, **42**(3):217-21.
- Du Plessis JL, Potgieter FT & Van Gas RL. 1990. An attempt to improve the immunization of sheep against heartwater by using different combinations of 3 stocks of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **57**: 205-208.
- Du Plessis JL, Van Gas L, Olivier JA, Bezuidenhout JD. 1989. The heterogeneity of *Cowdria ruminantium* stocks: cross-immunity and serology in sheep and pathogenicity to mice. *Onderstepoort J Vet Res.* **56**(3):195-201.
- Du Plessis JL. 1985. A method for determining the *Cowdria ruminantium* infection rate of *Amblyomma hebraeum*: effects in mice injected with tick homogenates. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**:55–61
- Du Plessis JL, Camus E, Oberem PT and Malan L. 1987. Heartwater serology: some problems with the interpretation of results. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **54**: 327-329.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y and Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2145–2165
- Durieux VM. 1931. L’amélioration de la race bovine malgache. Thèse Ecole Vétérinaire Lyon. Imprimeries réunies. Chambéry. 110p
- Esteves I, Bensaid A, Martinez D and Totté P. 2002. IFN γ as an indicator of successful immunization of goats vaccinated with a killed *Cowdria ruminantium* vaccine. *Ann N Y Acad Sci.* **969**:126-130.
- Esteves I, Walravens K, Vachiery N, Martinez D, Letesson J-J & Totté P. 2004c. Protective killed *Ehrlichia ruminantium* vaccine elicits IFN- γ responses by CD4+ and CD8+ T lymphocytes in goats. *Vet Immunol Immunopathol*; **98**: 49–57.
- Faburay B, Jongejan F, Taoufik A, Ceesay A, Geysen D. 2008. Genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks and small ruminants in The Gambia determined by restriction fragment profile analysis. *Vet Microbiol*, **126** :189–199
- Faburay B, Geysen D, Ceesay A, Marcelino I, Alves PM, Taoufik A, Postigo M, Bell-Sakyi L, Jongejan F. 2007c. Immunisation of sheep against heartwater in The Gambia using inactivated and attenuated *Ehrlichia ruminantium* vaccines. *Vaccine.* **25**(46):7939-47.
- Faburay B, Geysen D, Munstermann S, Bell-Sakyi L and Jongejan F. 2007b. Longitudinal monitoring of *Ehrlichia ruminantium* infection in Gambian lambs

