
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab
Blida
Faculté des Sciences Agro-vétérinaires et Biologiques

ANNEE 2013



**LA BIODIVERSITE DE BARTONELLA DANS LES
ARTHROPODES VECTEURS (TIQUES, PUCES,
POUX) EN ALGERIE.**

Mémoire
pour le

MASTER GENETIQUE ET PHYSIOLOGIE

présenté et soutenu publiquement
devant le

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
par

Sarah HACENE

JURY

Présidente: Mme. AMAROUCHE N. Maître de conférence à l'université de Blida.
Promoteur: M. OUMOUNA M. Professeur à l'université de Médéa.
Co-promoteur: M. Bitam I. Docteur de recherche à l'Institut Pasteur.
Examinatrice: Mme . Bouguessa A. Maître de conférences à l'université de Blida.
Examineur: M. Bessaad A. Maître de conférence à l'université de Blida.

REMERCIEMENTS

A Madame la Présidente : Mme AMAROUCHE N.
Maître de conférences à l'Université de Blida
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury
Hommage respectueux.

A Monsieur M. OUMOUNA
Professeur à l'Université de Médéa
Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce Master et de partager son savoir
Que sa disponibilité, ses conseils et sa sagesse trouvent dans ce travail
L'expression de mon infinie reconnaissance, respect
Et de mes sincères remerciements.

A Monsieur I. BITAM
Maître de recherche à l'Institut Pasteur d'Algérie
Qui nous a fait l'honneur de nous accueillir au sein de son équipe et surtout d'avoir
Partager avec nous son riche sujet et son savoir
Mes respectueux remerciements

A Madame BOUGUessa A. et M. BESSAAD A.
Maîtres de conférences à l'Université de Blida
Qui nous ont fait l'honneur de participer à notre jury
Nos vifs remerciements pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant
D'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

A toutes les personnes du Laboratoire «Ecologie et Systèmes Vectoriels» de l'Institut Pasteur» d'El Hamma, pour la sympathie dont ils ont fait preuve et la gentillesse, en particulier Assia et à son soutien actif. Mille mercis.

A toutes les personnes de l'Institut Pasteur d'El Hamma et de Sidi-Fredj, qui nous ont dépanné et aidé à trouver une solution à nos difficultés et à Monsieur DERAR surtout, responsable à l'Institut Pasteur, pour l'accueil sympathique et sa coopération. Un grand merci.

A Mouna, Sihem, Aïda, Saïd, Mounir, Ratiba, Sabine, Jan, Diana, Stefano, David, Stefan, Katrin, Matthias, Friederike, Xavier, qui de près ou de loin, ont partagé ces moments de folies, à leur bonne humeur, conseils, soutien et surtout leur disponibilité et présence. Simplement merci.

Enfin,

A MaPas.

SOMMAIRE

INDEX DES TABLEAUX

INDEX DES FIGURES

LISTE DES ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION ET OBJECTIFS 1

RESUME..... 3

APERCUS BIBLIOGRAPHIQUES 1

1.1	HISTORIQUE ET ETAT ACTUEL	5
1.2	LA FAMILLE DE BARTONELLACEAE.....	8
1.3	GENOME ET EVOLUTION GENOMIQUE	9
1.3.1	GENOMES DE <i>BARTONELLA</i>	10
1.3.2	PHAGES DE <i>BARTONELLA</i>	11
1.3.3	DIVERSITE GENOMIQUE DANS <i>BARTONELLA</i>	11
1.4	IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE <i>BARTONELLA</i>	16
1.4.1	CULTURE ET MICROSCOPIE.....	16
1.4.2	SEROLOGIE	17
1.4.3	EXAMEN ANATOMOPATHOLOGIQUE.....	18
1.4.4	COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET GC % :	19
1.4.5	IDENTIFICATION PAR LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE	20
1.5	PREVALENCE DE <i>BARTONELLA</i> ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES ESPECES	26
1.5.1	REPARTITION DES ESPECES, EXPOSITION AUX RISQUES ET VECTORISATION	29
1.5.2	CONTACT AVEC LES ANIMAUX ET TRANSMISSION DIRECTE.....	29
1.5.3	CONTACT AVEC LES VECTEURS ET TRANSMISSION INDIRECTE	32
1.6	LES VECTEURS ARTHROPODES	35

1.7	ETUDE DE LA VECTORISATION.....	39
1.7.1	METHODE D'ETUDE DE LA VECTORISATION :	41
1.8	PATHOGENIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE <i>BARTONELLA</i>	43
1.9	TRAITEMENT.....	51
<u>2</u>	<u>MATERIELS ET METHODES.....</u>	<u>1</u>
2.1	CARACTERISATION DES REGIONS DE RECOLTE	60
2.2	PRELEVEMENT DES ARTHROPODES.....	60
2.3	CARACTERISATION DE L'ECHANTILLON	61
2.4	LA RECHERCHE AUX LABORATOIRES.....	61
2.4.1	CRITERES D'IDENTIFICATION DES ARTHROPODES.....	61
2.4.2	VERIFICATION DES EXTRACTIONS.....	62
2.4.3	AMPLIFICATION EN CHAINE PAR POLYMERISATION DE L'ADN <i>ftsZ</i>	63
<u>3</u>	<u>RESULTATS</u>	<u>65</u>
3.1	NOMBRE DES ARTHROPODES RECOLTE	66
3.2	IDENTIFICATION ET TAUX DES ESPECES ADULTES	68
3.3	EXTRACTION DE L'ADN	70
3.3.1	ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	70
3.3.2	ESTIMATION DE LA DENSITE OPTIQUE PAR SPECTROPHOTOMETRIE	72
3.4	AMPLIFICATION DU FRAGMENT D'ADN SPECIFIQUE AUX <i>BARTONELLA</i>	72
<u>4</u>	<u>DISCUSSION</u>	<u>74</u>
4.1	DENSITE DES ARTHROPODE	75
4.2	METHODOLOGIE :	80
4.2.1	EXTARCTION DES ADN DES ARTHROPODES PAR LES DEUX TECHNIQUES « KIT MACHEREY NAGEL ET THERMOLYSAT »	80
4.2.2	RECHERCHE DE LA PRESENCE DU GENE <i>ftsZ</i> APRES PCR ET LECTURE DES GELS	81
4.3	IDENTIFICATION DE <i>BARTONELLA</i>	84
	<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>92</u>
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>94</u>
	<u>ANNEXE</u>	<u>134</u>

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Programme du thermocycleur, spécifiques aux amorces du gène ftsZ.....	26
--	----

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Phylogénie, vecteurs arthropodes et hôtes mammifères du genre Bartonella et la distribution des systèmes de sécrétion type IV.	13
Figure 2: Représentation schématisée du génome de l'espèce B. grahami.....	16
Figure 3: Répartition des arthropodes par région.....	66
Figure 4: Répartition des arthropodes par mois.	66
Figure 5: Répartition des arthropodes par espèce hôte.	67
Figure 6: Répartition des arthropodes par sexe.....	67
Figure 7: Répartition des espèces arthropodes au printemps 2012.	68
Figure 8: Répartition des espèces arthropodes par région.....	69
Figure 9: Répartition des espèces arthropodes par mois.....	69
Figure 10: Répartition des espèces arthropodes par espèce hôte.	70
Figure 11: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des extraits d'ADN par le kit "MACHEREY NAGEL".....	71
Figure 12: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des extraits d'ADN par thermolysat.....	71
Figure 13: Electrophorèse sur gel d'agarose de quelques amplifiats d'ADN extraits par le kit "MACHEREY NAGEL".....	73
Figure 14: Electrophorèse sur gel d'agarose de quelques amplifiats d'ADN extraits par thermolysat et kit "MACHEREY NAGEL".....	73

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Critères de répartition des zones.....	135
Annexe 2: Position géographique des régions échantillonnées	136
Annexe 3: Tableaux des échantillons.....	137
Annexe 4 : Photo d'hotte de décontamination à ultraviolet utilisée lors de l'investigation de la biologie moléculaire.....	139
Annexe 5 : Photos et étapes d'extraction par kit « Macherey Nagel »	140
Annexe 6: Étapes de l'extraction par thermolysat	142

Annexe 7 : Tableau de composition du Tris Borate EDTA	143
Annexe 8 : Etapes et photo d'électrophorèse sur gel d'agarose.....	144
Annexe 9 : Spectrophotométrie et photos	145
Annexe 10 : Photo de la zone du laboratoire de la préparation du master-mix	146
Annexe 11 : Tableau des amorces des différents gènes utilisés pour la détection et l'identification de <i>Bartonella</i>	147
Annexe 12: Quelques inhibiteurs de la PCR (Inhibiteur/Concentration inhibitrice).....	148
Annexe 13: Tableau récapitulatif des résultats de la spectrophotometrie.....	149

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
B.	<i>Bartonella</i>
B.b	<i>Bartonella bacilliformis</i>
B.h	<i>Bartonella henselae</i>
B.q	<i>Bartonella quintana</i>
i.m	intramusculaire
KCl	chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	phospho dihydrogène de potassium
MgCl ₂	chlorure de magnésium
n	numéro d'échantillon
N	nombre total des échantillons
NaCl	chlorure de sodium
Na ₂ HPO ₄	Phosphate disodique
R.	<i>Rhipicephalus</i>
sp.	espèce
Spp.	genre
tmf	température de fusion de l'amorce forward
tmr	température de fusion de l'amorce reverse

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Alors que les infections bactériennes dans le sang sont normalement associées à une maladie grave, les infections à *Bartonella* sont habituellement asymptomatiques (1). *Bartonella* spp. sont des bactéries émergentes et négligées avec une distribution mondiale. Un nombre croissant de *Bartonella* spp. est considéré comme pathogène zoonotique créant une préoccupation de la santé public et vétérinaire. Elles sont très répandues dans le monde animal, qu'il s'agisse de faune sauvage ou d'animaux domestiques, dans lesquels un grand pourcentage d'animaux est bactériémique (1), (2). La prévalence et la caractérisation génétique de *Bartonella* dans la vie en dépend (3). Le contact avec les animaux était classé comme facteur de risque pour les infections par *Bartonella* dans les études des populations humaines résultant de la hausse des opportunités de rencontre avec l'homme. La mesure de l'infection à *Bartonella* est sous-estimée. La bactériémie à *Bartonella* spp. est potentiellement fatale, spécialement chez les immunodéprimés. Un large spèctre de manifestations cliniques ont été attribuées à l'infection par *Bartonella* spp., dont la plupart est considérée comme idiopathique avant le diagnostic de l'infection par *Bartonella* spp. Certaines d'entre elles sont à l'origine d'anthropozoonoses. Leur signification biologique, épidémiologique et pathologique est mal connue. Le génome de différentes espèces de *Bartonella*, identifiées ou non, a été isolé d'extraits de tiques (*Ixodes ricinus*, *Ixodes pacificus*) (4), (5). Même de nombreux animaux, proches de l'homme ou consommés par l'homme, sont en contact étroit avec lui et sont susceptibles de partager, même temporairement, des ectoparasites comme les puces, les poux et les tiques. C'est ainsi qu'il a été démontré (6) que l'homme pouvait participer occasionnellement au cycle de *B. berkhoffii* entre le coyote (réservoir) et le chien (espèce malade) par l'intermédiaire des tiques *Ixodes pacificus*. Il n'ya pas de tests standards pour confirmer l'infection à *Bartonella* spp. et les résultats faux négatifs sont fréquent même avec les techniques moléculaires et microbiologiques ou sérologiques. Ainsi les tests du diagnostic pour *Bartonella* méritent de l'attention (7).

La *Bartonella* en tant que maladie endémique a été mieux documentée dans quelques pays d'Amérique du Sud (Pérou et Equateur), aux états unis, en Europe et en Asie. Cependant notre compréhension de la distribution et de la diversité des espèces de *Bartonella* en Algérie est vraiment limitée. En effet, de nos jours le citoyen tend de plus en plus à se rapprocher des terres du nord d'Algérie, dans les zones urbaines, péri-urbaines ou rurales, afin de les exploiter: habitats, pratiques de cultures animales et végétales, déboisement, surpâturage,

promenade...etc. En raison de leur valeur d'usage élevée, des échanges interrégionaux et de leur rapprochement continu par l'extension intercommunale, la probabilité du transfert des arthropodes et le risque des maladies est élevée. Les élèves, travailleurs et promeneurs qui doivent traverser les prairies, les broussailles et les buissons...pour accéder à la ville, ou les habitants de la ville près d'un point d'élevage d'animaux doivent alors se protéger pour éviter toute morsure d'un arthropode. Le plan donc pour la récolte de nos arthropodes était essentiellement de viser ces différentes zones, où l'animal et l'homme coexistent et/ou cohabitent et voir l'influence de leur biologie sur la densité des arthropodes sans insister sur les facteurs écologiques ; climatiques et géographiques. Les cabinets vétérinaires, Hurbal et les fermes ont été visités. Il était d'un intérêt général d'apporter plus de contribution à nos connaissances sur la Bartonella en Algérie.

-L'objectif principal de ce travail est de détecter la présence et de déterminer la prévalence de l'agent pathogène Bartonella dans des tiques, puces et poux , pour identifier les habitats touchés par les infections afin d'évaluer le risque de transmission de ces agents, par application d'une PCR (Polymerase Chain Reaction) : une réaction d'amplification génomique en chaîne par polymérase. Celle-ci est adaptée pour le dépistage rapide des arthropodes recueillis sur le terrain pour de multiples agents pathogènes comme la Bartonella. Elle permet de travailler à partir de n'importe quel prélèvement, qu'il s'agisse d'un échantillon de sang, tissu cellulaire ou encore d'un extrait d'arthropode (une telle approche a été pratiquée pour les micromammifères sauvages (8), (9).

-Le second objectif est de déterminer la nature des espèces de Bartonella présentes dans les échantillons se révélant positifs lors de la détection.

-Le troisième étant de comparer la fiabilité et le coût entre les 2 méthodes d'extraction d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) mis au point à partir des arthropodes suivant le protocole du Kit MACHEREY NAGEL et celui du thermolysat.

RESUME

Il existe à ce jour de nombreux arthropodes vecteurs de *Bartonella* aussi bien chez les animaux que chez l'homme. En effet, on a comme exemple identifié les phlébotomes (*Lutzomyia*) comme étant le vecteur de l'angiomatose bacillaire (dûe à *B. bacilliformis*) chez l'homme. *B. quintana*, agent de la fièvre des tranchées, est, quant à elle, transmise par les poux (*Pediculus humanus corporis*).

Notre étude nous a tout d'abord révélé une présence fréquente de tiques (97.36%) par rapport aux autres types d'arthropodes adultes (puces et poux), principalement sur les bovins (37.57%) et les chiens domestiques et errants (49.23%). *Rhipicephalus sanguineus* (69.85%) a été l'espèce de tiques la plus répandue. Un total de 47,58% a été récolté de chiens et 14.25% de bovins.

Elle nous a permis ensuite de mettre au point un aperçu concernant l'utilisation et la fiabilité d'extraction d'ADN par thermolysat en biologie moléculaire et l'utilisation des amorces *ftsZ* en PCR qui apparaît d'être l'outil le plus fiable de par sa spécificité, sensibilité et rapidité pour la majorité des espèces *Bartonella*. Un produit de PCR sur 27 a été validé.

De plus, nous avons pu établir que 3.70% des extraits amplifiés par PCR pourraient présenter du génome de *Bartonella*. L'échantillonnage total analysé se présentait de la manière suivante : *Rhipicephalus sanguineus* (13.78%), *Rhipicephalus turanicus* (7.89%), *Hyalomma detritum detritum* (2.63%), *Hyalomma anatolicum excavatum* (2.63%), *Rhipicephalus bursa* (2.63%), *Ctenocephalides felis* (34.21%), *Melophagus ovinus* (2.63%), *Xenopsylla cheopsis* (5.26%), *Archaeopsylla erinacei* (23.68%), *Pediculus humanus capitis* (5.26%). Il s'avère ici que 20 % de *Rhipicephalus sanguineus* de bovins en pâturage sur un total de 40% de bovins et 60% de chiens provenant de milieux différents, pourraient être infectés.

Nous n'avons pas été en mesure de valider les autres amplifiats, ni d'identifier l'espèce par l'utilisation de la PCR portant sur le gène codant pour le gène *ftsZ*. Ce travail doit être poursuivi, en particulier en réalisant d'une part des PCR portant sur les gènes *ITS*, *gltA*, *rpoB* et *ribC*, et d'autre part le séquençage des amplifiats positifs, ce qui permettrait de déterminer avec précision l'espèce de *Bartonella* en présence et de s'intéresser aux différentes

RESUME

caractéristiques bactériologiques, antigéniques, pathogéniques qui ne sont pas toujours totalement élucidées. Il faudrait aussi envisager un échantillonnage plus vaste afin de préciser le rôle épidémiologique des arthropodes car les cycles des maladies bactériennes vectorisées ne sont ni figés ni totalement maîtrisés.

APERCUS BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 HISTORIQUE ET ETAT ACTUEL

Depuis plusieurs décennies, la famille de *Bartonellaceae* comportait qu'une seule espèce: *Bartonella bacilliformis*; pathogène endémique de la maladie de Carrion dans les vallées et canyons de la Cordillère des Andes en Amérique du Sud. Les bactéries sont transmises par des phlébotomes femelles : genre *Lutzomyia verrucarum* dans les vallées andines de 500 à 3000 m au-dessus du niveau des mers (10). Les maladies causées par cet agent pathogène ont été observées en particulier au Pérou, mais aussi en Colombie et en Equateur. 1870, plus de 8.000 personnes tombèrent malade et moururent d'une fièvre élevée et d'une anémie sévère lors de la construction du chemin de fer péruvien reliant Lima au centre minier d'Oroya situé dans la Cordillère des Andes à une altitude allant de 1 000 à 3 000 m (11). Ceux qui ont survécu à cette phase aiguë, nommée aussi la «fièvre d'Oroya" ont développé, quelques semaines ou mois plus tard, des lésions ressemblant à des verrues ; des tumeurs vasculaires verruqueuses de la peau, des muqueuses et des organes internes (11) dites «*Verruga peruana*" (12).

On ignorait alors que ces deux maladies étaient des manifestations différentes d'une même maladie, jusqu'à ce qu'en 1885, Daniel Carrion, étudiant en médecine à Lima, a montré à ses dépens qu'un lien existait entre les verrues péruviennes et la fièvre d'Oroya. Il s'est inoculé des fragments de verrues qui ont provoqué une anémie hémolytique fébrile, puis sa mort dans les semaines suivantes. La maladie aiguë provoquée par *B.bacilliformis* est souvent mortelle (12). En son honneur, on appela la maladie, longtemps connue sous le nom de « bartonellose », la « maladie de Carrion » (13), (14).

L'agent responsable fut décrit par Alberto Barton en 1909 (15). Il s'agissait d'un petit bacille présent dans les hématies des patients infectés et qui fut ultérieurement nommé *Bartonella bacilliformis*. Cette bactérie, isolée dès 1925, peut être cultivée du sang de patients ayant une fièvre d'Oroya et, plus rarement, des lésions de *verruca peruana* (13), (14), (16). En 1928, Battistini montra que des phlébotomes étaient les vecteurs de la bartonellose (17).

La plus ancienne épidémie connue, date de l'année 1540. Elle était décrite en détail par le conquistador Miguel de Estete (17). Les changements morphologiques typiques de *verruca peruana* ont été récemment démontrés dans une momie réhydratée de l'époque des Incas (18),

une preuve que la maladie a existé pendant des siècles dans cette région (19).

Au début de 1916, pendant la première guerre mondiale, les médecins des troupes armées allemandes : His et Werner décrivent indépendamment l'un de l'autre une maladie fébrile en Volhynie, une région dans ce qui est aujourd'hui l'Ukraine (20). En Juillet 1916, la maladie fut observée aussi dans d'autres endroits du front de l'Est et de l'Ouest. Plus de 400.000 soldats en souffrirent pendant la guerre (21). Les symptômes typiques ont été: malaise, fièvre récurrente survenant environ tous les 5 jours jusqu'à 40 ° C, la perte du poids, maux de tête, de poitrine, du dos, articulaires, musculaires et des douleurs osseuses. Une anémie plus ou moins sévère était observée selon le cas et un grossissement du foie et de la rate se produisirent rarement. La maladie a été appelée fièvre des cinq jours (Werner) et de la fièvre de Volhynie (His), mais elle est également connue comme la maladie de Werner-His ou la maladie des tranchées (22). Thérapeutiquement il y'a eu l'utilisation de : neosalvarsan, l'arsenic, la quinine, optochine, l'aspirine et pyramidon, mais avec un succès limité (20), (23). La maladie a été considérée comme bénigne avec un très bon pronostic. Les décès ont été signalés. La durée habituelle de la maladie était d'environ 3 à 4 mois, et après une moyenne de 6 à 10 plaintes de fièvre elle disparaissait (20). Une récurrence a été observée chez les patients, 11 à 19 ans après l'infection initiale (19).

Plusieurs rapports d'enquêtes ultérieures ont révélé que la fièvre des cinq jours était connue depuis le Moyen Age (21). Elle était connue en Irlande du Nord pendant la seconde moitié du 19e siècle (24) et également en Russie (25). Après la 1ère Guerre mondiale, elle était observée en Espagne, en Suède, en Ukraine, en Géorgie et en Russie et lors de la Seconde Guerre mondiale, les troupes allemandes ont apporté l'infection à la Norvège, la Finlande et la Yougoslavie (26). Par la suite, les maladies ont été enregistrées en Algérie, en Egypte, en Ethiopie, au Japon, à la Chine et au Mexique (26). Bien que la fièvre des cinq jours est tombée en désuétude pendant des décennies, des épidémies par ce pathogène sont observées de nouveau. La plus récente est décrite en 1997 au Burundi (27).

En 1889, Parinaud décrit une forme particulière de la maladie des griffes du chat (MGC), le syndrome oculo-glandulaire. Mais il fallut attendre un siècle exactement pour que la bactérie causale soit découverte presque simultanément par deux équipes de chercheurs. Elle fut alors nommée *Rochalimaea henselae* (28).

La souche isolée par Regnery provenait du sang d'un malade infecté par le HIV (Human Immunodeficiency Virus), qui se plaignait d'une fièvre chronique associée à une asthénie profonde (28).

DF Welch isola les siennes chez des malades atteints d'angiomasose et de péliose (hépatique et splénique). Quelques années plus tard, en 1992, Welch mettait au point un test par immunofluorescence qui lui permettait de détecter la présence d'anticorps anti-*Bartonella* chez 88 % des MGC (parmi 41 patients) alors qu'il n'en trouvait que 3 % dans un échantillon constitué de 107 individus en bonne santé. La même année, une souche de *Rochalimaea henselae* était isolée chez un chat et deux autres dans des adénopathies de patients porteurs d'une MGC (28).

En 1926, Noguchi réussit la transmission expérimentale de *B. bacilliformis*, de *Dermacentor andersoni* au singe rhésus (*Macaca mulatta*). Il montra ainsi pour la première fois la capacité d'une tique à transmettre l'agent pathogène (28).

Le groupe d'organismes de *Bartonella* a été jugé responsable d'un spectre croissant de maladies émergentes et réémergentes ces dernières années (29). Le tableau clinique le plus fréquemment décrit pour ce type d'infection, est la maladie des griffes du chat. Cette maladie a été rapportée dans le monde et semble être l'infection à *Bartonella* la plus fréquente chez les personnes d'aujourd'hui. Dans plusieurs études, la séroprévalence des anticorps à *B. henselae* chez les personnes a varié de 3,6 à 6% (30). Des études séro-épidémiologiques dans les zones d'endémie ont montré que plus de la moitié des personnes infectées par *B. bacilliformis* sont asymptomatiques. La fièvre d'Oroya est responsable d'une létalité spontanée de 40 à 85% (19). On ignore cependant le pourcentage de patients développant une affection parmi les personnes réellement en contact avec les *Bartonella* en général. Le diagnostic de ces infections à *Bartonella* est également de réalisation difficile en raison de la multiplicité des espèces de *Bartonella*, des communautés antigéniques entre *Bartonella*, de la diversité génique possible au sein d'une même espèce de *Bartonella* et des variations inter-individuelle de la réponse immunitaire. Les bartonelloses appartiennent à la catégorie des infections émergentes qu'il faut savoir et vouloir rechercher (31).

1.2 LA FAMILLE DE BARTONELLACEAE

Genre: *Bartonella*

Famille: *Bartonellaceae*

Ordre: *Rhizobiales*

Classe: *Alphaproteobacteria*

Division ou phylum: *Proteobacteria*

Domain ou empire: *Bacteria*

Les bactéries ont été isolées du sang de plusieurs espèces de mammifères, dont l'homme, les carnivores et ruminants domestiques ou sauvages, les rongeurs ou de réservoirs principaux apparemment sains (4), (6), (8), (32), (33), (34), (35), (36), (37) et plus rarement d'hôtes accidentels associés à des manifestations pathologiques diverses (38), (39), (40), (41), (42), (43).

Le genre *Bartonella* s'est élargi d'une seule espèce et il comprend actuellement 28 espèces et sous-espèces validées, en addition à un nombre non validé (44). Ces espèces regroupent *B. bacilliformis* ; les espèces anciennement classées dans les genres *Rochalimaea* (45) et *Grahamella* (46) , et de nombreuses espèces caractérisées récemment à la faveur des progrès de la biologie moléculaire (40), (47), (48). Sur le plan phylogénique, le genre *Bartonella* est classé dans le groupe alpha des *Proteobacteria*, proche des genres *Brucella*, *Afipia*, *Agrobacterium* et *Rhizobium*, mais plus éloigné du genre *Rickettsia* (29). Les *Bartonella* sont génétiquement étroitement liées à la *Brucella* (45) et sont biologiquement proches des *Rickettsia* (7).

B. bacilliformis a été pendant des décennies le seul membre de la famille *Bartonellaceae* alors que la famille de *Rochalimaeae* était affectée aux *rickettsies*. En 1993, en raison des similitudes phénotypiques et génotypiques, Brenner et al ont proposé de séparer la famille de *Rochalimaeae* qui incluait les espèces : *Rochalimaea quintana*, *Rochalimae hensaleae*, *Rochalimaea elisabethae* et *Rochalimaea vinsonii* de celle des *rickettsies* et de l'affecter à celle de *Bartonellaceae* (45). Un peu plus tard, en 1995, Birtles et al ont proposé d'incorporer dans la famille de *Bartonellaceae*, la famille de *Grahamella* avec les espèces *Grahamella talpae* et *Grahamella peromysci* et trois autres nouvelles espèces, à savoir : *B. doshiae*, *B. grahamii* et *B. taylorii* (46). Par la suite, le nombre d'espèces nouvellement découvert a grimpé en flèche. Cette évolution a été suivie par la suite, en 1996, par la découverte de la

sous-espèce : *B. vinsonii berkhoffii* (49), qui peut être transmise par les tiques (50), *B. clarridgeiae* (51). En 1998 il y'a eu trois nouvelles espèces: *B. tribocorum* (36), *B. koehlerae* (35) et la sous espèce : *B. vinsonii arupensis* (52) et en 1999, par l'espèce *B. alsatica* (8). Plus récemment encore, la description de nouvelles espèces s'est poursuivie. En 2000, il y'a eu la découverte de *B. birtlesii* (32). A partir d'hémocultures de cerfs de la réserve naturelle de Schönbuch à Tübingen (Allemagne), une nouvelle espèce, à savoir *B. schoenbuchii* (53), était découverte en 2001. En 2002, il y'a eu *B. bovis* et *B. capreoli* (54), *B. chomelii* (2004) (55), *B. cooperplainsensis*, *B. queenslandensis*, *B. rattaustrialiani* (2009) (56), *B. japonica*, *B. silvatica* (2010) (57) et la validation de *B. rochalimae* (2012) (58). D'autres *Bartonella* sont actuellement stockées dans certains laboratoires scientifiques en attendant d'être caractérisées (19).

1.3 GENOME ET EVOLUTION GENOMIQUE

Bartonella apparait d'être la cause la plus ubiquitaire de l'infection bactérienne systémique chronique chez les mammifères. Beaucoup et diverses espèces ont évolué de bactérie des sols, vivant en liberté pour infecter un variant de vertébré, allant des rongeurs aux humains et un assortiment de vecteurs qui transmettent ces organismes d'hôte à hôte. Un thème commun est que les *Bartonella* établissent une relation harmonieuse et équitable avec leur hôtes, dans lesquels les symptômes sont minimes et la bactériémie est à long terme. La diversité dans le genre *Bartonella* est le model adéquat qui a le potentiel de nous enseigner beaucoup de façon générale et spécifique sur l'histoire bactérienne microévolutive, les mécanismes de virulence, et stratégies utilisées pour coloniser les hôtes et vecteurs. En plus, la comparaison des espèces et lignées qui diffèrent dans leur capacité à infecter les humains peut donner un éventail d'aperçus concernant la vulnérabilité de l'hôte humain (59) et d'établir des bases pour le développement futur du diagnostic. Pour combler ces lacunes plusieurs études fondamentales ont déjà donné des aperçus provocatifs sur l'évolution du genre *Bartonella* moyennant des analyses comparatives des génomes (60).

De nombreux processus différents modifient un génome bactérien, en gardant chaque génome dans un état d'évolution continu. Certains comme des erreurs de réplication d'ADN peuvent avoir lieu dans un seul génome chez un même individu. D'autres comme l'intégration d'un phage, nécessitent l'acquisition d'un ADN étranger. Cependant, la majorité des changements

qui se produisent dans un génome disparaît de la population avant d'avoir eu la chance de les observer (1).

Toutes les espèces de *Bartonella* présentent un haut degré de similarité de séquence, avec une médiane d'identité *16S* entre une espèce et son plus proche parent (soit de 99,7%), qui se trouve être au-dessus du seuil normalement utilisé pour la différenciation des espèces bactériennes (98,7%). Pour cette raison, une *Bartonella* nouvellement isolée est généralement attribuée à une espèce basée sur des séquences de *gltA* (gène de la citrate synthase) et / ou de *rpoB* (gène de la sous unité β de l'ARN polymérase) (61), (62), (63). Il a été proposé qu'une nouvelles espèces de *Bartonella* doit afficher moins de 96% de similarité de séquence dans un fragment de 327 pb (paires bases) du gène *gltA* et moins de 95,4% de similarité dans un fragment de 825 pb du gène *rpoB*, à toutes les espèces décrites (62).

Bartonella, qui comme *Brucella*, ont un mode de vie intracellulaire facultatif, son génome est lié à l'un des deux chromosomes circulaires trouvés chez son cousin le plus virulent ; moins divers et indépendant des vecteurs, et comme *Agrobacterium*, affichent une variabilité extraordinaire en terme de modes de vie, à savoir : vivants en liberté, colonisateurs de nématodes et d'insectes et agents pathogènes humain opportunistes. Cette grande variabilité est reflétée dans les génomes d'*Agrobacterium*, qui vont de la taille de 4,7 à 8,3 Mb (méga paires bases) avec des nombres différents de réplicons (64). D'autres *Rhizobiales* incluent les pathogènes de plantes : *Agrobacterium tumefaciens* et des symbiotes des plantes : *Mesorhizobium loti* et *Sinorhizobium meliloti*. Ainsi de nombreux *Rhizobiales* vivent en étroite association avec les cellules eucaryotes. Ils ont également souvent de complexes génomes avec plus d'un chromosome et un ou plusieurs plasmides. Une hypothèse que le deuxième chromosome peut avoir son origine en tant que mégaplasmide a été émise et est soutenue par l'observation que beaucoup d'entre eux ont un plasmide comme origine de répllication (1).

1.3.1 GENOMES DE *BARTONELLA*

Les premières espèces de *Bartonella* à avoir leur génome entièrement séquencé étaient les agents pathogènes humains, étroitement apparentés : *B. henselae* et *B. quintana* (65). Les deux génomes sont constitués d'un seul chromosome circulaire, de 1,9 et 1,6 Mb

respectivement, qui semblent être des versions réduites du chromosome I de l'espèce *Brucella*. Un certain segment des génomes affiche une similarité plus élevée au chromosome II de *Brucella*. Ce segment est appelé la zone chromosomique de haute plasticité. La différence de taille du génome est principalement expliquée par un prophage et plusieurs îlots génomiques uniques à *B. henselae*, tandis que *B. quintana* n'a pratiquement pas de gènes uniques. La présence de restes du prophage et les îles de *B. quintana* suggère qu'ils étaient présents chez un ancêtre commun aux deux espèces (1).

Sont également séquencés, en 2007, le génome de 1,4 Mb de *B. bacilliformis* (*Institut for Genomic Research, non publié*) et celui de 2,6 Mb de *B. tribocorum* (66). La relation phylogénétique de *B. tribocorum* à *B. henselae* et *B. quintana* contrairement à *B. bacilliformis* se reflète également dans son génome, qui a une structure et un contenu qui est plus semblable aux deux premiers (1).

1.3.2 PHAGES DE *BARTONELLA*

Longtemps avant que tout génome de *Bartonella* n'a été séquencé, les scientifiques ont observé des particules de type bactériophage (bacteriophage-like particles : BLPS) dans plusieurs espèces du genre *Bartonella* (67), (68), (69), (70). Les particules de phages de *B. bacilliformis* et *B. vinsonii berkhoffii* avaient la queue, tandis que ceux de *B. henselae* et *B. quintana* manquaient de queues, mais tous contenaient un ADN double brin linéaire de 14 ko (kilos octets), emballé dans une tête de forme ronde à icosaédrique, de 40-80 nm de diamètre. Malgré plusieurs tentatives, personne n'a été en mesure de caractériser complètement la bande de 14 kb (kilo bases). Il a été suggéré que ça contenait un ADN bactérien hétérogène. Le séquençage des génomes de *Bartonella* ne permettait pas de résoudre le mystère (1).

1.3.3 DIVERSITE GENOMIQUE DANS *BARTONELLA*

La diversité génomique au sein d'une espèce de *Bartonella* a été étudiée et détaillée dans *B. henselae*. Multi locus sequence typing (MLST) de sept gènes dans plus de 200 isolats a donné 14 types de séquences distinctes (71), (72), (73). La plus discriminante multi spacer typing

(MST) de neuf régions intergéniques a donné 39 types dans 126 isolats de chat (74) et 16 types dans 75 isolats humains (75). La plupart des études n'ont révélé aucune distinction claire entre les isolats infectant les humains ou les chats, ou entre des isolats des différentes parties du monde. Cependant, dans le MST des isolats des chats, les souches européennes et asiatiques se regroupent dans deux groupes distincts. La comparaison des gènes d'une collection mondiale de 38 souches de *B. henselae* a montré que les gènes les plus variables ont été localisés dans les îlots génomiques et le prophage (73). Dans plusieurs souches, l'ADN de la zone chromosomique de la plasticité élevée a été fortement amplifiée jusqu'à la croissance prolongée (73).

La diversité génomique a également été étudiée par le MST dans *B. quintana* et MLST dans *B. grahamii*. MST de 34 espaceurs identifiaient 4 types dans 71 souches de *B. quintana* (75). Cette faible divergence de séquence a été attribuée à une réduction de la population associée à un changement récent d'hôte de cette espèce. L'analyse de trois isolats australiens de *B. quintana* a donné trois nouveaux types (76). MLST d'une collection mondiale de 31 souches *B. grahamii* a suggéré une répartition géographique de cette espèce (77).

Bien que les bases moléculaires des interactions entre *Bartonella* et leurs hôtes mammifères sont loin d'être complètement comprises, des études génomiques ont identifié de nombreux gènes d'adaptabilité (1).

De récentes analyses phylogénétiques montrent que la bactérie s'est adaptée en acquérant des agents autorisant le transfert horizontal de gènes. Des analyses de *B. tribocorum*, *B. grahamii* soulignent des taux extensifs de « transfert génétique horizontal » trouvés dans les espèces de *Bartonella*, souvent associés aux variants nouveaux hôtes-vecteurs. Les gènes du système de sécrétion de type IV (*VirB/D4*, *Trw* ou *Vbh*) ou T4SS pour "type IV secretion system", autorisent l'échange génétique (conjugaison et exportation ou importation d'ADN) et la libération d'effecteurs (protéines, complexes macromoléculaires ou ADN-protéines) dans la cellule cible eucaryote (78), (79). Le système *VirB* est nécessaire à l'infection des cellules endothéliales (77), et il est censé former un pili qui s'étend sur les deux membranes bactériennes et la membrane des cellules hôtes. Grâce à ce pili, les protéines effectrices de *Bartonella* (*Bartonella* effector proteins : *Beps*) (80), codées en aval des gènes *VirB*, sont transférées dans la cellule hôte. Ces protéines induisent une activité anti-apoptotique et une reprogrammation angiogénique de la cellule hôte, conduisant à la formation des lésions

vasoproliferatives (81), (82), (83). Des analyses phylogénétiques suggèrent qu'il a été transféré horizontalement au *Bartonella* (84). *Trw* est essentiel pour l'invasion des érythrocytes (85), et forme probablement une structure similaire à celle de *virB*. Cependant, il n'existe pas de protéines effectrices connues pour *Trw*, et il a été suggéré que ce système est impliqué dans l'adhésion des cellules hôtes. *Trw* est le seul parmi les T4SSs dont les gènes codant pour des protéines du pili sont répétés, et l'analyse révèle une sélection divergente sur ces gènes, ce qui renforce le rôle de ce système dans l'adhésion (86). Il est susceptible d'avoir été transféré horizontalement à *Bartonella* (84). Un troisième T4SS, appelé *Vbh* et étroitement liés à *VirB*, a été identifié dans le génome de *B. tribocorum* (66). La fonction de *Vbh* n'a pas été étudiée, mais il a été suggéré que ce système a été acquis tôt par *Bartonella* et, plus tard remplacé dans une lignée par *Virb* (1).

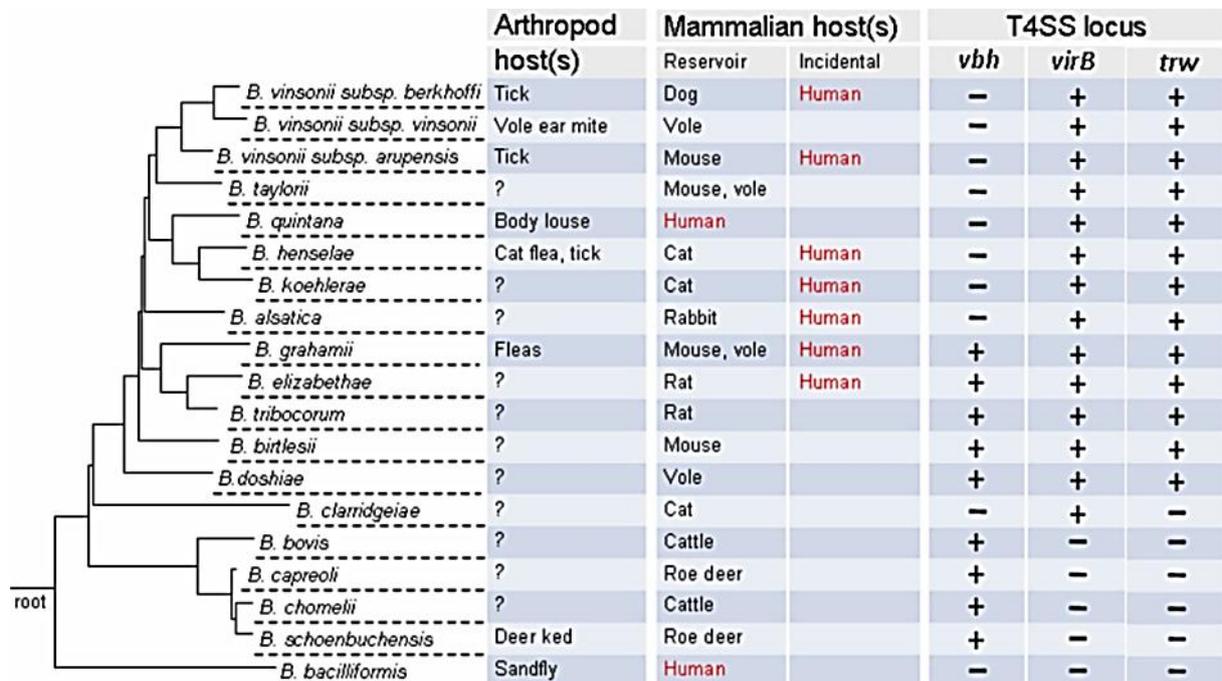


Figure 1: Phylogénie, vecteurs arthropodes et hôtes mammifères du genre *Bartonella* et la distribution des systèmes de secretion type IV. A gauche : arbre phylogénétique du genre *Bartonella* basé sur a Multilocus Sequence Analysis (MLSA) (66). A droite : Tableau représentant la spécificité d'hôte et présence et absence de loci codant T4SS dans les différentes espèces de *Bartonella* (87).

Des adhésines autotransportrices trimériques à *Bartonella* (Trimeric Autotransporters Adhesins (TAA) interviennent dans l'étape critique du déclenchement de la pathogénèse de *Bartonella* par liaison aux constituants de la matrice extracellulaire des cellules hôtes (88),

qui conduit au maintien des cellules bactériennes à la surface comme prérequis pour une translocation efficace des protéines effectrices de sécrétion du type IV (87). Quatre familles d'autotransporteurs sont présentes chez *Bartonella*. Bartonella adhesin A : *Bad A* se trouve chez *B. henselae* (88) et la famille *Vomp* (variably expressed outer membrane proteins) chez *B. quintana* (89). Bien que les locations génomiques de ces gènes sont relativement conservées ; ils affichent une extrême diversité entre les espèces, de point de vue séquence, longueur et nombre de copie, avec un haut nombre de copie chez les espèces associées aux rongeurs. *Bad A* de *B. henselae* est très large (protéine de 340 kDa (kilos Daltons)), contrairement à la famille *Vomp* de *B. quintana* qui regroupe 4 protéines de 100kDa qui sont codées par 4 gènes *Vomp* étroitement liés et qui ont un arrangement en tandem. *BrpA* (Bartonella repeat protein A) de *B. vinsonii subsp. Arupensis* a été aussi décrit et c'est une protéine de 382kDa (90). L'autotransporteur *Arp* (Acid repeat protein) contient un nombre variable de répétitions (96). Dans *B. henselae*, *BadA* sert de médiateur de liaison aux cellules endothéliales, il a un rôle possible dans l'induction de troubles vasoprolifératifs par stimulation du facteur de croissance des cellules vasculaires endothéliales ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (88), et il est crucial pour l'autoaggrégation (91). Dans *B. quintana*, les gènes *Vomp* ont essentiellement la même fonction, mais ne sont pas impliqués dans l'adhésion aux cellules endothéliales (92), (93), (94). La perte de deux des quatre gènes au cours d'infection dans un modèle animal macaque a suggéré que ces gènes subissent des variations (94). Il ya aussi d'autres familles d'autotransporteurs, l'une d'elles est appelée *Iba* (inducible Bartonella autotransporter), car ils sont régulés à la hausse lors de l'infection des cellules endothéliales (95). Plusieurs Autotransporteurs sont essentiels pour une infection du sang dans *B. tribocorum* (63).