and kids by pCS20 PCR and MAP1-B ELISA. *BMC Infectious Diseases*, **7**: 85-94

- Faburay B, Geysen D, Munstermann S, Taoufik A, Postigo M, F. Jongejan. 2007a. Molecular detection of *Ehrlichia ruminantium* infection in *Amblyomma variegatum* ticks in The Gambia. *Exp Appl Acarol*, **42**:61–74
- Freeman, A.R., Bradley, D.G., Nagda, S., Gibson, J.P. & Hanotte, O. 2006. Combination of multiple microsatellite datasets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. *Animal Genetics*, **37**(1): 1–9.
- Frutos R, Viari A, Ferraz C, Morgat A, Eychenié S, Kandassamy Y, Chantal I, Bensaid A, Coissac E, Vachiery N, Demaille J, Martinez D. 2006. Comparative Genomic Analysis of Three Strains of *Ehrlichia ruminantium* Reveals an Active Process of Genome Size Plasticity. *J Bacteriol*, **188** (7): 2533–2542.
- Guey A, Mbengue M, Kebe B & Diouf A. 1982. Note épizootiologique sur la cowdriose bovine dans les Niayes au Sénégal. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.***39**: 212-219.
- Hanage W P, Fraser C, Spratt BG. 2006. The impact of homologous recombination on the generation of diversity in bacteria. *J of Theor Biol*, **239** : 210–219
- Hanotte, O., Bradley, D.G., Ochieng, J., Verjee, Y., Hill, E.W. and Rege, J.E.O. 2002. Africa pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *J. exp. Med.*, **42**, 253-274.
- Hartl DL. 1988. Génétique des populations. Traduction par Borot N. Médecine-Sciences, Flammarion, 305p.
- Holland CJ, Logan LL, Mebus CA, and Ristic M. 1987; The serological relationship between *Cowdria ruminantium* and certain members of the genus *Ehrlichia*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 331.
- Hotopp DJC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi N, Zhi N, Nelson W, Brinkac L M, Dodson RJ, Rosovitz M J, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin, AS Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, White O, Rikihisa Y, Tettelin H. 2006. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genet* **2**(2): e21
- Hughes AL and French JO. 2007. Homologous recombination and the pattern of nucleotide substitution in *Ehrlichia ruminantium*. *Gene*, **387**: 31–37
- Ilemobade AA. 1976. Study on heartwater and the causative agent *Cowdria ruminantium* (Cowdry, 1925) in Nigeria. Ph. D. Thesis, Zaria . Ahmadu Belio University. 299 p.
- Jiggins FM, Gregory D. D. Hurst,† and Ziheng Yang†. 2002. Host-Symbiont Conflicts: Positive Selection on an Outer Membrane Protein of Parasitic but not Mutualistic *Rickettsiaceae*. *Mol. Biol. Evol.* **19**(8):1341–1349.
- Jongejan F, Vogel SW, Gueye A, Uilenberg G. 1993. Vaccination against heartwater using in vitro attenuated *Cowdria ruminantium* organisms. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* **46**(1-2):223-7.
- Jongejan F, Wassink LA, Thielemans MJ, Perie NM, Uilenberg G. 1989. Serotypes in *Cowdria ruminantium* and their relationship with *Ehrlichia phagocytophila* determined by immunofluorescence. *Vet Microbiol.* **21**(1):31-40.

- Jongejan F., Thielemans M J.C, Briere C and Uilenberg G. 1991. Antigenic diversity of *Cowdria ruminantium* isolates determined by cross-immunity. *Res. Vet. Sci.* **51**:24–28.
- Jongejan, F. 1992. Experimental transmission of *Cowdria ruminantium* (Rickettsiales) by the American reptile tick *Amblyomma dissimile* Koch, 1844. *Exp. Appl. Acarol.* **15**, 117–121.
- Kakono O, Hove T, Gevsen D, Mahan S. 2003. Detection of antibodies to the *Ehrlichia ruminantium* MAP1-B antigen in goat sera from three communal land areas of Zimbabwe by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **70**: 243-249.
- Katz JB, DeWald R, Dawson JE, Camus E, Martinez D, Mondry R. 1997. Development and evaluation of a recombinant antigen, monoclonal antibody-based competitive ELISA for heartwater serodiagnosis. *J Vet Diagn Invest*, **9**: 130-135.
- Kiel JL, Alarcon RM, Parker JE, Vivekananda J, Gonzalez YB, Stribling LJ, Andrews CJ. 2006. Emerging tick-borne disease in African vipers caused by a *Cowdria*-like organism. *Ann N Y Acad Sci* **1081**:434-42.
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF and Garcia-Garcia JC. 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. **129** : 285-300.
- Lang, B. F., Burger, G., O’Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. & Gray, M. W. 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**, 493–497.
- Loftus, R.T., MacHugh, D.E., Bradley, D.G., Sharp, P.M., Cunningham, P. 1994. Evidence for two independent domestication of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**(7): 2757–2761.
- Logan LL, Holland CJ, Mebus CA, Ristic M. 1986. Serological relationship between *Cowdria ruminantium* and certain *Ehrlichia*. *Vet Rec.*, **119**(18):458-9.
- Logan LL, Whyard TC, Quintero JC, Mebus CA. 1987. The development of *Cowdria ruminantium* in neutrophils. *Onderstepoort J Vet Res.* **54**(3):197-204.
- Lounsbury CP. 1900. Tick heartwater experiments. *Agric J Cape G H.*, **18**: 682-687
- MacKenzie PKI, Van Rooyen RE. 1981. The isolation and culture of *Cowdria ruminantium* in albino mice. *In: Proceedings of an International Congress on Tick Biology and Control*. Rhodes University, Grahamstown, pp. 47–52.
- 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** (11-12):1203-11.
- Mahan SM, Sileghem M, Smith GE & Byrom B. 1996. Neutralization of bovine concanavalin-A T cell supernatant-mediated anti-*Cowdria ruminantium* activity with antibodies specific to interferon gamma but not to tumour necrosis factor. *Parasite Immunol*, ; **18**: 317–324.
- Mahan SM, Waghela SD, McGuire TC, Rurangirwa FR., Wassink LA and Barbet AF. 1992. A Cloned DNA Probe for *Cowdria ruminantium* Hybridizes with Eight Heartwater Strains and Detects Infected Sheep. *J Clin Microbiol*, **30** (4): 981-986.
- Mahan, S.M., Peter, T.F., Simbi, B.H., Kocan, K., Camus, E., Barbet, A.F., BurrIDGE, M.J. 2000. Comparison of efficacy of American and African

- Amblyomma* ticks as vectors of heartwater (*Cowdria ruminantium*) infection by molecular analyses and transmission trials. *J. Parasitol.*, **86**, 44–49
- Maillard JC, Maillard N. 1998. Historique du peuplement bovin et de l'introduction de la tique *Amblyomma variegatum* dans les îles françaises des Antilles: synthèse bibliographique. *Ethnozootecnie*, **61**, 19–36.
 - Mamirova L, Popadin K and Gelfand MS. 2007. Purifying selection in mitochondria, free-living and obligate intracellular proteobacteria. *BMC Evol Biol*, **7**:17-29
 - 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*. *Vet Immunol Immunopathol.* **41**(1-2):153-63.
 - Martinez D, Perez JM, Sheikboudou C, Debus A, Bensaid A. 1996. Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Vet Parasitol.* **67**(3-4):175-84.
 - Martinez D, Swinkels J, Camus E, Jongejan F. 1990. Comparison between 3 antigens for the serodiagnosis of heartwater disease by indirect immunofluorescence. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* **43**(2):159-66.
 - Martinez D. 1997. Analysis of the immune response of ruminants to *Cowdria ruminantium*. Development of an inactivated vaccine. PhD thesis, University of Utrecht, 206p.
 - Martinez D. 2003. Cowdriose. In Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Tome 2, Maladies bactériennes, Mycoses, Maladies parasitaires, Ed Tec & Doc, 1111-1132.
 - Matheron G, Barré N, Camus E and Gogue J. 1987. Genetic resistance of Guadeloupe goats to heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 337-49.
 - Mbengue M, Gueye A, Faye O, Toguebaye BS, Konte M. 2007. Sero-epidemiological study of cowdriosis in Moorish zebu cattle from Senegal. *Parasite*, **14**(2):169-71.
 - Mebus CA and Logan LL. 1988. Heartwater disease of domestic and wild ruminants. *J. Am. Vet. Med., Assoc.*, **192**(7), 950-952
 - Molia S, Frebling M, Vachiéry N, Pinarello V, Petitclerc M, Rousteau A, Martinez D and Lefrançois T. 2008. *Amblyomma variegatum* in cattle in Marie Galante, French Antilles: Prevalence, control measures, and infection by *Ehrlichia ruminantium*. *Vet. Parasitol.* **153**, 338–346
 - Morel, 1966. Etude sur les tiques du bétail de Guadeloupe et Martinique. I. Les tiques et leur distribution. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **19**, 307-321.
 - Moshkovski SD. 1947. Comments by readers. *Science*, **106**, 62.
 - Naves M, Alexandre G, Leimbacher F, Mandonnet N, Menendez-Buxadera A. 2001. Les ruminants domestiques de la Caraïbe : le point sur les ressources génétiques et leur exploitation. *INRA Prod. Anim.*, **14** (3), 181-192
 - Nei M. and Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**:418–426
 - Neitz WO and Alexander RA. 1941. Immunization of calves against heartwater. *J S Afr vet Ass*, **12** (4) :103-111.
 - Neitz WO. 1939. The immunity in heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res. Anim Ind*, **13** (2) : 245-83.