Certaines espèces de *Bartonella* ont aussi « deux partenaires T5SS : Type V secretion system , constitué par les gènes *fhaB / hec* (*filamentous hemagglutinin B gene / hemolysin activator protein or transporter domain FhaC*). Leur fonction dans *Bartonella* n'a pas été déterminée, mais la protéine homologue dans *Bordetella pertussis* constitue l'adhésine majeure de cette espèce et est un important facteur de virulence (57). Contrairement aux autotransporteurs, l'opéron d'hémagglutinine filamenteuse *fha/hec* est seulement présent dans quelques espèces et les locations génomiques ne sont pas conservées. Les espèces associées aux rongeurs ont les nombres de copies les plus élevés. Une analyse phylogénétique révèle deux clades séparés de *FhaB* dans *Bartonella*, dont chacun avec des proches homologues dans d'autres genres.

Ceci suggère qu'il y'avait deux acquisitions séparées de *fha/hec* par *Bartonella*, don't une peut avoir pris place seulement dans la lignée associées aux rongeurs (57).

Selon quelques études, les infections intra-vasculaires de longues durées pourraient être expliquées par des co-infections et par les variations antigéniques permettant à *B. henselae* d'esquiver la réponse immunitaire de l'hôte. La co-infection des hôtes mammifères par différentes espèces de *Bartonella* ont été décrites. Les variations antigéniques ont été identifiées durant l'infection humaine par *B. quintana*. La variabilité antigénique pourrait être liée à la présence de répétitions en tandem dans certains gènes codant quelques protéines externes (59).

Le genre s'est diversifié en espèces en s'adaptant aux différents mammifères hôtes. Cette diversité génétique et la variabilité des souches semblent augmenter l'aptitude des bartonelles, notamment *B. henselae*, à infecter non seulement leurs hôtes spécifiques, mais aussi un certain nombre d'hôtes accidentels. Ces nouvelles lignées sont identifiées et classifiées par l'utilisation de chaque type de séquençage uni- et multi-locus plus discriminatoire et les analyses basées sur le VNTR (Variable Number Tandem Repeat), afin de révéler le modèle évolutif dans le contexte des limites géographiques et des espèces hôtes et vectrices. Dr. Boulouis a découvert la microévolution de *B. henselae* chez les chats en Algérie. Ici le pouvoir de l'analyse des répétitions en tandem du nombre variable du multi-locus pour identifier la microévolution d'une des espèces de *Bartonella* dans son hôte devient évident. En effet, dans les études du Dr. Boulouis, la majorité des isolats ont des modèles VNTR uniques, non observés précédemment chez les chats d'autres régions du monde, montrant l'évolution dans une population d'hôte, géographiquement séparée (59).

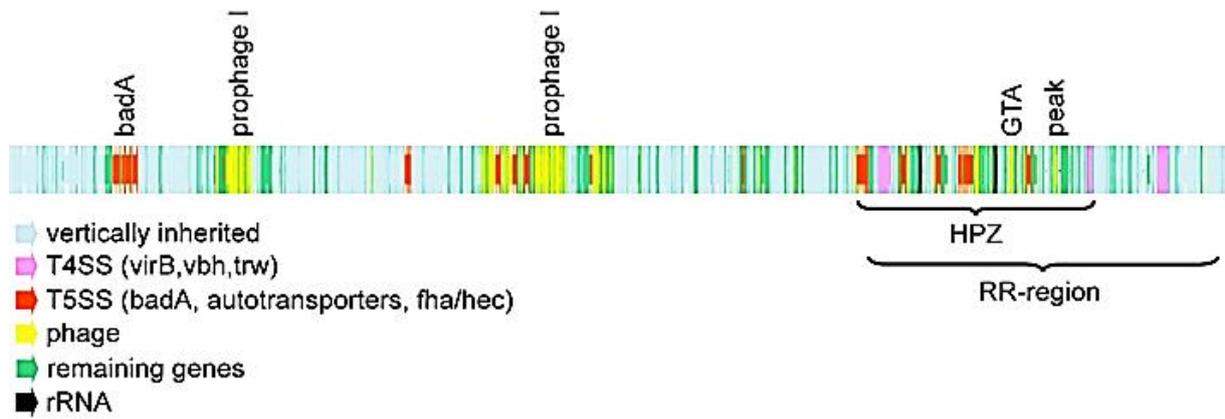


Figure 2: Représentation schématique du génome de l'espèce *B. grahmi* (57).

1.4 IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE *BARTONELLA*

De nombreuses méthodes ont été utilisées dans le but d'identifier les *Bartonella*. Le nombre d'espèces décrites est en augmentation, et la faune sauvage semble receler d'autres espèces, d'intérêt médical encore inconnu. Les interrogations sur leur transmission vectorielle, leur entretien dans l'espèce réservoir et le pouvoir zoonotique de certaines d'entre elles trouvent ainsi plus facilement des éléments de réponse (4), (6), (9), (89). L'identification spécifique est d'une part directe (culture de sang, de biopsies de peau ou de valve, amplification génique par PCR) et d'autre part indirecte (sérologie). Les méthodes d'identification à visée taxonomique, clinique ou diagnostic font l'objet de cette analyse.

1.4.1 CULTURE ET MICROSCOPIE

Les bartonelles sont de petits bacilles ou des cocco-bacilles à Gram négatif, polymorphes, non acido-alcoolo-résistants, immobiles (à l'exception de *Bartonella bacilliformis*, de *Bartonella capreoli*, de *Bartonella chomelii*, de *Bartonella clarridgeiae* et de *Bartonella schoenbuchensis*), aérobies, oxydase négative (*Bartonella vinsonii* est faiblement oxydase positive lorsque l'oxydase est recherchée par la technique de Kovacs), catalase négative (*Bartonella henselae* est faiblement catalase positive), n'utilisant pas les sucres et de culture difficile mais possible (90).

Une croissance optimale nécessite une atmosphère humide enrichie de 5% de dioxyde de carbone (sauf pour *Bartonella bacilliformis* et *Bartonella clarridgeiae* qui cultivent mieux en l'absence de dioxyde de carbone), une température de 34 à 37 °C (sauf pour *Bartonella bacilliformis* qui cultive mieux à 28-30 °C) et des milieux contenant un minimum de 5% de sang de lapin ou de cheval (le sang de mouton donne de moins bons résultats). À l'isolement, la culture nécessite une incubation prolongée, toujours supérieure à 4 jours et pouvant atteindre 4 semaines ou plus. Après plusieurs repiquages, la culture est généralement plus rapide (sauf pour *Bartonella koehlerae*) et les colonies apparaissent en 3 à 6 jours. Les colonies peuvent être polymorphes mais elles sont généralement petites, de couleur blanchâtre, souvent rugueuses et incrustées dans la gélose. La sensibilité de la culture est augmentée par la lyse des cellules eucaryotes (méthode chimique, congélation-décongélation, centrifugation-lyse pour les hémocultures) avant ensemencement. La longue période d'incubation dans une atmosphère humide augmente les risques de contamination des milieux et, pour limiter ce risque, il est conseillé d'ajouter aux milieux de l'amphotéricine B et d'envelopper les boîtes dans du Parafilm après les 24 premières heures d'incubation. In vitro, *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* et *Bartonella henselae* sont cultivables en 10 à 15 jours sur cellules endothéliales humaines et *Bartonella clarridgeiae* cultive sur cellules Vero. L'utilisation des cultures cellulaires (cellules endothéliales, cellules Vero, cellules HeLa, cellules L929, cellules de carcinomes humains) est possible mais peu utilisée par les laboratoires non spécialisés. Elle est généralement considérée comme une technique d'appoint permettant d'augmenter les chances d'isolement (90).

1.4.2 SEROLOGIE

Il existe très peu d'outils immunologiques permettant de caractériser des antigènes à des fins de classification ou d'identification. Des anticorps monoclonaux ont été mis au point pour l'identification de *B. quintana* (91). La présence chez *B. henselae* d'un antigène conservé d'un poids moléculaire de 17 kDa, codé par des gènes spécifiques mais croisant avec les autres bactéries du genre pourrait permettre la mise au point d'un test sérologique «universel» et d'outils moléculaires spécifiques d'espèces (92). Chez *B. clarridgeiae* la présence d'un flagelle (marqueur *a priori* intéressant car présent chez deux espèces de Bartonella seulement), dont l'immunogénicité a été contrôlée, a permis la mise au point d'un test sérologique encore expérimental, évalué sur 724 sérums, dans le cadre de lymphadénopathies

et destiné à pallier l'absence de biopsie ganglionnaire ou de culture après bactériémie (42). La sérologie comme moyen de diagnostic clinique de l'infection à *Bartonella* a pu ou peut servir à découvrir de nouvelles espèces, soit par des réactions faussement négatives (93), soit par des réactions croisées (6).

La sérologie est certainement la méthode la plus rapide et la plus solidement établie pour le diagnostic. La recherche d'anticorps est la technique la plus facile à mettre en œuvre et elle fait appel soit à l'immunofluorescence indirecte soit à l'ELISA. La sérologie présente toutefois quelques inconvénients : 1) les titres en anticorps varient selon le mode de préparation des antigènes (bactéries cultivées sur milieux gélosés ou en cultures cellulaires) ; 2) les sujets contaminés par le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus) et atteints de péliose ou d'angiomatose ont des titres en anticorps très faibles ; 3) environ 10% des patients atteints de maladie des griffes du chat ne présentent pas d'anticorps à un taux détectable ; 4) il existe des différences antigéniques entre les souches de *Bartonella henselae* expliquant certaines discordances ; 5) il existe des communautés antigéniques entre *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana* ; 6) il existe de nombreuses réactivités antigéniques entre les *Bartonella* sp. et d'autres bactéries notamment, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* et *Chlamydophila psittaci*. Au Centre National de Référence des *Rickettsia*, un titre en IgG (Immunoglobuline G) supérieur à 100 est considéré comme significatif pour le diagnostic d'une maladie des griffes du chat ou d'une fièvre des tranchées évoluant depuis peu de temps et un titre de 800 ou plus est considéré comme significatif pour un diagnostic d'endocardite (90).

1.4.3 EXAMEN ANATOMOPATHOLOGIQUE

Au cours de la maladie des griffes du chat l'examen histologique du ganglion montre un granulome géantocellulaire non spécifique, partiellement nécrotique au sein duquel *B. henselae* peut être mise en évidence par la coloration de Warthin-Starry. L'examen anatomopathologique permet également d'écartier un néoplasie (carcinome épidermoïde, lymphome.) (94).

Les lésions d'angiomasose bacillaire cutanée se caractérisent par une prolifération capillaire lobulaire, et des cellules endothéliales constituant la paroi des néovaisseaux. Ces cellules endothéliales peuvent saillir dans la lumière vasculaire et l'obstruer. Des amas bactériens peuvent être révélés au sein du stroma, par la coloration à l'hématoxyline-éosine sous forme d'amas éosinophiles, par imprégnation argentique (coloration de Warthin Starry), ou de façon plus spécifique par immunofluorescence directe ou immunohistochimie. L'aspect histologique est semblable à celui observé dans les lésions de la verruga peruana, et se différencie aisément des lésions de la maladie de Kaposi (94).

La péliose hépatique se caractérise par une prolifération intense des capillaires sinusoides, responsable de la formation de larges espaces vasculaires, associée à un stroma myxoïde contenant quelques cellules inflammatoires. Comme pour l'angiomasose bacillaire, des bactéries peuvent être visualisées dans le stroma par les techniques précédemment citées. Enfin, l'examen anatomo-pathologique des valves cardiaques réséquées au cours des endocardites à *Bartonella* montre des végétations massives avec une destruction extensive du tissu valvulaire sous-jacent. De nombreuses bactéries peuvent être mises en évidence dans ce tissu valvulaire par imprégnation argentique (coloration de Warthin-Starry) ou par immunohistochimie (94).

1.4.4 COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET GC % :

Ces deux méthodes ont été largement utilisées pour de nombreuses bactéries. Le pourcentage en Guanine-Cytosine : GC % des *Bartonella* est compris entre 39 et 41 %. Des arbres phylogéniques ont été construits sur la base de ce critère, soit avant l'époque de la génomique, soit afin de situer le genre *Bartonella* par rapport à d'autres espèces bactériennes génomiquement voisines (*Brucella*) ou caractérisées par un mode de vie intra-cellulaire chez l'hôte (*Rickettsia*, *Coxiella*) (41).

Seuls quatre acides gras sont présents dans la composition des bactéries du genre *Bartonella* (36). Les deux acides gras dominants chez toutes les *Bartonella* sont les acides cis-11-octadécanoate et hexadécanoate (54 % et 20 % respectivement). *B. elizabethae* et *B. bacilliformis* contiennent des quantités élevées d'heptadécanoate (19 %), *B. elizabethae*, *B.*

quintana et *B. henselae* des quantités élevées d'octadécanoate (23 %) (95). Les difficultés d'obtention en quantité suffisante de culture de ces bactéries rendent cette technique délicate, et l'identification spécifique n'est pas possible pour chacune des espèces du genre *Bartonella*. Le pouvoir discriminant de ces deux méthodes étant insuffisant, la détermination phénotypique des bactéries du genre est alors impossible. Le contenu en guanine et cytosine a été cependant un élément supplémentaire du rattachement du genre *Rochalimaea* au genre *Bartonella*, qui ne comptait alors que *B. bacilliformis* (40).

1.4.5 IDENTIFICATION PAR LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'amplification directe par PCR est la méthode la plus efficace et la plus rapide pour la mise en évidence du genre *Bartonella* en raison des difficultés de la culture. L'amplification de ce genre est réalisée par PCR simple (96). L'amplification de divers gènes ou portions des gènes (gènes de ménage ou spacers) a été développée, ces segments étant spécifiques soit de genre soit d'espèce. Les gènes les plus souvent amplifiés sont : *gltA* (citrate synthase) (47), (97), (98), *ITS* (Intergenic gene Spacer, entre le 16S et le 23S) (63), (99), (100) *ribC* (Chaîne _ riboflavine synthase gene) (101), (102), *groEL* (protéine du choc thermique) (103), *rpoB* (sous unité β _ de l'ARN polymérase) (63), *ftsZ* (gène d'une protéine de la division cellulaire) (104), (105), et le gène codant pour l'ARN 16S. La PCR quantitative en temps réel (rt-PCR) utilisant des sondes spécifiques est également utilisée (100). Les amplicons obtenus sont soumis à une analyse électrophorétique des fragments de restriction ou à un séquençage (7).

1.4.5.1 IDENTIFICATION PAR ANALYSE DE LA SEQUENCE DU GENE *ARNr 16S*

L'outil universel d'identification moléculaire bactérienne est le gène de l'acide ribonucléique ribosomal 16 S: *ARNr 16S* (106), (107). Il mesure environ 1500 paires de base, il évolue lentement et possède des séquences hautement conservées en 5' et en 3' ce qui permet l'emploi d'amorces universelles. Plusieurs milliers de séquences de ce gène sont actuellement déposées dans les banques de données (7). C'est le premier gène utilisé et qui a induit le rapprochement des genres *Bartonella*, *Grahamella* et *Rochalimaea*. Toutes les bactéries du genre *Grahamella* présentaient les caractères phénotypiques (morphologie, difficultés de culture, caractère aérobie, neutralité enzymatique) et le contenu en cytosine et guanine (40 %)

des *Bartonella* (7). L'analyse de leur séquence ARNr *16S* a montré 98,5 % d'homologie avec la séquence correspondante de *Bartonella bacilliformis*, ce qui a motivé l'unification des genres *Grahamella* et *Bartonella* en un genre unique : *Bartonella* (46), (61). D'une façon analogue, en 1992, la comparaison d'une séquence (nommée *Houston-1*) identifiée à partir d'un patient atteint du SIDA et présentant une bactériémie fébrile avec une autre séquence identifiée antérieurement (appelée *BA-TF* et proche de *R. quintana*) permit d'établir leur homologie. Ce germe fut appelé *R. henselae*. A partir d'une autre bactérie inconnue et responsable d'une endocardite, une séquence homologue à 98,9 % fut identifiée, et la bactérie était appelée *R. elizabethae*. L'ensemble des bactéries du genre ayant montré plus de 97,8 % d'homologie de séquence avec *B. bacilliformis*, *Rochalimaea* fut aussi absorbé (40), (48).

Toutefois, si l'analyse des séquences permet de rattacher un germe du genre *Bartonella*, au sein de ce même genre, l'homologie de séquence (supérieure à 97,8 %) ne permet pas toujours d'en faire un outil discriminant. L'arbre phylogénique construit à partir de l'analyse d'un fragment nucléotidique de 1300 paires de bases pour 11 espèces connues de *Bartonella* possède des branches très courtes et on a peine à différencier deux groupes d'espèces. *B. koehlerae*, isolée au cours d'une enquête épidémiologique sur des chats bactériémiques, n'aurait pu être différenciée de *B. henselae* avec ce seul outil (99,54 % d'homologie) (35). A l'opposé, une observation unique de neurorétinite accompagné de la présence d'un ADN dans les fluides intraoculaires, dont le séquençage du gène ARNr *16S* aboutit à 100 % d'homologie avec *B. grahamii*, a permis d'incriminer cette espèce. Une autre approche consiste à exploiter les séquences d'un autre gène, moins conservé, dont les profils de restriction permettent en routine de s'affranchir du séquençage et donc de disposer d'un outil plus simple (7).

1.4.5.2 IDENTIFICATION PAR LE PROFIL DE RESTRICTION DU GENE DE LA CITRATE SYNTHASE (*gltA*) :

La citrate synthase est une enzyme intervenant dans la régulation de la production d'ATP (Adenosine Tri-Phosphate), catalysant la synthèse du citrate à partir de l'oxaloacétate et d'acétyl-coenzyme A dans le cycle des acides carboxyliques (36), (60). A l'origine, l'amplification de la partie 3' terminale (selon les techniques décrites, environ 300 à 400 paires de bases) du gène de cette enzyme (*gltA*), puis la digestion des amplifiats par l'enzyme

de restriction TaqI a été employée pour la détection et l'identification rapide des *Rickettsia*, puis des *Rochalimaea quintana et henselae* (40). Cette méthode permet de distinguer les *Bartonella* des autres bactéries responsables d'endocardite (47). Elle autorise aussi une distinction d'espèces, puisque les profils de migration après digestion par deux enzymes : l'endonucléase AscI et la Taq polymérase I : TaqI) sont différents. D'autres couples (38) et même des trios d'enzymes (35) ont été essayés pour définir des profils pour des espèces de *Bartonella* isolées de ruminants (33) et non encore définies par la taxonomie, ou d'origine féline (35) contribuant, grâce à un profil de restriction différent de *B. henselae et B. quintana*, aux premières étapes de la description de *B. koehlerae* (35).

Le séquençage de *gltA* montre un pourcentage d'homologie de 80 % à 98 % entre les espèces. Ces écarts de chiffres sont nettement supérieurs aux performances du séquençage du *ARNr 16S*, comprises entre 97,8 et 99,6 %, (61) et confirme donc le pouvoir discriminant de cet outil. Cependant, cette méthode est plus appropriée à la bactériologie pratiquée dans le cadre d'un diagnostic clinique, pour identifier rapidement des espèces connues, qu'à l'identification des espèces de *Bartonella* inconnues, pour lesquelles l'étape de séquençage est obligatoire (32), (61). La découverte d'un profil connu sur une bactérie inconnue (ou l'inverse) est cependant un indice dans l'étude de l'épidémiologie moléculaire des *Bartonella* (6), (32), (33), (37).

1.4.5.3 IDENTIFICATION PAR ANALYSE DES AUTRES GENES :

Le nombre d'espèces de *Bartonella* « nouvelles » étant en augmentation permanente avec un rythme soutenu, et le fait que certaines espèces animales ou l'homme puissent être infectées ou co-infectées rend nécessaire la mise au point d'outils permettant une identification de l'espèce. Plusieurs gènes candidats ont été récemment éprouvés. La majorité des techniques utilisées l'a été dans le cadre du contexte clinique du diagnostic de la maladie des griffes du chat, le but recherché étant prioritairement le diagnostic de *B. henselae*, à différencier des autres *Bartonella* de l'homme et du chat (7).

Les gènes de synthèse de la riboflavine sont d'excellents candidats, car ils évoluent peu et sont différents d'un gène bactérien à l'autre (101). De plus, ce sont des gènes absents du règne

animal. Le gène utilisé (*ribC*) s'est révélé hautement conservé au niveau de l'espèce, avec plus de 99 % d'homologie au sein de l'espèce *B. henselae*. Le pourcentage d'homologie de séquences entre espèces varie de 82 à 91 % pour les espèces *B. quintana*, *B. bacilliformis* et *B. clarridgeiae*. Cette méthode est surtout utile pour différencier cette dernière de *Bartonella henselae*, à partir d'une PCR unique et du couple d'amorces *PBH5* et *PBH15* (101).

Dans un but similaire, restreint au seul diagnostic de *B. henselae*, à partir d'un prélèvement sanguin et sans passage en culture, l'amplification du gène d'une protéine de choc thermique (*htrA*) a permis en un seul examen, avec le couple d'amorces *CAT1-CAT2* (Chloramphenicol Acetyl Transferase 1/2 genes) l'identification de cette espèce, dont cette protéine est par ailleurs un facteur de virulence (108). Toutefois, ces mêmes amorces reconnaissent à l'identique au moins *B. quintana*, et la reproductibilité de cette méthode n'a pas encore été évaluée, puisque réalisée à partir d'un seul patient (109). Dans une autre étude utilisant d'autres amorces, la sensibilité de la détection par PCR du gène *htrA* (high temperature requirement plasmic serine protease A gene) s'est montrée élevée (87 %) si un résultat positif s'accompagne d'images histopathologiques « typiques » (quoique non spécifiques) et d'un résultat positif en sérologie (110). La sensibilité de cette PCR seule étant de 65 %, il est difficile de recommander le choix du gène *htrA* en diagnostic de routine en l'absence de biopsie (7).