- Neitz WO. 1968. Heartwater. *Bulletin. Office International des Epizooties*, **70**, 328-336.
- Norval RAI, Andrew HR, Yunker CE and Burr ridge MJ. 1992. Biological processes in the epidemiology of heartwater. *In Tick vector biology. Medical and veterinary aspects.* (BH Fivaz, TN Petney and IG Horak, eds). Springer-Verlag. 71-86.
- Oberem PT and Benzuidenhout JD. 1987. Heartwater in hosts other than domestic ruminants. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 271 -275.
- Ochman H and Moran NA. 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*. **292**(5519):1096-9.
- Palmer GH, Knowles DP Jr, Rodriguez JL, Gnad DP, Hollis LC, Marston T, Brayton KA. 2004. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J Clin Microbiol.*, **42**(11):5381-4. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2005, **43**(7):3587.
- Palmer GH. 2002. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. *Vet Immunol Immunopathol*, **85**:1-8.
- Perez J-M, Martinez D, Debus A, Sheikboudou C, Bensaid A. 1997. Detection of genomic polymorphisms among isolates of the intracellular bacterium *Cowdria ruminantium* by random amplified polymorphic DNA and Southern blotting. *FEMS Microbiol Lett*, **154** (1) 73-9.
- Perez J-M, Martinez D, Sheikboudou C, Jongejan F & Bensaid A. 1998. Characterization of variable immunodominant antigens of *Cowdria ruminantium* by ELISA and immunoblots *Parasite Immunol*, **20**: 613–622.
- Perreau P, Morel PC, Barré N and Durand P. 1980. Existence de la coudriose (heartwater) à *Cowdria ruminantium* chez les ruminants des Antilles françaises (La Guadeloupe) et des Mascareignes (La Réunion et Ile Maurice). *Rev. Elev. Med.Vet. Pays Trop.* **33**, 21–22.
- Peter TF, Barbet AF, Alleman AR, Simbi BH, Burr ridge MJ and Mahan SM. 2000. Detection of the Agent of Heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* Ticks by PCR: Validation and Application of the Assay to Field Ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **385**(4) :1539–1544.
- Peter TF, Burr ridge MJ and Mahan SM. 2002. *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol.* **18**(5):214-8.
- Peter TF, O’Callaghan CJ, Medley GF, Perry BD, Semu SM and Mahan SM. 2001. Population-based evaluation of the *Ehrlichia ruminantium* MAP 1B indirect ELISA. *Experimental and Applied Acarology* **25**: 881–897, 2001.
- Peter TF, Deem LS, Barbet AF, Norval RAI, Simbi BH, Kelly PJ and Mahan SM. 1995. Development and Evaluation of PCR Assay for Detection of Low Levels of *Cowdria ruminantium* Infection in *Amblyomma* Ticks Not Detected by DNA Probe. *J Clin Microbiol*, **33** (1): 166–172.
- Petney TN, Horak IG and Rechav Y. 1987. The ecology of African vector of heartwater with particular reference to *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**: 381-95.
- Poisson H and Goeffoy. 1925. Cité In : Curasson MG. *Traité de pathologie exotique vétérinaire comparée.* Paris, Vigot, 2, 317p.
- Postigo M, Taoufik A, Bell-Sakyi L, Bekker CPJ, de Vries E, Morrison WI and Jongejan F. 2008. Host cell-specific protein expression in vitro in *Ehrlichia ruminantium*. *Vet Microbiol* **128** : 136–147.