L'identification des diverses *Bartonella* sp. par utilisation des séquences du gène ARN polymérase β subunit (*rpoB*) est aussi possible. Cette approche a montré, par le passé, son utilité dans l'identification des Enterobacteriaceae (63).

Dans le cas de l'opéron *groESL* de *Bartonella bacilliformis*, l'analyse de séquence a révélé un opéron contenant deux gènes de 294 (*groES*) et 1632 nucléotides (*groEL*) séparés par un espace intergénique de 55 nucléotides. Les séquences d'acides aminés déduites pour *B. bacilliformis* *GroEL* (*Hsp60*) et *GroES* (*Hsp10*) ont révélé un haut degré d'identité avec les homologues des autres *Bartonella* et α -Proteobacteria. *groES* and *groEL* sont des gènes de constitution, essentiels à la croissance à n'importe quelle température (111).

Au sein de l'espèce *B. henselae*, le profil de restriction du gène de la protéine de division cellulaire *ftsZ*, après amplification de sa partie codant la portion C terminale, permet de

différencier 3 sous-types (plus clairement qu'une PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) sur le gène *gltA*), ou de rattacher une bactérie isolée d'un prélèvement clinique à cette espèce. Les performances d'un test fondé sur cette technique n'ont pas été répétées sur plus de 10 isolats provenant de manifestations cliniques, le recrutement des cas n'autorisant sans doute pas de grandes séries (105). L'avantage de cette protéine pour le genre *Bartonella* est sa taille inhabituelle (poids moléculaire : 75 kDa), le double de la plupart des autres organismes bactériens, avec un gène composé d'une partie hautement conservée (environ 1600 paires de base) au sein des procaryotes et une partie variable qui peut être amplifiée pour donner des amplifiats de taille spécifique d'espèce. Ainsi en une seule étape de PCR-RFLP, un jeu d'amorces permet d'obtenir des amplifiats spécifiques de *B. bacilliformis* (612 paires de base), *B. henselae* (354 paires de base), *B. quintana* (367 paires de bases) (112). Le faible nombre d'espèces et de souches testées ne permet pas encore d'assurer le pouvoir discriminant et la reproductibilité d'une telle méthode. La rapidité d'obtention des résultats peut en faire une méthode intéressante en laboratoire de diagnostic (7).

1.4.5.3.1 SIMPLE PCR-AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT DU GÈNE *ftsZ* DES *BARTONELLA*

Le protocole utilisé se base sur l'amplification du fragment du gène *ftsZ* codant la protéine *FtsZ* de la division cellulaire, ayant un rôle régulateur dans le cycle cellulaire.

La PCR consiste à obtenir à partir d'un échantillon biologique complexe d'importantes quantités de la séquence d'acide nucléique spécifique et de longueur définie parmi d'autres séquences d'ADN, à l'aide de deux amorces bien définies et situées de part et d'autre de la région considérée, grâce à une ADN polymérase. On produit ainsi une quantité de cet acide nucléique facilement détectable même lorsque l'échantillon d'origine est pauvre en matériel biologique (ordre de nano gramme).

Par le biais d'une série de cycles thermiques différentiels répétitifs (un cycle représente trois températures différentes) l'enzyme de polymérase d'ADN aide à répliquer et à amplifier la séquence de manière exponentielle entre la paire d'amorces. Le déroulement d'un cycle de PCR pour *Bartonella* passe par les trois phases suivantes: la dénaturation, l'hybridation et l'élongation :

*Première phase : Dénaturation thermique, $t = 95\text{ °c}$

A cette haute température, le fragment d'ADN est dénaturé. Les liaisons d'hydrogènes qui relient les deux brins d'ADN sont rompus et la double hélice se déroule. L'ADN est transformé en simple brin.

*Seconde phase : hybridation des amorces, $t = 55\text{°c}$

Le choix de la température d'hybridation (T_h) résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces. une amorce sens et une amorce antisens, qui jouent le rôle cible s'hybrident sur les deux brins simples d'ADN, délimitent ainsi la séquence à amplifier et permettent ensuite à la polymérase de faire son travail. La température réactionnelle doit être inférieure à la température de fusion des amorces pour permettre leur hybridation. Elle est calculée selon la formule de calcul de la température de fusion : T_m .

$$T_m = 4(\sum G + \sum C) + 2(\sum A + \sum T) \quad , T_m (ftsZf) = 4(4+3) + 2(8+7) \text{ et } T_m (ftsZr) = 4(4+4) + 2(6+7).$$

$$T_m = (T_{mf} + T_{mr}) / 2 \quad , T_m = (58+58)/2$$

$$T_h = T_m - (2 \text{ à } 5\text{°c}) \quad , T_h = 58-3 = 55\text{°C}$$

*Troisième phase : élongation (extension des amorces) $t=72\text{°c}$

72°c est la température à laquelle l'enzyme ADN polymérase fonctionne le mieux. Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La Taq polymérase (ADN polymérase ADN dépendante) allonge les amorces en incorporant des désoxynucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. Cette réaction a lieu dans le sens 5'-3' à une température intermédiaire entre celle nécessaire à la dénaturation et celle de l'hybridation des amorces.

La PCR s'achève par une étape d'élongation à 72°C. Les échantillons sont conservés à 4°C ou soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose de manière à pouvoir détecter la présence des amplifiats en se basant sur la détermination de leur taille.

		<i>FtsZ/Bartonella sp.</i>	Durée
	Premier cycle	95°C	15min
39 cycles	Dénaturation	94°C	1min
	Hybridation	55°C	30sec
	Elongation	72°C	1min
	Dernier cycle	72°C	5min

Tableau 1: Programme du thermocycleur, spécifiques aux amorces du gène *ftsZ*

1.5 PREVALENCE DE BARTONELLA ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES ESPECES

Les espèces *Bartonella* sont une cause ubiquitaire de l'infection bactérienne chronique avec une prévalence d'infection excédent 50% dans beaucoup de mammifères (60). La prévalence de *Bartonella* chez les mammifères sauvages et domestiques a été étudiée dans de nombreux pays. Les variations entre l'espèce hôte, sexe, sites ou périodes échantillonnés et présence ou absence d'arthropodes sont observées (56), (113), (114), (115), (116), (117), (118) , (119), (120).

La plupart des champs d'études de *Bartonella* ont été réalisées sur des populations de rongeurs, en raison de leur abondance dans la nature et de l'importance en tant que réservoir des maladies infectieuses émergentes (1). Ces études ont révélé que *Bartonella* est présente dans la plupart des populations de rongeurs, avec une prévalence globale allant de 6% dans la région métropolitaine de Jakarta (121) à 70% dans l'extrême russe est (122). En Chine et au nord des Etats-Unis, un taux d'infection supérieur à 80% a été enregistré. En France, il est de 58.3% dans la forêt sub-urbaine de Sénart à l'île de France (118). Les estimations moléculaires de prévalence de *Bartonella* dans les rongeurs commensals invasifs en Afrique du Sud, s'élèvent à 30.9% pour *Rattus norvegicus*, 15.6% pour *Rattus rattus* et 10% pour *Rattus tanezumi* (123). Les rates femelles avaient un taux d'infection globalement élevée à celui des mâles (25.1% / 13.9%). Les individus rongeurs capturés des zones urbaines ont les

taux d'infections les plus élevés (40.5%) comparés aux zones rurales (17,8%) et péri-urbaine (17.5%). Trois espèces différentes sont présentes, la plus adaptées c'est *B. elizabethae* avec une prévalence de 82%, suivit de *B. tribocorum* (10.3%) et *B. cooperplainensis* (7.7%) (123). Une étude récente en Algérie sur 95 puces de *Xenopsylla cheopis*, 96 *Archeopsylla erinacei* et 13 *Leptopsylla segnis* recueillies respectivement sur 15 rats : *Rattus rattus*, 7 hérissons et 13 souris : *Mus spretus* montre la présence des espèces de *Bartonella* déjà décrites et autres, à savoir : (20.45% de *B. elizabethae*, 06.82% *B. tribocorum*, 11.36% *Bartonella sp* semblable à *B. rochalimae* d'un isolat de rat : *R. norvegicus* de Taiwan), (. 09.09% *B. clarridgeiae*, 25% *B. elizabethae*) et (09.09% de *B. elizabethae*) respectivement (124). La transmission verticale de *Bartonella spp.* a été observée dans 58% des embryons et dans 37% des nourrissons de souris (*Peromyscus leucopus*) et les rats sauvages (*Sigmodon hispidus*). Les isolats provenant de femelles infectées étaient phylogénétiquement homologues à ceux de la progéniture (125). 33% de chauves-souris de Guatémala abritaient 11 espèces de *Bartonella* lors d'analyses récentes (126).

D'autres études ont donné les prévalences suivantes : cerfs (98%) (127), les bovins (49%), les bovins de boucherie (89%), les bovins laitiers (17%) (128). Donatien et Lestoquard décrivent pour la première fois des bartonelles infectant des érythrocytes de bovins en Algérie (129). D'autres auteurs comme Adler et Ellenbogen le font en Palestine et en 1935 c'est le tour de Rodriguez concernant Grenade (130). Van Sacegehem met en relation des symptômes observés chez deux bovins rwandais avec des bartonelles isolées sur des frottis sanguins. Pollard et Palmer décrivent des bartonelles bovines chez des bovins américains (7). *Bartonella bovis* était isolée de 10% de Zébus et 6.8% des buffles d'eau ; des ruminants domestiques de la Thaïland rurale (131). L'isolement de *Bartonella* de ruminants a été aussi réalisé en Europe et en Amérique du Nord (33), (40). Les différents résultats obtenus des différents isolements ont révélé que les ruminants abritent une variété de souches de *Bartonella* différente sans évidente spécificité de l'hôte, et a suggéré que le transfert de *Bartonella* entre ruminants domestiques et sauvages se produit (1). 61.1% est la prévalence de *Bartonella sp.* chez les animaux sauvages libres en contact avec des tiques contre 0% en captivité. Au Japan le cerf abrite 3 espèces de *Bartonella*, incluant *B. capréoli* et deux autres probablement nouvelles. Chez les martens, on trouve 12.5% de prévalence et chez les bléreaux 6.7% (3).

La prévalence de *B. henselae* chez les chats a été étudiée dans de nombreux pays, et varie d'environ 5% à 80% (132). En règle générale, la prévalence est plus élevée dans les pays chauds, probablement en raison d'une plus forte densité de vecteurs dans les climats chauds. *B. henselae* était également plus fréquente chez les chats errants par rapport à des chats d'intérieurs (1). En Espagne, 27.9% des chats étudiés récemment portaient 21.1% de *B. henselae*, 10.9% de *B. clarridgeiae*, et en co-infection l'estimation était de 6.1% (133). La fréquence bactériémique de *B. clarridgeiae* chez les chats du monde entier est de 1-42%, légèrement inférieure à celle de *B. henselae*. Le taux de bactériémie vérifié pour *B. clarridgeiae* est d'environ 1% au Japon (134) et en Allemagne (135), environ 12% aux États-Unis (136) et entre 16% et 42% en France (137), en Philippines (138) et en Indonésie (139). Dans le même temps la prévalence est déterminée par les conditions géographiques et climatiques. Les chats des régions géographiques froides (par exemple, en Alaska) sont significativement moins susceptibles d'être infectés que ceux des régions plus chaudes (7). Les lynxes avaient 53% de *Bartonella* (140).

Le chien peut être infecté par *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. henselae* et *B. vinsonii subsp. Berkhoffii* (128). En Algérie, les résultats d'une première étude ont révélé que 31% des chiens errants étaient séropositifs pour les antigènes de *B. vinsonii subsp. berkhoffii*, *B. clarridgeiae* et / ou *B. henselae* (141). Chez les coyotes on a (32%), les panthères (6%) et les Pumas (35%) (140). La séroprévalence pour *Candidatus Bartonella marieuxii* en Irak était respectivement 40.4% chez les chacals et 12.8% chez les renards (142).

Le dépistage de *Bartonella* réalisé dans de nombreux vecteurs potentiels a montré que la prévalence de *Bartonella* chez les insectes peut être très élevée. 35% des tiques aux États-Unis (143), 26% des puces de chat en France (144), 80% des poux de cerfs en Allemagne (145) et au moins une souche de *Bartonella* a été détectée dans près de 90% des puces de rongeurs recueillies aux États-Unis (146), 59.1% de *Xenopsylla cheopsis* de rongeurs en Thaïland contenaient *B. elizabethae* (37/80 puces), *B. rattismassiliensis* (1/80), *B. rochalimae* (24/80), *B. tribocorum* (14/80) et *B. grahamii* (147).

1.5.1 REPARTITION DES ESPECES, EXPOSITION AUX RISQUES ET VECTORISATION

La répartition géographique des espèces est liée à celle des hôtes réservoirs et de ses ectoparasites vecteurs. Les résultats de publications antérieurs portent à penser qu'une compétition sélective peut permettre aux espèces de *Bartonella* de s'adapter aux hôtes mammifères alors que d'autres dominent dans les arthropodes vecteurs (148). L'importance et la diversité du réservoir animal et des arthropodes vecteurs portent à penser que l'exposition au risque est bien supérieure à ce qui a été supposé jusqu'à présent. Pour s'en convaincre, il suffit d'observer la diversité des bartonelles hébergées par les deux mammifères domestiques les plus proches de l'homme, le chat et le chien. Le rôle de réservoir du chien est controversé en raison du peu d'isolats de *Bartonella* obtenus chez les animaux sains. Par contre celui du chat n'est pas remis en question, au cours de son infection première, le nombre de *B. henselae* ou de *B. clarridgeiae* peut dépasser 106 bactéries par millilitre de sang (28).

1.5.2 CONTACT AVEC LES ANIMAUX ET TRANSMISSION DIRECTE

L'infection chronique des érythrocytes est une adaptation spécifique des *Bartonella* aux mammifères. Une espèce donnée de *Bartonella* possède généralement un seul hôte réservoir naturel. Cette spécificité est liée à l'étroite co-évolution entre le vecteur, la bactérie et l'hôte. Les hôtes réservoirs de *Bartonella* sont caractérisés par une bactériémie au long cours, pouvant présenter des récurrences. Selon l'adaptation, l'infection chronique de l'hôte est habituellement asymptomatique ou discrète, toutefois contrairement à ce qui était supposé jusqu'à présent, l'infection des animaux réservoirs peut aussi provoquer des pathologies graves. Dans la plupart des cas, la prévalence de la bactériémie chez l'espèce hôte réservoir est très élevée ; elle va du quart au tiers de la population de ce mammifère (149).

L'homme représente jusqu'ici le seul réservoir connu pour *B. bacilliformis* et *B. quintana* (19).

Outre *B. henselae*, 3 autres espèces de *Bartonella* ont été cultivées à partir d'hémocultures de chats ces dernières années : *B. clarridgeiae*, *B. weissii* (= *B. bovis*) et *B. koehlerae* (19). Cinquante quatre pour cent des chats errants de la région nancéenne se sont révélés

bactériémiques, avec isolement dans un tiers des cas de *B. clarridgeiae* (137). La fréquence bactériémique de *B. clarridgeiae* chez les chats du monde entier est de 1-42%, légèrement inférieure à celle de *B. henselae* (19).

Le chien peut être infecté par *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. henselae* et *B. vinsonii subsp. berkhoffii*. Une publication américaine montre que sa salive recelait la présence de 4 espèces de *Bartonella* : *B. bovis*, *B. henselae*, *B. quintana*, et *B. vinsonii subsp. berkhoffii*; alors même qu'il demeurait séronégatif. Selon cette même étude, la contamination par morsure de chien est tout à fait possible (128). En conséquence, l'homme peut être infecté directement par morsure, griffure, simple léchage ou par de simples caresses, si la peau de ses mains est lésée (28).

L'infection des bartonelles s'avère importante parmi les bovins d'élevage et les cervidés (élan et cerfs). Les analyses génotypiques des souches obtenues les rapprochent de *Bartonella weissii*, une bartonelle retrouvée chez le chat (5), (150). L'infection à *Bartonella weissii* étant bien plus fréquente chez les ruminants que chez les félins, Chang et ses collaborateurs concluent que les ruminants sont les réservoirs de *Bartonella weissii* et que la contamination des chats est accidentelle (7). Des ruminants domestiques, tels que les Zébus et buffles d'eau, *Bartonella bovis* était isolée. Celle des zébus ressemblait à celle trouvée en Europe, contrairement à celle des buffles (131).

Parmi les canins sauvages l'espèce *Bartonella* s'est adaptée aux lions (*B. clarridgeiae* et *B. koehlerae*). Sérologiquement, des anticorps spécifiques aux *Bartonella* sont détectés dans de nombreux animaux du zoo comme le léopard, le lion, le jaguar, le puma, etc (151). La plupart des espèces de *Bartonella* récemment isolées ne sont pas caractérisées en détail (19). *B. berkhoffii*, *B. clarridgeiae* et *B. rochalimae* ont été isolées des renards et des coyotes. Intéressant est que, jusqu'à maintenant, *Bartonella* n'a pas été détectée chez les tigres (152).

Chez les ruminants sauvages, *B. bovis*, *B. capréoli*, *B. schoenbuchensis* ont été détectées dans l'élan, le cerf mulot, le cerf de Virginie, la femelle chevrette, le cerf de Formose, cerf de Dybowski, cerf persan, et cerf Rusa (152). Une espèce nouvelle de *Bartonella* est détectée chez les bléreaux en Espagne et au Japon. Les martens contenaient une espèce relativement proche de *B. washoensis* (3).

Bartonella a également été isolé à partir d'un éventail d'autres hôtes, y compris les lapins (*B. alsatica*) (8), kangourou (*B. australis*) (153). Une espèce de *Bartonella* liée étroitement à *B. volans* et *B. waschoensis* a été détectée des loutres de rivières et des mers et *B. henselae* des loutres de mers. Une *Bartonella* sp. A été isolée des hermines au Royaume-Uni. *B. henselae* et *B. vinsonii* subsp *berkhoffii* ont été identifiées dans les cétacés (marsouins, dauphins, cachalot pigmé, bélugas) et caouannes tortues de mer (152). Des araignées *Dysdera crocata* contenaient *B. henselae* et *B. versonii* subsp. *Berkhoffii* (154). Finalement, beaucoup d'espèces de *Bartonella* sont en cour d'isolement, de détection et d'identification dans les marsupiaux australiens ou de leurs ectoparasites (152).

Les rongeurs comme le campagnol roussâtre : *Myodes glareolus* et la souris des bois : *Apodemus sylvaticus* sont infectés par diverses espèces de *Bartonella* (155). *Rattus norvegicus* abrite principalement *B. tribocorum*. *B. rochalimae* peut s'y trouvée aussi mais en un faible pourcentage (148). Le rat taupe du Cape (*Bathyergus suillus*) et la souris (*Rhabdomys pumilio*) en Afrique du sud ont été découverts abritant de différentes *Bartonella* sp (156). *B. grahamii* agent causal de neuro-rénites humaines prédomine dans les pays asiatiques, incluant la Corée où *B. taylorii*, *B. tribocorum* et *B. henselae* étaient aussi détectées dans les souris des champs (*Apodemus agrarius*) (157). On connaissait le rôle de réservoir des chauves-souris pour les virus (rage, Nipah, Hendra, Marburg...) (158). Plus récemment un large spectre d'espèces de *Bartonella* ont été isolées ou détectées dans des chauves-souris des différents continents, aussi bien que dans leur ectoparasites (152). Une enquête menée par le CDC (Center for Disease Control and prevention) estime la prévalence des *Bartonella* spp. à 33 % des chauves souris étudiées au Guatemala, avec 21 variants de 13 groupes phylogénétiques ... (126). La grande mobilité de ces animaux, leur comportement social, leur longévité importante, en font des hôtes réservoirs à surveiller d'autant plus attentivement que leurs ectoparasites demeurent mal connus (158).

Bien que la plus part les espèces de *Bartonella* n'ont pas été associées aux maladies humaines, quelques taxons comme *B. elisabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii arupensis* et *B. waschoensis* infectent les humains et rongeurs (54). Les humains immunodéprimés sont plus susceptibles d'être infectés par *B. henselae* et *B. quitana* comparés aux hôtes normaux (159). Des co-infections entre agent de sporotrichose (mycose causée par *Sporothrix schenckii*) et *B. henselae* sont observées chez les chats et humains à Rio de Janeiro. La prévalence est élevée,

ce qui rend la population féline une source potentielle d'infection pour la zoonose négligée (160), (161).

1.5.3 CONTACT AVEC LES VECTEURS ET TRANSMISSION INDIRECTE

L'infection peut aussi être transmise indirectement par un arthropode vecteur (162), (163). Il semble d'ailleurs que la transmission vectorielle est le principal, voire le seul moyen de transmission chez les réservoirs (164).