- Postigo M, Taoufik A, Bell-Sakyi L, de Vries E, Morrison WI and Jongejan F. 2007. Differential transcription of the major antigenic protein 1 multigene family of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. *Vet Microbiol*, **122** : 298–305
- Provost A and Bezuidenhout JD. 1987. The historical background and global importance of heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 165-69.
- Purchase HS. 1945. A simple and rapid method for demonstrating *Rickettsia ruminantium* (Cowdry, 1925) in heartwater brains. *Vet Rec*, **57**:413-414.
- Rajaonarison JJ. 1970. La cowdriose. Thèse de Doct. Vet. Toulouse, n° 91, 80p.
- Raliniaina M, Ratsimbarison BW, Randrianaivo G. 2003. Etude des maladies à tiques des bovins dans la Côte Est. Rapport d'activité, FOFIFA, DRZV.
- Raliniaina M. 2002. Diversité génétique de *Cowdria ruminantium* : Détection dans le vecteur *Amblyomma variegatum*, typage par PCR – RFLP et séquençage des gènes *map1* et *cpg1* ; Etude de la variabilité des gènes *map1* et *cpg1* lors du cycle Hôte –Vecteur. Mémoire de stage. DEA de Parasitologie. Univ. Montpellier 1, Fac de Médecine. 29p.
- Ramisse J et Uilenberg G. 1970. Conservation d'une souche de *Cowdria ruminantium* par congélation. *Rec. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop.*, **23**(3) : 313-316.
- Reddy GR, Sulsona CR, Harrison RH, Mahan SM, Burrige MJ and Barbet AF. 1996. sequence heterogeneity of the Major Antigenic Protein 1 genes from *Cowdria ruminantium* Isolates from Different Geographical Area. *Clin Diagn Lab Immunol.* **3** (4) : 417–422.
- Rouse JE. 1977. The Criollo, Spanish Cattle in the Americas. Univ. of Oklahoma Press, Norman, 305 p.
- Shkap V, de Vos AJ, Zwegarth E, Jongejan F. 2007. Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: the continuing necessity. *Trends Parasitol.* **23**(9):420-426.
- Stachurski F, Lancelot R. 2006. Footbath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. *Med Vet Entomol.* **20**(4):402-12.
- Steyn HC, Van Heerden H, Allsopp MTEP and Allsopp BA. 2003. Variability of *pCS20* Gene Sequences among Different *Ehrlichia ruminantium* Isolates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **990**: 723–725.
- Steyn HC, Pretorius A, McCrindle CME, Steinmann CML & van Kleef M. 2008. A quantitative real-time PCR assay for *Ehrlichia ruminantium* using *pCS20*. *Vet. Parasitol.*, **131**: 258-265.
- Syngé BA. 1978. Brain biopsy for the diagnosis of heartwater. *Trop. Anim. Health. Prod.* **10**, 45-48
- Totté P, McKeever D, Martinez D & Bensaid A. 1997. Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infect Immun*; **65**: 236–241.
- Totté P, Vachier N, Martinez D, *et al.* 1996. Recombinant bovine interferon gamma inhibits the growth of *Cowdria ruminantium* but fails to induce major histocompatibility complex class II following infection of endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* ; **53**: 61–71.
- Trichardt L. 1838. *In: Diary of Louis Trichardt. 1836 – 1838. Nasionale Pers, Cape Town. South Africa.*
- Uilenberg G, 1996. Progress and priorities in research on heartwater. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **791**:1-16.
- Uilenberg G, Barré N., Camus E, Burrige MJ and Garris G. 1984. Heartwater in the Caribbean. *Prev. Vet. Med.* **2**, 255–267.