La transmission des *Bartonella* aux hôtes réservoirs ruminants semble dépendre des arthropodes hématophages : mouches piqueuses (Tabanidae, Stomoxidae, Hippoboscidae) ou tiques (28). Les micromammifères (rongeurs et insectivores) connus pour héberger les stases préimaginales des tiques révèlent des prévalences allant de 30 à plus de 60 % (163), (165). Il n'est donc pas surprenant de rencontrer aussi fréquemment ces bactéries chez les tiques, d'autant qu'elles possèdent une transmission trans-stadiale. Pour autant cela ne préjuge en rien de la compétence ou de la capacité vectorielle des tiques (28). Il n'existait jusqu'à présent qu'un faisceau d'éléments suggérant que les tiques jouaient un rôle dans la transmission des *Bartonella*. En l'absence de modèle murin, il n'était pas possible de vérifier cette hypothèse, soulevée essentiellement par des cliniciens. En utilisant une méthode de nourrissage artificiel des tiques (166), une équipe de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) est parvenue à démontrer la compétence d' *Ixodes ricinus* pour transmettre *B. henselae* (Emerging Infectious Diseases : EID de juillet 2008). Certains auteurs observent toutefois que, pour l'instant, cette découverte expérimentale n'autorise pas à conclure avec certitude qu'*Ixodes ricinus* est un vecteur compétent dans des conditions naturelles (167), (168). D'autant plus que la transmission de *B. birtlesii* par *Ixodes ricinus* in vivo a été publiée par la même équipe en mai 2011 (169). Différentes espèces de *Bartonella*, dont *B.henseleae*, *B. quintana* sont régulièrement retrouvées chez *Ixodes ricinus* en Europe (Allemagne, Italie, Pays-Bas (4), France (170), (171). À partir de tiques du genre *Ixodes scapularis* aux États-Unis et de *Ixodes ricinus* d'Italie, l'ADN de *B. henselae* était découverte (172). Diverses études réalisées dans les pays européens montrent que les tiques sont fréquemment porteuses de *Babesia*, des virus *Erve* et *TBEV-CEE* (*Tick-Born Encephalitis Virus-Central European Encephalitis viruses*), d'*Anaplasma*, de *Bartonella* (4), (173), (174), (175), (176), (177). En 2009 en Slovaquie, le sérum de 50 patients présentant un syndrome grippal inexpliqué dans

les 6 semaines consécutives à une morsure de tique a été examiné par IFA (Immunofluorescent Antibody Test) multi-antigènes (utilisant 9 antigènes de *Bartonella*, 2 de *Borrelia*, 6 de *Rickettsia*) pour la première fois en Slovaquie *Bartonella elisabethae*, ont été détectés (178).

50% des chiens positifs à la *Bartonella* ont été infestés par les tiques ou les puces en Algérie (141). *B. henselae* est vectorisée par la puce *Ctenocephalides felis* ou tique du chat « *Felis catus* » à l'homme sidéen au Brésil (159), (160). Une enquête réalisée dans le Connecticut avait montré que le risque de contracter la maladie des griffes de chat était 29 fois plus important chez les personnes exposées au contact d'un chaton parasité par des puces, et qu'il était majoré par 5,5 fois chez les personnes qui s'étaient retiré au moins une tique. Parallèlement, la responsabilité des tiques a été suggérée (28), précédée quelque temps plus tôt par des auteurs européens (179) et russes (180). *B. henselae* est capable de vivre chez la puce du chat *Ctenocephalides felis*. Elle se multiplie dans son tube digestif et survit dans les déjections qui souillent la fourrure de son hôte (28). Les puces de chat transmettent *B. henselae* de chat à chat (181), (182), ce qui expliquerait pourquoi la séroprévalence est beaucoup plus élevée chez les chats de refuges que dans les populations de chats domestiques. En 1994, la bactérie a été détectée pour la première fois dans la puce du chat, *Ctenocephalides felis*. Cette puce a alors été suspectée de jouer un rôle de vecteur (182). Le taux d'infection des puces de chat par *B. henselae* varie selon les études de 3 à 50 % (144), (183). Cette association semble ubiquitaire et a notamment été montrée en zone tropicale (184), (185), (186), (187). Le rôle de *Ctenocephalides felis* dans la transmission de *B. henselae* au chat a été prouvé (181).

Récemment, *B. quintana* a été détecté dans 4,5% des *C. felis* prélevées chez des chats de France (144), dans des *Pulex irritans* prélevées chez des singes « *Cercopithecus cephus* » au Gabon (188), et dans des puces de gerbille non identifiées en Afghanistan (189). *B. clarridgeiae*, connue pour être responsable de bactériémies chez le chat mais dont le rôle pathogène pour l'homme reste à discuter, a été détectée dans 10 % à 18 % de *C. felis* prélevées sur des chats en France (144), (183), mais aussi en Thaïlande (184), aux états unis (186), et en Nouvelle-Zélande (185). *B. clarridgeiae* a été trouvée chez les puces des rats du coton. *B. koehlerae*, agent d'endocardite (190), a été identifiée dans *C. felis* en France (144) et dans des puces de gerbille non identifiées en Afghanistan (189). *B. grahamii*, agent de

neurorétinite (38), a été détectée dans des puces *Ctenophthalmus nobilis* prélevées sur des campagnols en Grande- Bretagne (191). *B. elizabethae*, agent d'endocardite (192) et *B. doshiae*, de pathogénicité inconnue, ont été détectées dans des puces de rat non identifiées en Afghanistan (189). Enfin, *B. taylorii*, de pathogénicité inconnue, a été détectée dans des puces *Ctenophthalmus nobilis* prélevées sur des campagnols en Grande- Bretagne (189), (191). A Los Angeles, deux espèces de *Bartonella* ciculent dans la puce *Xenopsylla cheopsis*, le vecteur potentiel du rongeur *Rattus norvegicus*. *Bartonella rochalimae* est l'espèce dominatrice par rapport à *B. tribocorum* (148). Les puces *Xenopsylla ramesis* servent de vecteur pour l'espèce de *Bartonella OE1-1*, qui est liée étroitement à *B. elizabethae*, entre les gerbilles (*Meriones crassus*) probablement pour le maintien de cette bactérie dans la population de gerbille, vue que la transmission verticale des femelles gerbilles à leur progéniture n'a pas été prouvée (193). Les puces du genre *Hystriochopsylla* du rat taupe peuvent porter en elles des *Bartonella sp.* et pourraient avoir une implication dans le risque de zoonose étant donné que l'homme peut être infecté par morsure du vecteur hématophage (156).

Des Poux de bois du l'ordre *Isopoda* sont isolées des *B. henselae*, trouvées chez les araignées chasseurs de poux (*Dysdera crocata*) et une mère et son fils mordus par l'araignée (154). L'infection à *B. henselae* était détectée chez deux chiens papillons et leur propriétaire à New-York habitant une maison infestée de mites. Comme les mites (*Ornithonyssus bacoti*) contenaient aussi l'ADN de *B. henselae*, les études de la compétence des mites devraient être considérées. Les mites peuvent survivre quelques mois sans repas de sang. Quand leurs hôtes normaux sont tués, elles traversent de longues distances, souvent le long des tuyaux ou de fils dans les murs pour trouver une nouvelle source de sang (194).

L'apparente spécificité des *Bartonella spp.* et des vecteurs pour un hôte vertébré particulier paraît en contradiction avec le fait que les puces de mammifères sont souvent simultanément porteuses de plusieurs espèces de *Bartonella*. C'est la raison pour laquelle certains auteurs suspectent les puces (possédant elles-mêmes des préférences d'hôtes marquées) de pouvoir s'infecter par d'autres mécanismes que la voie hématogène. La présence d'ADN de *Bartonella* dans leurs tissus reproductifs suggère aussi une possible transmission verticale qui pourrait conduire à l'accumulation d'espèces chez les puces (195). Chaque espèce de *Bartonella* possède donc probablement aussi, un arthropode vecteur propre. Ce vecteur principal a déjà

été identifié pour *B. bacilliformis*, *B. elizabethae*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. quintana* et *B. vinsonii* subsp. *Vinsonii*. Il vient de l'être pour "*Candidatus B. melophagi*, il s'agit du "faux pou du mouton" ou *Melophagus ovinus* (196). Il est suspecté pour les autres espèces, comme exemple "*Candidatus Bartonella* spp." aux États-Unis ("*Candidatus Bartonella durdenii*", "*Candidatus Bartonella volans*" et "*Candidatus Bartonella monaxi*") (197).

1.6 LES VECTEURS ARTHROPODES

Le pou est présent toute l'année. C'est un parasite permanent des mammifères, très spécifique d'hôte. Il ne quitte jamais son hôte et pond ses oeufs sur la peau ou dans les vêtements. Les sources du parasite sont les animaux déjà infestés, les litières ou le matériel. Les conditions favorisant l'infestation sont la promiscuité et le manque d'hygiène. Chez le bétail, l'infestation est maximale lorsque les animaux sont confinés en stabulation l'hiver dans des conditions d'hygiène précaires. Le pou résiste peu au jeûne et à la chaleur. Les puces ont également une répartition cosmopolite. Rares en hiver, elles sont très actives de mars à novembre. Ces parasites intermittents sont adaptés à une espèce hôte, mais ils ne sont pas spécifiques ou stricte. La transmission de pathogènes entre les espèces est donc permise, ce qui explique la transmission de la peste du rat à l'homme par la puce du rat *Xenopsylla cheopis* et les infestations de chèvres par *Ctenocephalides felis* qui normalement parasite les carnivores. Elles sont absentes des zones montagneuses au delà de 1500 à 1600 mètres. Les tiques sont présentes partout et actives au printemps et à l'automne. Des conditions météorologiques en début d'année influencent le développement de la population de tiques ; hivers rigoureux et sécheresses réduisent le nombre. La prolifération des tiques est cependant favorisée par des hivers doux et des étés humides (233). Ce sont des parasites intermittents strictement hématophages. La spécificité d'hôte est plus ou moins étroite en fonction de l'espèce et du stade évolutif. Les tiques parasitent les mammifères, les oiseaux et les reptiles (234).

Rhipicephalus sanguineus est connue comme étant la tique de chenil. Cette espèce est devenue la plus répandue à travers les tropics et les sub-tropics à cause de son alimentation spécialisée sur les chiens domestiques. Les chiens domestiques sont l'hôte pour lequel *R. sanguineus* s'est spécialisée. Elle peut être trouvée sur du bétail. Même si elle a été récupérée principalement de petits ruminants, elle a été trouvée dans de nombreuses autres espèces hôtes, qui pourrait agir comme vecteurs qui facilitent la propagation de cette espèce de tique

parmi les troupeaux. Ceci est expliqué par la promiscuité avec les autres animaux. Il est maintenant bien connu chez *R. sanguineus* qui adopte une stratégie d'attaque et élargit sa sélectivité lorsque la température s'élève au delà de 30°C (198). Les chiens sont l'hôte pour tous les stades du développement. Le comportement de cette tique est domestique et généralement monotropique. Des hôtes autres que les chiens sont généralement infestés seulement pour maintenir la population de la tique. Au Sud d'Afrique, tous les stades sont trouvés sur les chiens d'Octobre à Mai. Même si cette espèce peut vivre dans des environnements ouverts, elle s'est grandement adaptée pour vivre dans des chenils de chien et des habitations humaines. Ainsi c'est atypique pour les tiques *Rhipicephalus* qui sont généralement exophiliques. Les femelles grimpent les murs et mettent les œufs dans des fissures et crevasses de ces structures ou elles peuvent les mettre sous la literie des chiens ou à proximité des fissures et des crevasses. Les chiens attachés à une chenil peuvent devenir très infestés. Dans les habitats artificiellement chauffés, l'activité d'alimentation des tiques peut s'étendre jusqu'à l'hiver. A cause de son association avec les chiens domestiques, ces tiques apparaissent dans toutes les régions climatiques d'Afrique. Elles peuvent aussi survivre dans les régions climatiques tempérées fraîches, dans des chenils abritées et ainsi elle est étendue globalement. Cependant, elle a une population dense dans des climats chauds et humides contrairement aux climats désertiques. Comme exemple on a l'Afrique ; Madagascar et pleins d'autres pays où il y'a cohabitation entre chiens et humains (Latreille, 1806) (226).

Rhipicephalus turanicus est typique au bétail. Mouton et chiens sont les animaux domestiques à partir desquels *R. turanicus* a été le plus souvent récolté dans les régions sub-Sahariennes d'Afrique. Cette espèce de tique infecte souvent et fortement les moutons (226), (235). Elle a été aussi découverte sur des chevaux. Au Nord d'Afrique, elle est aussi trouvée au niveau des chameaux, buffles d'eau, des chèvres et des bovins. Les hôtes sauvages favoris sont en plus grande partie les carnivores et quelques oiseaux, avec quelques collections de zèbres et de phacochères. Les adultes sont plus nombreux pendant la fin des précipitations jusqu'au début de la saison sèche. *R. turanicus* est une tique des savannes, des steppes, du désert et des régions à climat méditerranéen. Elle apparaît dans les régions est du continent africain, au Soudan, en Ethiopie, Somalie au nord, jusqu'en Afrique du Sud au sud. Cependant plusieurs collectes ont été faites au nord de Namibi. Au Nord d'Afrique, elle apparaît principalement au Maroc, Algérie et Tunisie. Elle est trouvée aussi dans différents autres pays méditerranéens en Italie (229) où elle apparaît aussi le plus sur des moutons. Elle est trouvée aussi en Inde, au Pakistan et en Chine (Pomerantsev, 1936) (226).

Pour *Hyalomma detritum detritum*, les bovins sont les hôtes les plus communs pour cette espèce, mais les chevaux, moutons, chèvres et chameaux peuvent être aussi infectés. Les adultes apparaissent sur les bovins la fin du printemps avec un pic en juillet et disparaissent au début de Septembre. Cette tique est souvent domestique, l'infestation est souvent associée aux granges, écuries, hangars et enclos d'élevage. L'élevage devient infesté quand il est abrité dans ces structures. Cette espèce de tique apparaît dans les régions avec climats méditerranéen du Nord d'Afrique du Maroc à la Tunisie, en passant par l'Algérie. Elle apparaît aussi dans les régions climatiques du désert et les steppes au nord du Soudan central. Ces zones peuvent avoir été envahies par *H. d. detritum* à partir des côtes de la mer rouge ou le long de la vallée de la rivière du Nil. Sa distribution continue vers l'Est dans beaucoup de zones larges à travers l'Asie central. Cette tique est la plus abondante des tiques Ixodidés infestant le bétail au Maroc et en Tunisie. Elle apparaît d'être absente de la Libye, mais des populations isolées ont été observées en Egypte (Schulze, 1919), (226).

Hyalomma anatolicum excavatum. Bovins, ovins, chèvres, chameaux, chevaux et ânes/ baudets sont les hôtes de la tique adulte. C'est une tique ditropique. Cette tique se nourrit sur deux ou trois hôte dépendamment sur la disponibilité de l'hôte. Elle est robuste et est capable de se nourrir pendant la majeure partie de l'année, même dans des climats avec des hivers distincts. Au Nord d'Afrique elle est trouvée sur du bétail pendant toute l'année. Elle est adaptée au climat méditerranéen et les régions climatiques des steppes du monde en général et de l'Afrique du Nord spécifiquement. Elle est trouvée le plus souvent sur du bétail de la Mauritanie en Egypte, au Soudan, en Ethiopie et en Erythrée. Elle n'est pas couramment découverte au Sud du Sahara mais vers l'Est à travers l'Iran et Turkmenistan (Kock, 1844) (226).

Hyalomma lusitanicum est commune des régions européennes et du moyen-orient du bassin méditerranéen, et elle occupe certaines zones en Afrique du Nord. Les adultes sont trouvés sur des bovins et autres ruminants. En Afrique, cette tique est trouvée en Algérie et Maroc dans les climats des steppes et méditerranéen. Elle n'est pas distribuée largement ou à forte densité dans ces régions (Koch, 1844) (226).

Rhipicephalus bursa est l'une des espèces commune de l'élevage en Afrique du Nord. Dans le bassin méditerranéen, cette espèce est considérée comme un ectoparasite majeur de moutons

(236), cependant, elle a été récupérée d'autres hôtes : chèvres, bovins, chevaux. Cette tique a souvent un comportement monotropique, avec les stades immatures se nourrissant sur une seule espèce hôte comme les adultes. Cependant, les stades immatures peuvent aussi se nourrir sur des rongeurs et des lapins. Elle se trouve dans les régions à climat méditerranéen dans le bassin méditerranéen et la mer noire et la mer caspienne. En Afrique elle est confinée aux zones côtières, de la Libye au Maroc (Canestrini et Fanzago, 1878) (226).

Dans plus de 90% des cas, c'est la "puce du chat" (*Ctenocephalides felis*) qui est retrouvée sur les chats ou les chiens domestiques en zone tempérée. Au Québec (237), *Ctenocephalides felis* peut parasiter près de 50 espèces différentes, s'attaquant à plusieurs animaux qui partagent le même milieu dont les chats, les chiens, les humains, les rats, les écureuils, les lapins, les moufettes, les rats-laveurs, les moutons et la volaille. En France, elle est aussi peu spécifique, infestant les carnivores quelque soit leur mode de vie, rural ou urbain (238). L'accroissement du nombre d'animaux de compagnie en milieu urbain a favorisé la réapparition des puces et des problèmes liés à leur présence. La puce s'est adaptée à l'environnement extérieur comme aux maisons. La température accélère ou freine le développement, un minimum de 22°C semble requis, au contraire une chaleur supérieure à 30°C diminue la longévité des adultes. En hiver, la température extérieure, proche de 0°C provoque la mort des larves et des pupes. Dans les maisons, si la température est de 19°C, seul les adultes pré-émergés demeurent, dans l'attente de conditions plus favorables et d'un stimulus d'émergence. Ces éléments expliquent la présence de puces toute l'année. L'émergence des puces à partir des cocons est soumise à divers stimulus. Le passage d'une ombre, des pas sur un sol, des vibrations peuvent induire la sortie des cocons. Les performances de saut de la puce sont remarquables et lui permettent d'atteindre facilement ses hôtes. La puce du chien (*Ctenocephalides canis*) ou du chat (*Ctenocephalides felis*) sont très présentes. Si la puce du chien peut parfois infester le chat, la plus fréquente est la puce du chat qui infestera le chien ... et parfois s'attaquera à l'homme! Seul 5% des puces se retrouveront sur l'animal alors que 95% seront dans l'environnement. La contamination d'un animal sera donc souvent due au milieu extérieur, par contre, il sera régulièrement recontaminé par son environnement familial. Un animal en contact avec l'extérieur ou avec d'autres animaux est fatalement exposé à une contamination (237), (239).

Melophagus ovinus, le pou du mouton, mélophage du mouton, ou faux poux du mouton est un parasite hématophage des ovins, occasionnellement des chèvres et des bovins. Originaire d'Europe incluant l'Islande et les îles Féroé, très fréquent en Belgique, il est devenu cosmopolite avec l'importation du mouton dans la plupart des régions tempérées du monde comme le nord-ouest d'Afrique, Mangolie, le nord d'Inde, aussi bien qu'au Kenya, Sud d'Afrique, Japan, Australie, Nouvelle Zélande, Nord d'Amérique, et pleines de régions au Sud d'Amérique incluant Tristan da Cunha et les îles Malouines. La population du pou augmente rapidement à la fin d'hiver et au début du printemps jusqu'à un maximum en avril et début mai. Un déclin commence en mai et en Juin, la population diminue considérablement (240).

1.7 ETUDE DE LA VECTORISATION

La transmission vectorielle peut être assurée par la salive, les déjections, ou la régurgitation. L'hôte infecté devient alors infectant pour un nouveau vecteur sain, qui pourra se contaminer à son contact puis recommencer un cycle de transmission. Différentes possibilités de développement d'agents infectieux existent dans l'organisme des arthropodes (198), elles peuvent être envisagées en fonction du mode de transmission considéré :

La transmission biologique

La transmission biologique semble être la seule rencontrée chez les tiques. Dans ce cas, le pathogène doit réaliser un cycle de transformation dans l'organisme de son vecteur avant de pouvoir être transmis lors d'un prochain repas infectant. Le délai entre la contamination du vecteur et le moment où il est capable de transmettre le pathogène est appelé incubation extrinsèque. Ce mode de transmission nécessite bien sûr la survie du vecteur pendant la durée de l'incubation extrinsèque et jusqu'à ce qu'il transmette l'agent infectieux (198).

La transmission mécanique

La transmission mécanique est essentiellement rencontrée chez les Tabanidés. Elle ne nécessite aucune transformation de l'agent pathogène dans le vecteur, mais le délai entre les deux repas doit être suffisamment court pour que le pathogène reste viable. Le vecteur joue alors simplement le rôle de "seringue" (198).

La transmission vectorielle d'un agent pathogène à un hôte vertébré réceptif nécessite qu'un ensemble de conditions soit réuni. La présence d'un vertébré et d'un vecteur sont des conditions nécessaires, mais pas suffisantes ! Il faut aussi que l'agent pathogène puisse être transmis efficacement, ce qui suppose un vecteur compétent, ayant une capacité vectorielle et une densité de population suffisante (199), (200).

La capacité vectorielle dépend elle d'un ensemble de paramètres intervenant dans la transmission d'un pathogène dans une zone donnée (abondance, longévité, préférence trophique du vecteur...). Elle dépend de la compétence des vecteurs (capacité du vecteur à s'infecter, à assurer le développement de l'agent pathogène et à le transmettre), de la taille de la population, de la fréquence des repas sanguins permettant aux vecteurs de transmettre cet agent (198).

Toutefois le recours obligé de l'agent pathogène à un arthropode, le rend totalement dépendant de son vecteur qui est très sensible aux changements environnementaux. Tout changement possède donc un impact important sur la dynamique de transmission de l'agent, qu'il s'agisse du climat, de la végétation, de la température, de l'hygrométrie, de la biodiversité, de la diversité des hôtes vertébrés, de la saison ...Sans parler des changements des activités humaines : économie, alimentation, migrations, voyages, loisirs... (198).

Selon les postulats de Koch (201), plusieurs conditions doivent être remplies pour établir une relation entre un arthropode et la transmission spécifique d'un agent pathogène à savoir :

- l'arthropode et l'hôte doivent être associés dans les conditions naturelles,
- l'arthropode doit contenir l'agent pathogène,
- il existe des rapports spécifiques entre l'arthropode et l'infection de l'hôte,
- la transmission de l'agent infectieux doit avoir été reproduite dans des conditions expérimentales contrôlées,
- il existe un gradient biologique selon lequel l'augmentation du nombre de vecteurs correspond à une augmentation du nombre de cas chez l'hôte spécifique et vice-versa.

Les connaissances sur la transmission des *Bartonella* par des vecteurs sont encore parcellaires. On suppose actuellement que toutes les *Bartonella* sont majoritairement

transmises par des vecteurs (31). Le rôle d'arthropodes hématophages dans la transmission supposée de *Bartonella* à l'homme est peu documenté. En ce qui concerne la transmission entre animaux, elle est essentiellement due à des tiques ou des puces mais il existe d'autres voies de transmission (voie transplacentaire chez les Rongeurs) (7).

1.7.1 METHODE D'ETUDE DE LA VECTORISATION :

Pour démontrer qu'un arthropode peut être un vecteur potentiel d'une maladie, trois méthodes d'études différentes et complémentaires sont couramment utilisées.

1.7.1.1 MISE EN EVIDENCE DE L'AGENT PATHOGENE :

La présence de différentes espèces de *Bartonella* chez des arthropodes n'est plus une supposition. En effet, d'après Piémont et Bermond (31), à certains arthropodes donnés correspondrait une espèce de *Bartonella*.

Une autre étude dirigée par La Scola (202) révèle la présence de *B. quintana* chez des poux (révélée par culture à partir d'un extrait de poux). Cette culture nécessite une décontamination superficielle qui ne tue pas les bactéries contenues dans les poux. La présence de *B. quintana* vivantes dans les poux est un argument supplémentaire en faveur du rôle vectoriel de ces arthropodes dans la transmission de la fièvre des tranchées.

Des travaux plus récents, menés par l'équipe de Chang (5), révèlent la présence de différentes espèces de *Bartonella* pouvant être pathogènes pour l'homme comme *B. henselae*, *B. quintana*, *B. washoensis* et *B. vinsonii subsp. berkhoffii*. La prévalence des *Bartonella* dans les tiques étudiées est élevée. En effet, sur 151 tiques prélevées en Californie, des *Ixodes pacificus* (toutes au stade adulte) se sont révélées positives lors de la réalisation de la PCR portant sur le gène de la citrate synthase. Ces résultats indiqueraient qu'*I. pacificus* pourrait jouer un rôle non négligeable dans la transmission des bactéries du genre *Bartonella* entre les animaux et les êtres humains. Ceci est d'autant plus probable que des patients atteints de la

maladie des griffes du chat n'avaient jamais été en contact avec un chat, mais affirmaient avoir retrouvés une tique sur leurs corps.

1.7.1.2 RECHERCHE DE GERMES DE CO-INFECTIONS OU DE TRACES SEROLOGIQUES :

➤ Recherche de traces sérologiques :

En 1998, Gad Baneth et al. (203) rapportent déjà les faits suivants : un chien exposé à des tiques présente des traces d'anticorps dirigés contre *B. vinsonii*, ce qui supposait déjà le rôle des tiques en tant que vecteurs de cette espèce.

➤ Recherche de germes de co-infections :

La recherche de *Bartonella* peut être envisagée chez des individus réservoirs ou des hôtes accidentels présentant des agents typiquement transmis par les tiques comme : *Babesia sp.*, *Ehrlichia sp.* et encore *Borrelia sp.* Ces co-infections ont été aussi mises en évidence chez des rongeurs (*Peromyscus leucopus*), où l'on retrouverait différentes espèces de *Bartonella* (*B. grahamii* et *B. vinsonii subsp.*) associées presque exclusivement à *Borrelia burgdorferi* et *Babesia microti* (204). Ce type de co-infection serait retrouvé fréquemment chez des souris infestées de manière naturelle.

Hinrichsen (205) montre que l'exposition des chiens aux tiques est un facteur de risque pour l'infection par *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*. La tique incriminée (*Amblyoma americanum*) est suspectée d'être le vecteur de cette bartonelle aux Etats-Unis et qui plus est, les chiens infectés le sont aussi le plus souvent par les agents cités ci-dessus. Cette co-infection a été prouvée dans d'autres cas et peut s'avérer létale dans les cas où la pression parasitaire est élevée (206).

En Nouvelle-Zélande, *Ehrlichia*, *Borrelia* et *Bartonella* ont été détectées simultanément chez des tiques dont il apparaît clair qu'elles constitueraient des vecteurs au moins chez les petits rongeurs (4). Des co-infections à *Bartonella spp.* et à *Borrelia burgdorferi* ont été également rapportées chez l'homme (207).

Une autre étude conduite aux Etats-Unis (163) a montré l'existence d'une co-infection chez des bovins de Caroline du Nord. *Bartonella weissii*, maintenant nommée *B.bovis*, a été identifiée chez des bovins qui présentent simultanément des anticorps dirigés contre une alpha-protéobactérie, à savoir *Nanobactérium spp.* Toutefois, les auteurs n'écartent pas la possibilité qu'il pourrait s'agir d'une réaction croisée car il semblerait que les bactéries du genre *Nanobacterium spp* partageraient des similitudes au niveau des antigènes de surface avec *Bartonella spp.*

1.7.1.3 MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE :

La Maladie des Griffes du Chat (M.G.C.) et la transmission expérimentale de *B. henselae*, agent principal de la M.G.C, ont fait l'objet de nombreuses publications. Plusieurs études portent sur l'infection expérimentale par voie veineuse ou intradermique (208).

En 1996, l'équipe de Chomel (181) démontre que la puce du chat est le vecteur de *Bartonella henselae*. Il a aussi été démontré qu'il n'y avait pas de transmission directe de chat à chat sans l'intermédiaire de puces. Ils retrouvent de l'ADN de *B. henselae* dans 1/3 des puces prélevées sur des chats bactériémiques. Enfin, des chatons élevés dans des conditions contrôlées et mis en contact avec des puces infectées deviennent systématiquement bactériémiques à *B. henselae*.

Dans une étude réalisée à Sao Paulo (209), la relation entre chat bactériémiques et puces est aussi évoquée. Il évoque aussi la possibilité d'une transmission passive par *Ctenocephalides felis*. En effet, il a été constaté que parfois, les puces infestés par *B. henselae* excrétaient les bactéries dans leurs fèces. Celles-ci y restent viables et pourraient être inoculées de manière passive par une puce effectuant son repas (inoculation intradermique via le rostre).

1.8 PATHOGENIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE *BARTONELLA*

Quelques *Bartonella* sont considérées comme pathogènes pour l'homme. *B. bacilliformis* (maladie de carrion biphasique (fièvre d'orroya et verruga peruana) est endémique seulement

dans les Andes en Amérique du Sud. Les infections les plus répandues dans le monde sont dues à *B. henselae* (maladie des griffes du chat) et *B. quintana* (fièvre des cinq jours). *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii subsp. arupensis*, *B. vinsonii subsp. berkhoffii* et *B. washoensis* étaient décrites comme étant une cause d'endocardite et de neurorétinite. *B. clarridgeiae* semble, elle aussi, être un agent de la maladie des griffes du chat (19). Les manifestations chez l'homme dépendent du statut du système immunitaire (patients immunodéprimés ou immunocompétents). Les sidéens, les sans domiciles fixes, les alcooliques et les receveurs d'organe de transplantation se voient sensibles à une infection aux *Bartonelles* (*B. henselae* et *B. quintana*) (210); l'angiomatose bacillaire, la péliose hépatique bacillaire, la fièvre et les lésions ostéolytiques d'origine inconnues sont les manifestations les plus courantes de l'infection. Une espèce récemment décrite ; *B. rochalimae* provoque des symptômes similaires à *B. bacilliformis* mais elle est phylogénétiquement reliée à *B. clarridgeae*. Un autre agent pathogène récemment découvert est *B. tamiae*. Elle a été isolée en Thaïlande et provoque de la fièvre et de l'anémie (19).

B. henselae est l'espèce la plus fréquente suivie par *B. clarridgeiae* chez le chat. *B. koehlerae* a été rarement isolée de ce réservoir et *B. bovis* seulement de peu de chats. Naturellement, les chats infectés montrent habituellement des manifestations cliniques non spécifiques, même si *B. henselae* a été impliquée dans l'uvéïte, endocardite, maladies des reins, stomatites et lymphadénopathie. *B. clarridgeiae* chez les chats naturellement infectés présente des manifestations cliniques non spécifiques. *B. koehlerae* n'est associée à aucune manifestation clinique dans l'infection artificielle. Même après traitement aux antibiotiques, la bactériémie persiste (211).

L'infection canine avec l'espèce *Bartonella* est plus probable à produire des symptômes cliniques que l'infection féline. Les espèces détectées dans ce cas sont *B. vinsonii subsp. berkhoffii*, *B. henselae*, *B. rochalimae* donnant comme effets cliniques l'endocardite, bactériémie persistante et ostéomyélites similaires à celles de l'homme. Les propriétés clinicopathologiques indicatives de l'infection à *Bartonella* chez les chiens n'ont pas été bien caractérisées. Mais quand des pertes de poids, effusion cavitaire ou des lésions de peau sont détectées, un test pour *Bartonella* doit être prioritaire (210).

Beaucoup de travail reste à faire dans le domaine de caractérisations attentives des manifestations cliniques des infections à *Bartonella* chez les humains et les animaux pour l'évolution du diagnostic et le traitement, aussi bien que pour la compréhension des mécanismes de pathogénèse (210).

Le plus vicieux des espèces de *Bartonella* chez l'homme est *B. bacilliformis*. Les *Bartonella* pénètrent dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins où elles prolifèrent et, de là, se disséminent dans tout l'organisme pendant une durée constituant cliniquement la période d'invasion. À ce moment un grand nombre de bacilles peuvent être vus dans le cytoplasme des cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques. Ces germes sont également nombreux dans les cellules du système monocyto-macrophagique des ganglions lymphatiques, du foie, de la rate, de la moelle osseuse, des reins, des surrénales et du pancréas. À la fin de la période d'incubation, commence la phase primaire ou phase d'invasion érythrocytaire : le plus souvent, le nombre d'hématies parasitées est faible, ce qui se traduit cliniquement par une maladie subclinique ou discrète, sans anémie. Cependant, moins souvent, jusqu'à 100 % des globules rouges peuvent être parasités et, parallèlement, le cytoplasme des cellules endothéliales des capillaires est rempli de bacilles ; cela se traduit cliniquement par une maladie sévère avec ascension fébrile brutale, frissons, anémie hémolytique sévère (après quelques jours, la concentration d'hématies peut être réduite au dixième) et un fort taux de mortalité. À l'autopsie, s'observent des signes d'anémie hémolytique avec pâleur et ictère ; le foie, la rate et les ganglions lymphatiques sont hypertrophiés en raison de l'engorgement des cellules du système monocyto-macrophagique par des fragments d'hématies et des bacilles ; la moelle osseuse est généralement hyperplasique. Lors de la convalescence, les bacilles situés dans les hématies deviennent coccoïdes, puis disparaissent du sang. La phase secondaire de l'infection, ou phase tissulaire, se produit lorsque les bactéries qui avaient envahi les cellules endothéliales capillaires induisent une prolifération de ces cellules, ce qui se traduit cliniquement par des verrugas ou des nodules ressemblant à des hémangiomes de la peau et des muqueuses (16), (206), (212).

De façon générale, le point commun entre les *Bartonella* est leur hémotropisme chez les mammifères réservoirs. Il serait déterminé par leur besoin en fer. Elles sont dotées d'un pouvoir d'invasion des cellules endothéliales (213), (214) et semblent être capables de coloniser d'autres types cellulaires : certaines cellules épithéliales pour *B. bacilliformis*, des

cellules cardiaques pour *B. quintana* (7). Les bactéries les mieux documentées sont : *B. tribocorum*, *B. henselae*, *B. bacilliformis* et *B. quintana*.

➤ Lésions observées et vasoprolifération

Les *Bartonella* (*B. bacilliformis*, *B. quitana* et *B. henselae*) sont les seules bactéries connues pour leur capacité à provoquer des lésions de vasoprolifération (213) grâce à leur pouvoir d'invasion des cellules endothéliales, et causer à la fois leur prolifération et leur migration (132), (214). Il s'agit d'un procédé d'angiogénèse pathologique résultant de la prolifération et la migration des cellules endothéliales suivies par leur organisation en de nouveaux capillaires (214). Ces lésions de vaso-prolifération sont constituées de cellules endothéliales, des bactéries et d'infiltrats mixtes de macrophages, de monocytes et de polynucléaires neutrophiles (PNN). Les *Bartonella* se regroupent en agrégats autour et dans les cellules endothéliales, ceci indiquant que l'endothélium vasculaire représente un tissu cible pour la colonisation intra et extracellulaire, in vitro. Le traitement antibiotique provoque l'amendement de l'infection et induit une régression complète des lésions vasculaires. Ceci implique donc que la présence des bactéries est indispensable au développement et au maintien de ces lésions. Ces découvertes suggèrent que les *Bartonella* envahissent et colonisent l'endothélium vasculaire et produisent un facteur mitogène qui a une action locale et temporaire (213).

➤ Inflammation

L'infiltration mixte de macrophages, de monocytes et de PNN retrouvée dans les lésions vasoprolifératives indique une inflammation chronique. Généralement, une réaction inflammatoire aiguë induit une cascade de médiateurs qui active l'endothélium, provoquant ainsi le relargage de molécules chimiotactiques pro-inflammatoires et l'activation d'interactions récepteurs-ligands entre l'endothélium activé et les PNN circulants (213).

Il est plausible que l'infection prolongée de FLS (Fibroblast-Like Synoviocyte) avec *B. henselae* peut contribuer à l'inflammation chronique jointe de l'arthrite chez les humains via l'activation de TLR (Toll-Like Receptor) et production de cytokine subséquente à la proinflammation (213).

➤ Interactions bactérie/cellule hôte

L'infection par *Bartonella* se caractérise, chez l'hôte principal par une bactériémie prolongée avec de possibles phases de récurrence. Cette bactériémie prolongée est assurée par l'existence d'une niche primaire encore inconnue et par le passage des bactéries dans les hématies, où elles se multiplient (215).

Invasion

La bactérie est rapidement éliminée de la circulation sanguine, qui reste stérile pendant au moins trois jours. Au quatrième ou cinquième jour, la bactérie réapparaît dans le torrent sanguin. La première niche qui permet sa réplication dans les trois premiers jours de l'infection (alors que le sang est stérile) reste à l'heure actuelle inconnue. Cependant, des preuves suggèrent qu'il s'agit des cellules endothéliales. Pour passer de leur niche primaire à la circulation sanguine, la bactérie adhère aux érythrocytes matures et les envahit très rapidement. Elle rentrerait par l'intermédiaire d'un « invasome ». Ce procédé d'invasion lente est caractérisé par la formation d'un agrégat bactérien à la surface de la cellule cible qui est internalisé par un mécanisme actine-dépendant (213). Le déterminisme détaillé de l'entrée par phagocytose ou par l'intermédiaire de l'invasome est inconnu. Ensuite, une multiplication intracellulaire se produit dans un compartiment membranaire pendant plusieurs jours. Puis, la densité de la cellule bactérienne reste identique pendant toute la vie érythrocytaire, qui est cependant écourtée par la colonisation bactérienne. Ceci permet à la bactérie de pouvoir persister de la sorte dans la circulation sanguine pendant plusieurs semaines. L'arrêt de la réplication serait lié à un manque de facteur de croissance ou témoignerait de l'existence d'un mécanisme de régulation très fin dans le but de limiter la population intraérythrocytaire (7). De plus, des vagues d'érythrocytes, infectés à partir de la niche primaire à intervalles de cinq jours environ, prolongent la durée de la bactériémie intraérythrocytaire. Cette périodicité est permise par une infection cyclique de la niche primaire (cinq jours environ) libérant des bactéries capables de ré-infecter la niche primaire comme d'infecter des érythrocytes matures. Le résultat de cette bactériémie au long cours représente une adaptation unique favorisant le mode de transmission par les arthropodes hématophages (213). La colonisation des érythrocytes par *B. tribocorum* montre une évolution non hémolytique et persiste au sein des cellules infectées pour le reste de leur vie. Les anticorps n'ont certainement pas d'action sur les antigènes bactériens exposés à la surface des érythrocytes infectés. Ils interfèrent plutôt

dans l'infection des cellules cibles en capturant les bactéries extracellulaires lorsqu'elles quittent leur niche primaire (213).

Prolifération de l'endothélium

□ Inhibition de l'apoptose

L'apoptose est une réponse classique des cellules des mammifères lors de leur infection. Cependant, certains agents pathogènes parviennent à diminuer le phénomène de l'apoptose ou même à l'inhiber. Une activité anti-apoptose est attribuée à *B. quintana* et à *B. henselae* mais pas à *B. vinsonii* ni à *B. elizabethae* qui ne sont pas responsables de lésions vaso-prolifératives. Toutefois, l'activité anti-apoptose seule ne peut pas expliquer l'augmentation du nombre de cellules observée lors de la prolifération endothéliale induite par les *Bartonella* in vitro (213).

□ Bad A

Il est le médiateur de (i): l'adhérence aux cellules endothéliales, (ii): Protéines de liaison à la matrice extracellulaire comme : fibronectine, laminine et collagènes et, (iii): Une réponse pro-angiogénique des cellules hôtes, exemple : induction de la sécrétion du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) (216).

□ Rôle du T4SS

Ces transporteurs sont impliqués dans la translocation de molécules bactériennes effectrices pendant l'interaction avec l'hôte. Onze protéines permettent l'assemblage d'un pilus et d'un complexe poreux qui « enjambent » à la fois la membrane des bactéries Gram-, et la membrane de la cellule hôte, permettant ainsi la translocation du complexe nucléoprotéique du cytoplasme bactérien, directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (213). Il a été prouvé que des mutants de *B. tribocorum*, délétés pour les gènes codant pour ces transporteurs, sont incapables de causer une bactériémie intra-érythrocytaire chez le rat de laboratoire. Ils sont nécessaires dans la phase précoce de l'infection avant, le début de la bactériémie intra-érythrocytaire (213).

□ Les protéines effectrices de *Bartonella* (*Beps*)

Elles sont transloquées par le *VirB/D4* et conduisent à (I) : Internalisation des agrégats bactériens via la formation d'invasomes. (ii): Activation de la réponse pro-inflammatoire du

facteur nucléaire κ B-dépendant, résultant dans l'expression stimulée des molécules d'adhésion cellulaires et la sécrétion d'interleukine : IL-8. (iii): Inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales (216).

□ NF- κ B

Les macrophages infectés par *B. henselae* relarguent de hauts niveaux de TNF α (Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β et IL-6. La réponse inflammatoire aiguë de l'endothélium infecté par Bartonella, médiée par le facteur nucléaire κ B-dépendant (NF- κ B), apparaît comme le premier pas dans l'initiation de l'inflammation chronique (213).

➤ Facteurs du pouvoir pathogène

Déformine

B. bacilliformis interagit avec les érythrocytes humains par la formation de profonds trous et tranchées dans la membrane érythrocytaire qui sont de véritables portes d'entrée pour l'invasion bactérienne. Ce phénomène paraît être déclenché par un facteur bactérien nommé « déformine ». La déformine est en fait une molécule hydrophobe de 1,4 kDa ayant une forte affinité pour l'albumine (213).

Facteur angiogène

Des analyses biochimiques et immunologiques ont identifié *GroEL* comme un candidat pour son activité mitogène (213).

Flagelle

Le flagelle n'apparaît pas essentiel dans l'adhérence aux érythrocytes car il y a en réalité collision entre la bactérie et les globules rouges par l'intermédiaire de la motilité due au flagelle (7), (213).

LPS

Selon des études, le Lipopolysaccharide (LPS) de *B. henselae* présente une activité endotoxique 1 000 à 10 000 fois plus faible que celui des entérobactéries. Il faut signaler que certains éléments, dits inhabituels de *B. henselae*, sont communs à d'autres bactéries intracellulaires (*Chlamydia spp.*, *Legionella spp.*) responsables d'infections chroniques. Ceci expliquerait la faible activité endotoxique de leur LPS (213).

Pili

Ils joueraient un rôle important dans l'adhésion car ils semblent avoir des propriétés typiques : induire une motilité par saccades et promouvoir l'auto-agrégation. On pense qu'ils ont une influence sur la phagocytose bactérienne et sur le rôle de l'invasome (213).

Autres

De nombreuses protéines de la membrane externe ou *Omps* (outer membrane proteins) de *B. henselae* sont susceptibles de se lier aux cellules endothéliales, particulièrement une protéine de 43 kDa (*Omp43*) (213). Elle induit la régulation à la hausse de la molécule 1- d'adhésion des cellules vasculaires ou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. *B. henselae* envahit les cellules érythrocytaires, cellules épithéliales et endothéliales humaines (217).

Caractérisation fonctionnelle des protéines extramembranaires variablement exprimées ou *Vomps* (Variably expressed outer membrane proteins) de *B. quintana* peut être exprimée par le modèle de rechute après l'infection, qui suggère une phase de variation de la surface des protéines comme stratégie de virulence. Les *Vomps* sont nouvelles parmi les adhésines TAA (C-terminal, N-terminal, domaine interne passager), parcequ'il y'a 4 gènes *Vomps* paralogues, chacun avec une région variable majeure unique (MV) localisée dans la partie adhésive N-terminale. *B. quintana* est la seule qui a l'abilité d'adhérer aux types cellulaires hétérogènes ex : épithélium intestinal du corps du pou, membrane RBC (Red Blood Cell), matrice extra cellulaire (MEC) des cellules endothéliales et aux autres *B. quintana* (autoaggrégation). Des résultats montrent que chaque individu de *Vomp(A-D)* confère un phénotype distinct qui diffère de l'autre *Vomp* dans l'expression de surface, autoaggrégation et l'adhésion aux composants de cellules hôtes. Ce qui suggère encore que l'unique région MV de chaque *Vomp* contribue à ces propriétés spécifiques de *Vomps* et permet aux *B. quintana* de viser différents types de cellules et tissus hôtes dans les vecteurs et hôtes (218).