- Uilenberg G, Camus E and Barré N. 1985. A strain of *Cowdria ruminantium* isolated in Guadeloupe (French West Indies). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **38** :34-42.
- Uilenberg G, Hoogstraal H and Klein JM. 1979. Les tiques (*Ixodoidea*) de Madagascar et leur rôle vecteur. Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar, Numéro spécial.
- Uilenberg G. 1971a. Etudes sur la cowdriose à Madagascar. Première partie. *Rec. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop.*, **24** : 239-249.
- Uilenberg G. 1971b. Etude de la cowdriose à Madagascar. Deuxième partie. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **24** : 355-364.
- Uilenberg G. 1982. Experimental transmission of *Cowdria ruminantium* by the Gulf Coast tick *Amblyomma maculatum*: danger of introducing heartwater and benign African theileriasis onto the American mainland. *Am. J. Vet. Res.* **43**: 1279- 1282.
- Vachiéry N, Jeffery H, Pegram R, Aprelon R, Pinarello V, Kandassamy RL, Raliniaina M, Molia S, Savage H, Alexander R, Frebling M, Martinez D, Lefrançois T. 2008. *Amblyomma variegatum* ticks and heartwater on three Caribbean Islands. *Ann N Y Acad Sci*, **1149**:191-5.
- Vachiéry N, Lefrançois T, Esteves I, Molia S, Cheikboudou C, Kandassamy Y and Martinez D. 2006. Optimisation of the inactivated vaccine dose against heartwater and in vitro quantification of *Ehrlichia ruminantium* challenge material. *Vaccine*, **24**(22), 4747-4756
- Vachiéry N, Totté P, Balcer V, Martinez D and Bensaid A. 1999. Effect of isolation techniques, in vitro culture and IFN γ treatment on the constitutive expression of MHC Class I and Class II molecules on goat neutrophils. **70** : 19-32.
- Vachiéry N, Trap I, Totté P, Martinez D and Bensaid A. 1998. Inhibition of MHC class I and class II cell surface expression on bovine endothelial cells upon infection with *Cowdria ruminantium*. *Vet Immunol and Immunopath*, **61** : 37-48
- Van Amstel SR and Oberem PT. 1987. The treatment of heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 475-79.
- Van de Pypekamp HE and Prozesky L. 1987. Heartwater. An overview of clinical signs, susceptibility and differential diagnosis of the disease in domestic ruminants. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **54**: 263-66.
- Van der Merwe L. 1979. Field experience with heartwater (*Cowdria ruminantium*) in cattle. *J S Afr vet Ass*, **50** (4) : 323-325.
- Van Heerden H, Collins NE, Braytonc KA, Rademeyer C, Allsopp BA. 2004b. Characterization of a major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia ruminantium*. *Gene*, **330** :159-168.
- Van Heerden H, Steyn H.C, Allsopp MT, Zwegarth E, Josemans AI.& Allsopp BA. 2004a. Characterization of the pSC20 region of different *Ehrlichia ruminantium* isolates. *Vet. Parasitol.*, **101**: 279-291.
- Van Kleef M, Macmillan H, Gunter NJ, Zwegarth E, Allsopp BA, Shkap V, Du Plessis DH and Brown WC. 2002. Low molecular weight proteins of *Cowdria ruminantium* (Welgevonden isolate) induce bovine CD4+-enriched T-cells to proliferate and produce interferon-gamma. *Vet Microbiol*; **85**: 259-273.
- van Vliet AH, van der Zeijst BA, Camus E, Mahan SM, Martinez D, Jongejan F. 1996. Recombinant expression and use in serology of a specific fragment from the *Cowdria ruminantium* MAP1 protein. *Ann N Y Acad Sci*.**791**:35-45.

- Waghela SD, Rurangirwa FR, Mahan SM, Yunker CE, Crawford TB, Barbet AF, M. J. Burrigde GE and McGuire TC. 1991. A Cloned DNA Probe Identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* Ticks. *J Clin Microbiol*, **29** (11): 2571-2577.
- Walker AR, Bouattour A, Camicas J-L, Estrada-Pena A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG & Preston PM. 2003. Ticks of domestic animals in Africa. A guide to identification of species. Univ. of Edinburgh, Bioscience Reports.
- Walker JB and Olwage A. 1987. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (*Ixodidea*, *Ixodidae*), genus *Amblyomma* and their distribution. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**: 353-79.
- Wernegreen JJ. 2005. For better or worse: genomic consequences of intracellular mutualism and parasitism. *Curr Opin Genet Develop*, **15**:572–583.
- Yang Z. and Yoder A. 1999. Estimation of the transitions / transversion rate bias and species sampling. *Journal of Molecular Evolution*, **48** :274–283,
- Yang Z., Nielsen R., Goldman N., and Pedersen A-MK. 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, **155** :431–449,
- Yeoman GH. 1968. Field vector studies of epizootic East Coast Fever. VI. The occurrence of *Amblyomma variegatum* and *A. lepidum* in the East Coast Fever zones. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, **16**: 183-203.
- Yu X-J, McBride JW and Walker DH. 2007. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Vet Parasitol* **143** : 337–346.
- Zweygarth E, Josemans AI, Van Strijp MF, Lopez-Rebollar L, Van Kleef M, Allsopp BA. 2005. An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine*. **23**(14):1695-702.