Les facteurs bactériens potentiels de pathogénicité (exemple : hémagglutinines filamenteuses, protéines extra-membranaires) sont peu caractérisées et méritent plus d'analyses détaillées. Cependant, l'absence de modèles d'infection des petits animaux par *Bartonella* limite les analyses de pathogénicité de *Bartonella*, les stratégies de transmission des pathogènes (ex : via puces, tiques) et la réponse hôte (219).

Concernant la réponse immunitaire dans les souris infectées par *B. elizabethae* et considérant l'infection persistante qui est observée communément chez les animaux et humains, l'interleukine IL10 a été supposée être l'une des cytokines clés pour la pathogénèse de l'infection à *Bartonella*, parce que sa concentration est élevée chez les animaux infectés. Cependant chez l'homme, la réponse immunitaire de l'hôte induite par l'infection à *Bartonella* ne sont pas totalement comprises. Quel est le rôle de la réponse immunitaire dans le contrôle de la bactériémie de *Bartonella*. Les résultats d'une recherche indiquaient que IL-10 et TGFB (transforming growth factor beta) ne sont pas absolument nécessaires pour l'établissement d'une bactériémie. La production de IL-4 pouvaient contribuer à des taux plus élevés de bactériémie in vitro, mais qu'il y'avait par contre une augmentation des Th1 (Thymus cells helper 1), de IL-12, interféron-gamma (IFN-g) et tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (220).

Chez les chats un changement hémathologiques dans les bartonelloses félines au Brésil a été induit par l'infections naturelle de *B. henselae*: Neutrophiles et hyperprotéinémie ont été détectées chez les chats domestiques positifs à l'infection de *Bartonella hensellae* et leur valeur été supérieure à celle des animaux négatifs. Monocytes, lymphopénia et thrombocytopenie étaient positifs chez les chats infectés. Anémie et éosinophiles étaient négatifs chez les animaux positifs (221).

Les chiens infectés expérimentalement développent de forts taux d'anticorps, bien que *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* ne puisse être détectée par culture dans le sang de ces animaux. De plus, l'homéostasie lymphocytaire est altérée, puisque l'analyse par cytométrie en flux des populations lymphocytaires montre une élévation cyclique du rapport CD4/CD8 (Cluster of Differentiation 4/8) des lymphocytes T, ce qui est corrélé à une lymphopénie cyclique des CD8+ chez tous les chiens infectés (222).

1.9 TRAITEMENT

Il est difficile de proposer un traitement pour des bactéries occasionnant des manifestations cliniques aussi variées, occupant à la fois les niches extra- et intracellulaire. De plus, l'évolution de la maladie varie en fonction de la bactérie et du terrain immunitaire de l'hôte. Elle peut être aiguë, récurrente ou même chronique. A moins d'être instauré très précocement,

le traitement antibiotique des bartonelloses se montre peu efficace. Pour l'homme, erythromycine, rifampicine, azithromycine, clarithromycine ou doxycycline sont les antibiotiques envisageables et doivent être administrés pendant au moins plusieurs semaines (132), (223), (224). Le traitement des bartonelloses félines est le seul pour lequel des données sont disponibles. L'utilisation de cyclines, d'érythromycine ou d'enrofloxacin aboutit à des résultats inconstants (225). Soit le traitement n'a aucun effet sur la bactériémie, soit il induit une diminution de l'intensité de la bactériémie mais ne modifie ni sa durée, ni les éventuelles récurrences constatées par l'expérience, ou lors d'infection naturelle (215). Chez le chien, aucune étude n'a prouvé l'efficacité du traitement antibiotique. L'azithromycine, du fait de sa pénétration intracellulaire, ainsi que la doxycycline et l'enrofloxacin apparaissent être des antibiotiques de choix (215), (225).

Comme les vecteurs ne sont pas identifiés avec certitude, les moyens de lutte sont illusoire. Le contrôle des réservoirs pourrait s'appuyer sur l'utilisation de vaccins. Il n'existe pour l'heure aucune prophylaxie vaccinale ; la diversité des espèces et des types de *Bartonella* rendent pour le moment cette approche non envisageable (132), (224). Les animaux constituent le principal réservoir de *Bartonella* et sont donc le point central de l'épidémiologie de cette maladie.

2 MATRIELS ET METHODES

Les critères d'échantillonnage, le matériel et les étapes de l'investigation moléculaire sont détaillés ci-dessous.

2.1 CARACTERISATION DES REGIONS DE RECOLTE

Les arthropodes étaient récoltés aléatoirement dans différentes zones urbaines, suburbaines et rurales, sur des bovins et ovins en pâturage, en enclos ou dans des étables près des villes, sur des canins et félins domestiques ou errants de la fourrière d'Hygiène urbaine d'Alger « Hurbal » (Annexe 1 et 2).

Dans la majorité des lieux de récolte, il y avait de nombreux trous de souris. Le sol de (227) pâturage était couvert par les herbes d'un feuillage dense et de végétation buissonnante. Ces zones ont très peu d'arbres et sont peu ombragées. Les enclos et les étables étaient entretenus et les animaux étaient en contact avec l'être humain et peu de végétation. Les animaux errants venaient majoritairement des villes.

Le choix des sites a été fait sur des critères choisis. Les animaux devaient provenir des villes, non loin des habitants où c'est plus ou moins soigné et d'autres devaient être dans des zones loin de la ville, en pleine nature, sans apport de soins.

Le climat est méditerranéen et se caractérise par des étés chauds et secs et des hivers doux et humides. Les sites ont été visités aléatoirement d'Avril à Juin 2012 pour notre collecte.

2.2 PRELEVEMENT DES ARTHROPODES

Les prélèvements de nos arthropodes ont été réalisés à l'aide d'une pince ou à la main. Afin de préserver l'ADN et de limiter les contaminations des micro-organismes présents à la surface des arthropodes et le milieu environnant, la préservation de ces arthropodes était dans de l'éthanol 70° avant l'extraction d'ADN et les investigations de la biologie moléculaire.

2.3 CARACTERISATION DE L'ECHANTILLON

Notre échantillon dans son ensemble couvre 872 arthropodes. Beaucoup plus de tiques que de puces ou de poux ont été recueillies. Seul les arthropodes adultes ont été récolté, vu leur nombre élevé.

2.4 LA RECHERCHE AUX LABORATOIRES

2.4.1 CRITERES D'IDENTIFICATION DES ARTHROPODES

Les arthropodes dont nous disposons au laboratoire proviennent d'origines différentes et sont des adultes de sexes différents. La détermination de chaque genre et de chaque espèce a été réalisée sur critères morphologiques à la loupe binoculaire « Bentley Vision » d'après, respectivement : l'ouvrage de Walker et al. (226), l'identification de Beaucournu (227) et celle de François-Xavier Pajot (228).

2.4.1.1 TRAITEMENTS DES ARTHROPODES ET EXTRACTION D'ADN

Les arthropodes étaient triés selon le sexe. Pour cette étude, nous avons utilisé 10 tiques adultes (6 femelles et 4 males), 9 puces femelles et 1 pou femelle de notre récolte pour les deux types d'extractions d'ADN prévus, codés de (1 à 20) pour les moitiés traitées par kit « Macherey Nagel » et précédées par la lettre « T » c'est-à-dire (T1 à T20) pour déterminer les moitiés traitées par Thermolysat (Annexe 3).

Par défaut de centrifugeuse type réfrigéré, requise pour l'extraction d'ADN, quelques échantillons d'ADN déjà extraits par le kit nous ont été donnés par le laboratoire « Ecologie des systèmes vectoriels/Institut Pasteur d'Alger » pour l'amplification PCR. Les 18 arthropodes correspondants sont des adultes d'un nombre élevé de puces (N=15) par rapport aux tiques (N=1) et aux poux (N=2). Ces échantillons sont à leur tour numérotés de (21 à 38) (Annexe 3). Les extraits d'ADN ont été maintenus au réfrigérateur (T°=-20°C) jusqu'à l'amplification.

Deux sélections donc ont dû être prises dans la recherche, selon les moyens disposés et le but recherché et visé. Pour la comparaison des deux extractions on a pris les échantillons (1 à 20 et T1 à T20, sauf T7, T9, T10, T12, T15, T17 où le matériel biologique manquait). A l'amplification, tous les échantillons positifs aux deux extractions ont été pris, en plus des extraits donnés (21 à 38).

Avant l'extraction Pour notre étude, les arthropodes pris ont été traités individuellement. Ils ont été lavés dans de l'eau distillée puis divisés longitudinalement avec un scalpel en 2 moitiés égales. Avant toute extraction, tout le matériel de manipulation a été stérilisé sous U.V (rayons Ultra Violet) pour éviter toute contamination (Annexe 4).

Les difficultés d'extraction sont principalement liées à la présence d'une cuticule rigide très résistante qui rend l'accès difficile aux tissus internes ou à la petite taille des arthropodes difficiles à broyer. Ces deux méthodes sont citées ci dessous.

2.4.1.2 EXTRACTION D'ADN PAR LE KIT MACHEREY NAGEL

Cette methode consiste en une lyse, une purification puis une élution d'ADN à l'aide du kit Macherey Nagel, Protocol « genomic DNA from tissue » selon les recommandations du fabricant (Annexe 5).

2.4.1.3 EXTRACTION D'ADN PAR LA METHODE DU THERMOLYSAT

La solution de PBS MgCl₂ a était préparée dans le laboratoire avant l'extraction (Annexe 6).

2.4.2 VERIFICATION DES EXTRACTIONS

Après la réalisation de l'extraction et la purification des acides nucléiques, on entame le contrôle de l'isolement d'ADN par deux méthodes basés sur la fluorescence et la spectrophotométrie. L'une qualitative (électrophorèse sur gel d'agarose) et l'autre quantitative

(spectrophotométrie NanoDrop ® ND-2000). Ceci permet de ne prendre que les échantillons répondant positivement à cette étape. La concentration d'ADN minimale pour une PCR standard est de 50 ng/µl. La révélation est utilisée pour gagner du temps et du matériel.

2.4.2.1 ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille et de leur charge électrique sous l'influence d'un champ électrique. Les gels d'agarose 0.8% sont obtenus en mettant 0.8 mg de la poudre d'agarose déshydraté en suspension dans 100 ml du tampon aqueux Tris Borate EDTA (TBE)1 fois concentré (Annexe 7 et 8).

2.4.2.2 QUANTIFICATION DE L'ADN PAR SPECTROPHOTOMETRIE-NanoDrop-2000

Utilisation : Quantification des acides nucléiques (ADN, ARN) et des protéines

Principe : spectrophotométrie à UV. Le Thermo Scientific ND-2000 est le seul spectrophotomètre micro-volume qui permet de travailler avec des volumes aussi petits que 0.5 µL et 1 µL. Les données sont présentées sous forme de spectre, enregistrées sur un ordinateur.

Applications : Mesure des concentrations des ARN et ADN (Absorbance à 260 nm: A260) et de la pureté des échantillons (A260/A280 ratio). Large gamme de concentrations (20 ng/µL – 15000 ng/µL dsDNA) sans besoin de dilution. Une mesure rapide, moins de 5 seconde. Juste pipeter, mesurer et nettoyer avec du papier spécifique (Annexe 9).

2.4.3 AMPLIFICATION EN CHAINE PAR POLYMERISATION DE L'ADN ftsZ

Les extraits ont été pris dans cette étape pour détecter les bartonelles.

2.4.3.1 PREPARATION DU MIX

Elle est réalisée sous des conditions aseptiques, sous une hotte-biocap, pour éviter toute éventuelle contamination (Annexe 10).

12.5 µl du master mix (2.5 µl du tampon 10x, 2.5 µl de dnTP, 1 µl de Mgcl₂ et de 0.125 µl de la taq polymérase) sont mélangées à 13 µl d'eau distillée stérile et à 0.5 µl de chaque primer forward et reverse. Il y'a différentes amorces utilisées pour la détection et l'identification des espèces de *Bartonella* (Annexe 11).

Lors de notre étude, les amorces disponibles étaient celles spécifiques au gène *ftsZ*, qui est conservé chez la majorité des *Bartonella*.

Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés, plus un équivalent à deux échantillons en plus de deux témoins positifs et témoin négatif pour pallier au problème de mauvais pipetage. 20 µl du mélange est distribué dans chaque tube de barrette de 8, spécifique au thermocycleur Genius pour la PCR, avec 5 µl de l'échantillon d'ADN extrait, à tester, soit 27 tests+2 témoins=29 extraits traités.

5 µl d'eau distillée stérile sont utilisés pour le témoin négatif, 5 µl d'ADN de *Bartonella elisabethae* (Biomérieux) représentent le premier témoin positif (1T+) et 5 µl d'ADN de *Bartonella* sp. provenant de rate d'hérisson (Annexe2) représentant le deuxième témoin positif (2T+).

Après cela, l'amplification dans le thermocycleur est lancée.

2.4.3.2 MISE EN EVIDENCE DES AMPLIFIATS- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés en fonction de leur taille par une électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Le principe est le même que cité précédemment sauf que cette fois-ci pour des fragments d'ADN, les gels sont obtenus en mettant 0.75 mg de la

MATERIELS ET METHODES

poudre d'agarose en suspension dans 50 ml du tampon aqueux TBE 1 fois concentré et que les derniers puits sont réservés aux témoins : positif, négatif et aux 4,5 µl du marqueur du poids moléculaire (Pro-méga, Biomerieux). Ce marqueur de taille est choisi pour donner des bandes de 100 à 1000 paires de bases. Celle ciblé de Bartonella comprend 333pb.

3 RESULTATS

3.1 NOMBRE DES ARTHROPODES RECOLTE

La période de collecte était d'Avril à Juin 2012 et sur sept sites différents. L'échantillon de 872 arthropodes comprend 849 tiques (303 femelles et 546 mâles), 21 puces (9 femelles et 12 mâles) et 2 poux (femelles). Les répartitions des arthropodes par région, mois, espèce hôte, et sexe sont représentées respectivement dans les figures : 3 à 6. Les arthropodes des extraits d'ADN donnés ne sont pas représentés par manque de données.

Figure 3: Répartition des arthropodes par région.

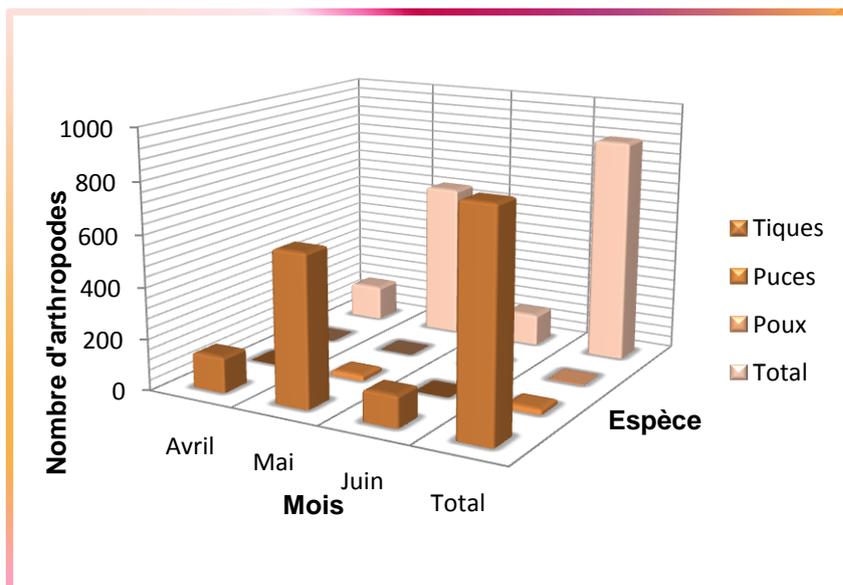
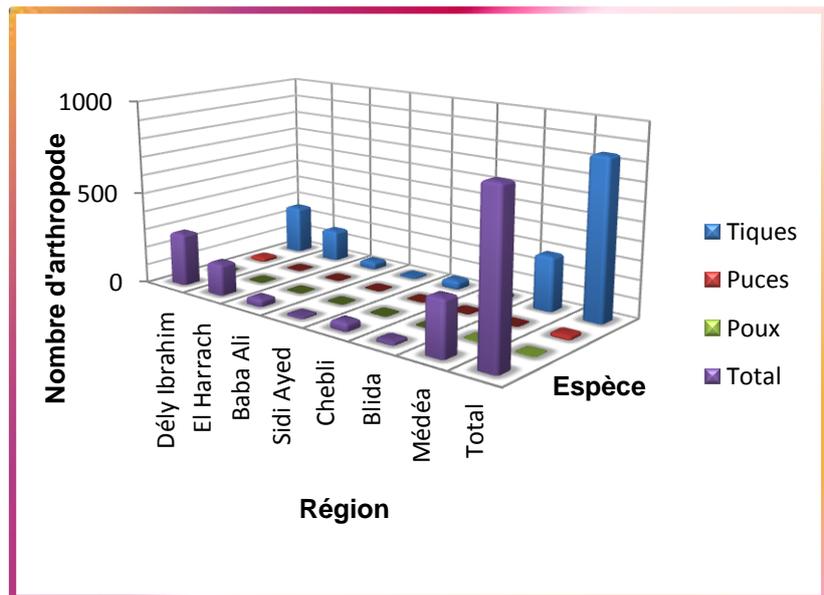


Figure 4: Répartition des arthropodes par mois.

Figure 5: Répartition des arthropodes par espèce hôte.

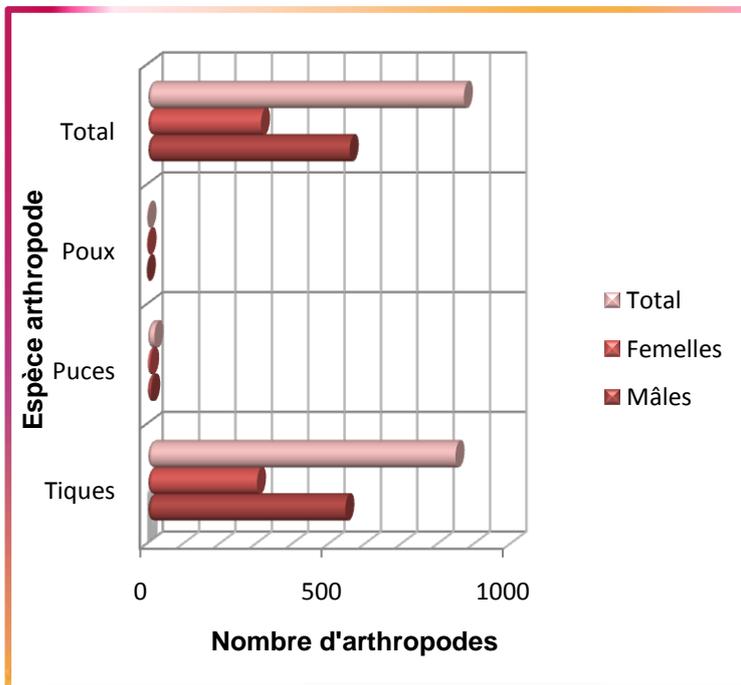
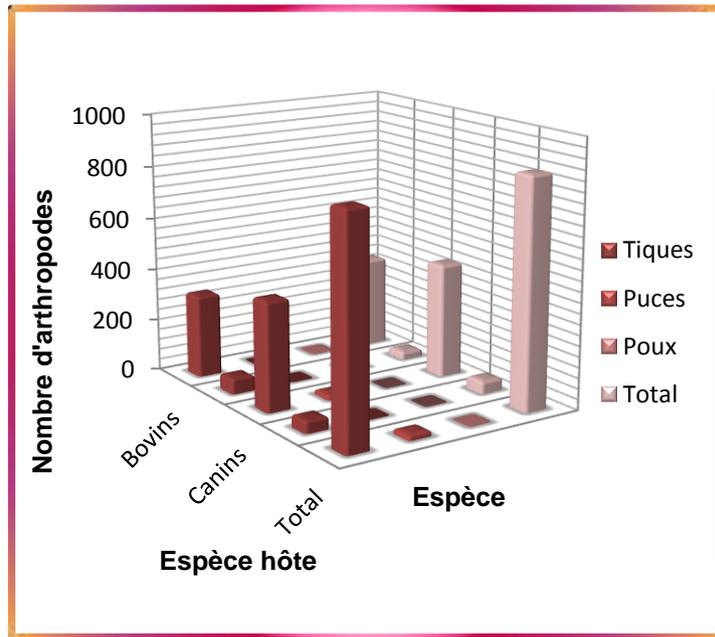


Figure6: Répartition des arthropodes par sexe.

3.2 IDENTIFICATION ET TAUX DES ESPECES ADULTES

La diagnose des 872 arthropodes issus d'hôtes différents a conduit à l'identification de différents genres et d'espèces. La majorité sont des adultes recueillis majoritairement sur des canins domestiques (de maison ou errants) et bovins de pâtures.

Deux genres de tiques ont été identifiés, 3 espèces chacun : *Rhipicephalus* dont : *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. bursa* et *Hyalomma* dont : *H. detritum detritum*, *H. anatolicum excavatum*, *H. lusitanicum*. Une seule espèce de puce : *Ctenocephalides felis* et une espèce de poux : *Melophagus ovinus* ont été aussi identifiées. L'ensemble des données est récapitulé et plus détaillé selon la fréquence et la répartition de l'espèce arthropode par région, mois et espèce hôte, dans les figures 7 à 10.