Intitulé de la thèse : Diversité génétique de la rickettsie *Ehrlichia ruminantium* en Guadeloupe et à Madagascar : Caractérisation moléculaire et mécanismes de transmission des souches

Résumé de thèse

La cowdriose (heartwater), maladie des ruminants de grande importance économique en Afrique subsaharienne, à Madagascar et dans les Caraïbes est un sérieux obstacle à l'augmentation de leur productivité par une amélioration génétique. Elle est transmise par des tiques *Amblyomma*. La rickettsie *Ehrlichia ruminantium* est l'agent pathogène responsable. Les vaccins, inactivés et atténués, expérimentés protègent contre la souche homologue mais procurent des protections variables contre les autres souches due à l'existence d'une diversité génétique de souches sur le terrain. L'objectif final étant l'amélioration de l'efficacité des vaccins, notre travail consiste en une évaluation de l'étendue de cette diversité, une contribution à la caractérisation des mécanismes de génération de cette diversité et en une étude pour la compréhension des mécanismes de transmission de plusieurs souches et leur influence sur la structure des populations du pathogène sur le terrain. Les analyses du polymorphisme de six protéines de la membrane externe de la rickettsie codées par des gènes de la famille *map*, ont montré qu'une grande diversité de souches existe dans des zones restreintes, l'Archipel guadeloupéen et la zone de Kianjasoa dans le Moyen Ouest malgache. En incluant les souches africaines, cette diversité paraît comparable à l'échelle géographique et des temps en considérant l'ancienneté des introductions de la rickettsie dans les deux zones d'étude ou l'introduction en continue en Afrique. Différents types de mécanismes évolutifs semblent être à l'origine de la génération de cette diversité, des complexes clonaux ayant subi des mutations ponctuelles ou des recombinaisons homologues entre clones. Des expériences d'infections multiples de l'hôte ont été conduites en conditions contrôlées pour étudier les mécanismes de transmission d'infections à la tique. Des facteurs liés à la souche, à l'hôte et au vecteur sont identifiés et les probables impacts sur l'infection de l'hôte et de la tique ainsi que la distribution des souches sont discutés.

Mots-clés : *Ehrlichia ruminantium*, Heartwater, Protéines MAP, Diversité génétique, *Amblyomma variegatum*, transmission

Abstract

Cowdriosis (heartwater), disease of the ruminants of great economic importance in sub-Saharan Africa, in Madagascar and in the Caribbean is a serious obstacle for increasing their productivity by a genetic improvement. It is transmitted by *Amblyomma* ticks. Rickettsia *Ehrlichia ruminantium* is the pathogen agent. The vaccines, inactivated and attenuated, protect from the homologous strain but get variables protection against the other stocks due to the existence of a genetic diversity of strains in field. The final objective being the improvement of the effectiveness of these vaccines, our work consist of an evaluation of wide of this diversity, a contribution to the characterization of the mechanisms of generation of this diversity and in a study for the comprehension of the transmission systems of several stocks and their influence on the structure of the populations of pathogen in field. The analyses of the polymorphism of six proteins of the external membrane of the rickettsia encoded by genes of the *map* family, showed that a great diversity of strains exist in restricted zones, the Archipelago of Guadeloupe and the zone of Kianjasoa in the malagasy Mid West. By including the African strains, this diversity appears comparable on a geographical scale and of times if the seniority of the introductions of the rickettsia into the two zones studied or the continuous introduction in Africa are considered. Different types of evolutionary mechanisms seem to be at the origin of the generation of this diversity, clonal complexes having undergone point mutations or homologous recombination between clones. Experiments of multi infections of the host were led in conditions controlled to study the infections mechanisms transmission to the tick. Factors related on the strain, the host and the vector are identified and the probable impacts on the infection of the host and the tick as well as the distribution of the strains are discussed.

Key words : *Ehrlichia ruminantium*, Heartwater, MAP Proteins, Genetic diversity, *Amblyomma variegatum*, Transmission

Laboratoire d'accueil : CIRAD/BIOS, UMR 15 CIRAD-INRA, Guadeloupe.