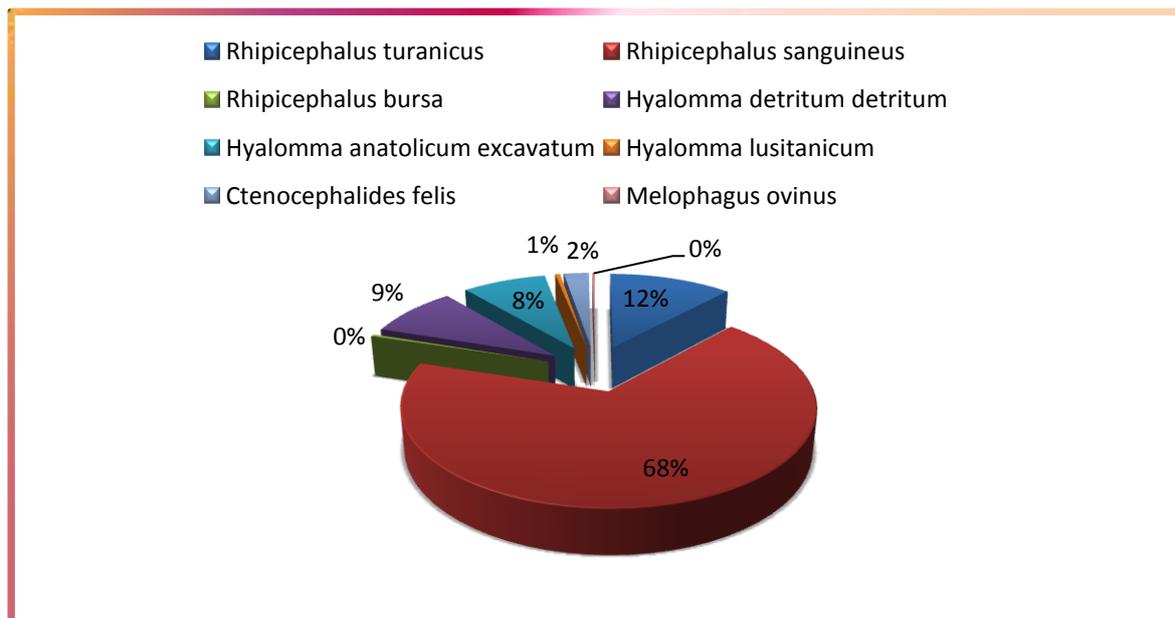


Figure 7: Répartition des espèces arthropodes récoltés au printemps 2012.

RESULTATS

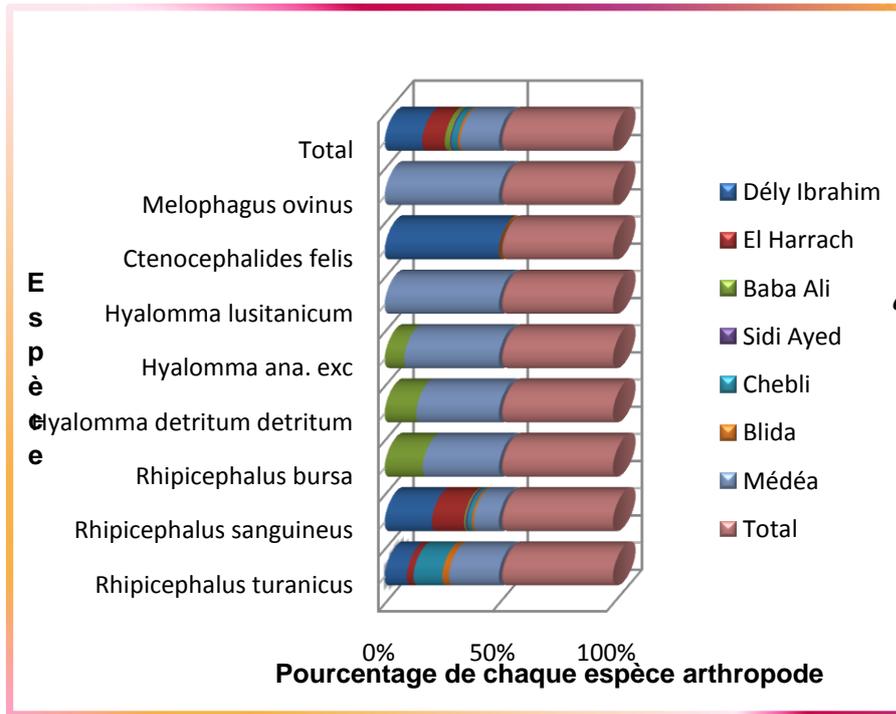


Figure 8: épartition des espèces arthropodes par région.

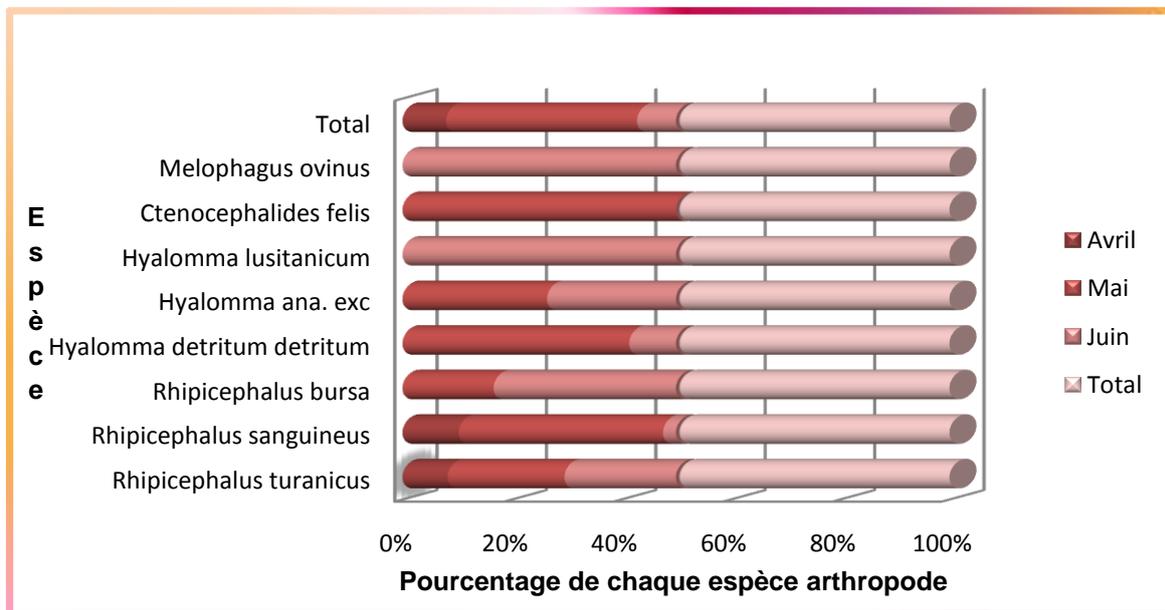
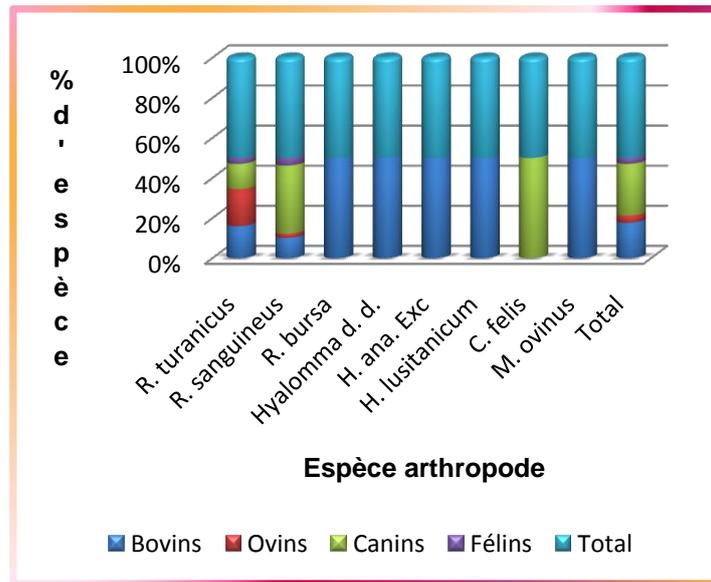


Figure 9: Répartition des espèces arthropodes par mois.

Figure 10: Répartition des espèces arthropodes par espèce hôte.



Les arthropodes des échantillons donnés comprennent un genre de tique dont une espèce : *Rhipicephalus sanguineus*, 3 genres de puces dont une espèce chacun : *Xenopsylla cheopis*, *Ctenocephalides felis* et *Achaeopsylla erinacei* et un genre de poux dont l'espèce : *Pediculus humanus capitis* (Annexe 2).

3.3 EXTRACTION DE L'ADN

3.3.1 ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Les migrations de tous les extraits d'ADN issus des deux types d'extractions, soit 100% chacune, ont donné une bande positive plus ou moins claire. Une bande correspondant à l'ADN extrait est présente pour chaque test. Quelques unes des électrophorèses effectuées sont représentées ci-dessus, dans les figures 11 et 12.

RESULTATS

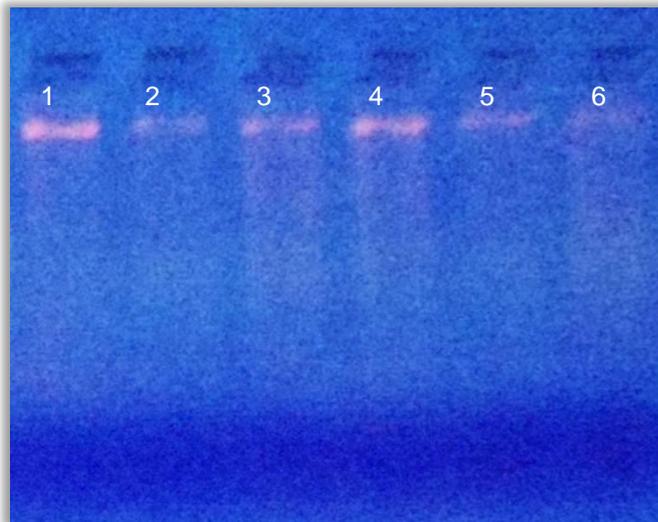


Figure 11: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des extraits d'ADN par le kit "MACHEREY NAGEL".

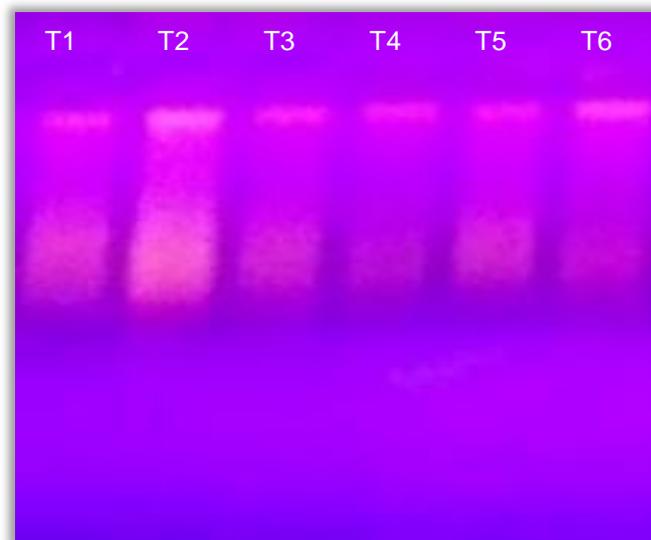


Figure 12: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des extraits d'ADN par thermolysat.

3.3.2 ESTIMATION DE LA DENSITE OPTIQUE PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Les résultats obtenus sont représentés en annexe 12.

La concentration d'ADN recherchée et adéquate à la simple PCR est trouvée chez 10% (2/20) extraits du kit-MACHEREY NAGEL et 50% (7/14) extraits de thermolysat. Se sont les extraits positifs par rapport à la présence d'ADN. (En vert).

La présence de protéine est de 50% (10/20) dans les extraits du Kit et de 57.14% (8/14) dans les extraits de thermolysat. (En bleu).

Le pourcentage des autres contaminations est de 100% pour les deux types d'extraction.(En rose)

3.4 AMPLIFICATION DU FRAGMENT D'ADN SPECIFIQUE AUX *BARTONELLA*

Après amplification des extraits positifs à la présence d'ADN (4, 7, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T20) et des extraits donnés (21 à 38), les migrations électrophorétiques ont été représentées ci-dessous dans les figures 13 et 14. Les gels montrent une apparition d'une bande d'ADN 333 pb, correspondant aux témoins positifs témoignant du bon déroulement de la PCR et de sa sensibilité. Selon le témoin négatif qui ne présente aucune bande, il n'y a pas eu de contamination. Aucune bande du fragment conservé d'ADN à 333 pb des bartonelles n'est apparue pour les échantillons du thermolysat, ni pour ceux du kit, ce qui traduit une absence réelle de *Bartonella* ou une apparition de faux négatifs (figure 13). Sauf exception pour l'échantillon n=4 dont la migration a engendré un autre profil indiquant une présence d'une bande d'un poids moléculaire proche de celui du fragment d'ADN de 333 pb du gène *ftsZ* des bartonelles recherché.

RESULTATS



Figure 13: Electrophorèse sur gel d'agarose de quelques amplifiats d'ADN extraits par le kit "MACHEREY NAGEL".

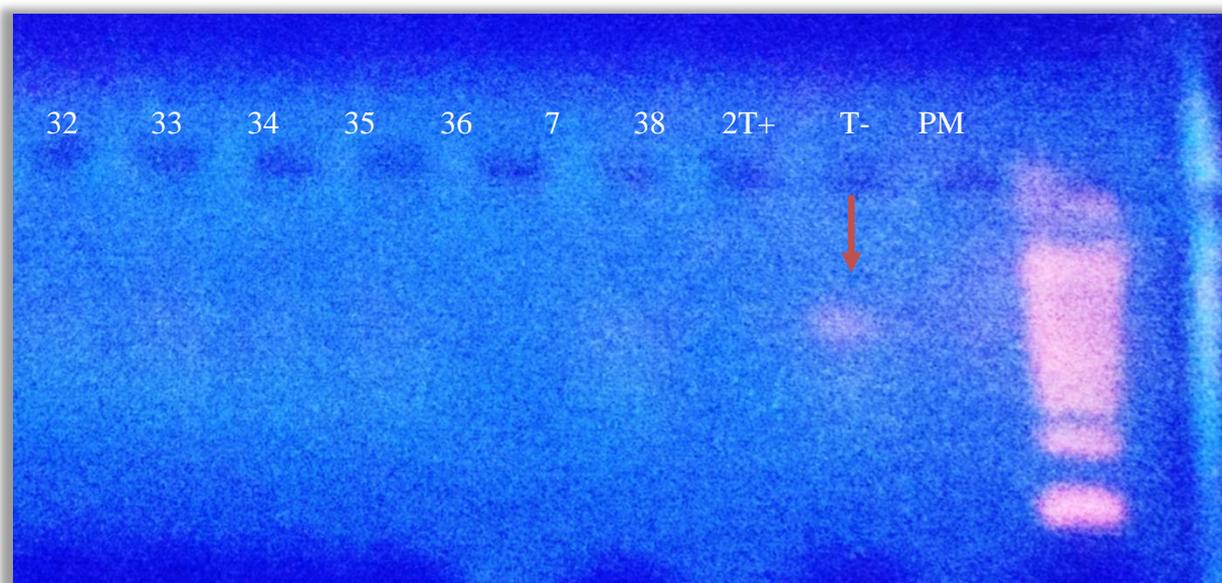
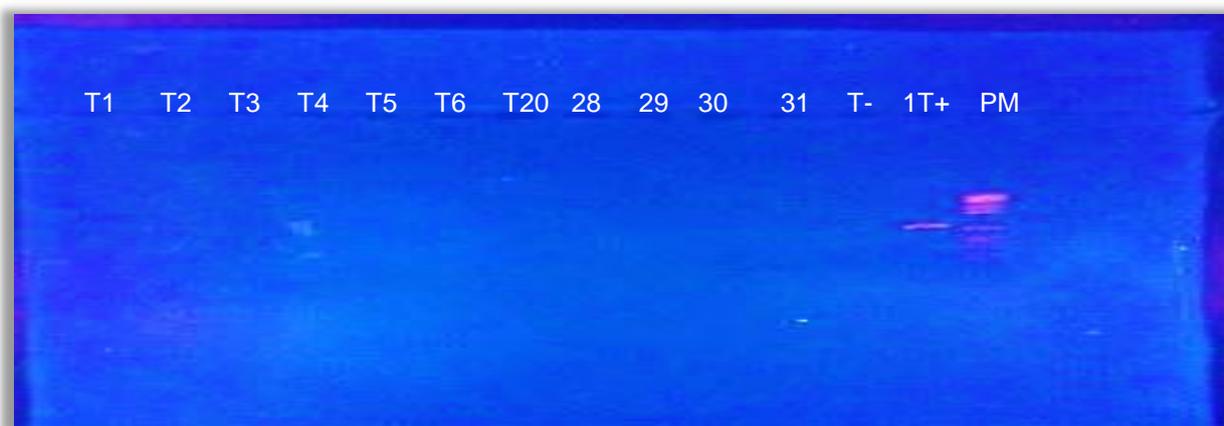


Figure 14:Electrophorèses sur gel d'agarose de quelques amplifiats d'ADN extraits par thermolysat et kit "MACHEREY NAGEL".

RESULTATS

En résumé, parmi les 27 extractions d'ADN positives, une extraction (3.70%) de tique provenant de bovin (n=4) parmi les 5 tiques *Rhipicephalus sanguineus* testées (2 provenant de bovins et 3 de chiens) s'est révélée positive.

4 DISCUSSION

4.1 DENSITE DES ARTHROPODE

Dans cette partie, on rapporte les résultats de notre récolte d'arthropodes au printemps 2012, avec le but essentiel de détecter et d'évaluer le pourcentage des bactérie du genre Bartonella dans ces arthropodes collectés de différents mammifères dans les différentes zones au nord d'Algérie. En Algérie et à notre connaissance il n'y'a pas eu d'études menées sur la densité des arthropodes et leur évolution au sein des mammifères. Dans notre étude, il y' a eu plus de difficulté à récolter les arthropodes chez les ruminants des élevages que chez les chiens domestiques ou errans, malgré une recherche intensive. Seulement trois jours de collecte d'arthropodes sur une dizaine de chiens ont suffi pour avoir un bon échantillon par rapport à des centaines de bovins. La majorité des ovins avait reçu un traitement antiparasitaire. Les résultats de notre récolte révèlent une présence fréquente de tiques (97.36%) par rapport aux autres types d'arthropodes (2.40% de puces et 0.23% de poux). Elles étaient présentes partout avec un pic en Mai. Principalement sur les bovins (37.57%) et les chiens domestiques et errants (49.23%). Les puces étaient trouvées en ville sur un seul chien errant fortement infesté et les poux ont été trouvés sur des bovins en zone rurale. Très peu d'ovins ont été visités. Parmi les 97.36% tiques, *Rhipicephalus sanguineus* (69.85%) a été l'espèce de tiques la plus répandue. En Italie (229), elle est confirmée comme étant la tique la plus représentée en Sardaigne, représentant plus de 70% de toutes les tiques examinées (230). Un total de 47,58% a été récolté de chiens et même sur des bovins (14.25%). *Rhipicephalus turanicus* ont été le plus souvent récoltés d'ovins (4.49%) mais aussi sur des chiens (3.06%) et des bovins (3.89%). Chez *Hyalomma detritum detritum* (229) don't le pic est en juillet, on a trouvé 8.95% de tiques chez le bovin ; l'hôte spécifique. *Hyalomma anatolicum excavatum* (229) est récoltée sur des bovins (8.24%). *Hyalomma lusitanicum* qui n'est pas distribuée abondamment au Nord d'Afrique, le pourcentage trouvé est de 0.47% sur des bovins. Finalement, 0.35% de *Rhipicephalus bursa* sont trouvés sur des bovins. En Sardaigne (229), le pourcentage était de 5.5% chez les bovins par rapport à 38.9% chez les ovins ; l'hôte préféré.

Ces résultats sont aussi en accord avec ce que d'autres études ont montré. En effet, la propagation des arthropodes dans une région est souvent une mosaïque (231) comme le montre le résultat de notre récolte. La dynamique au sein de la population d'arthropodes dépend de beaucoup de paramètres abiotiques et biotiques tels que la température, les précipitations, l'altitude, la végétation prédominante et la faune. En particulier, le (micro)

climat influence la présence des arthropodes. La densité d'une zone en arthropodes vecteurs infectés influence le risque de contracter une infection par *Bartonella* (232). Le pou est présent toute l'année. C'est un parasite permanent des mammifères, très spécifique d'hôte. Il ne quitte jamais son hôte et pond ses oeufs sur la peau ou dans les vêtements. Les sources du parasite sont les animaux déjà infestés, les litières ou le matériel. Les conditions favorisant l'infestation sont la promiscuité et le manque d'hygiène. Chez le bétail, l'infestation est maximale lorsque les animaux sont confinés en stabulation l'hiver dans des conditions d'hygiène précaires. Le pou résiste peu au jeûne et à la chaleur. Les puces ont également une répartition cosmopolite. Rares en hiver, elles sont très actives de mars à novembre. Ces parasites intermittents sont adaptés à une espèce hôte, mais ils ne sont pas spécifiques ou stricte. La transmission de pathogènes entre les espèces est donc permise, ce qui explique la transmission de la peste du rat à l'homme par la puce du rat *Xenopsylla cheopis* et les infestations de chèvres par *Ctenocephalides felis* qui normalement parasite les carnivores. Elles sont absentes des zones montagneuses au delà de 1500 à 1600 mètres. Les tiques sont présentes partout et actives au printemps et à l'automne. Des conditions météorologiques en début d'année influencent le développement de la population de tiques ; hivers rigoureux et sécheresses réduisent le nombre. La prolifération des tiques est cependant favorisée par des hivers doux et des étés humides (233). Ce sont des parasites intermittents strictement hématophages. La spécificité d'hôte est plus ou moins étroite en fonction de l'espèce et du stade évolutif. Les tiques parasitent les mammifères, les oiseaux et les reptiles (234).

Rhipicephalus sanguineus est connue comme étant la tique de chenil. Cette espèce est devenue la plus répandue à travers les tropics et les sub-tropics à cause de son alimentation spécialisée sur les chiens domestiques. Les chiens domestiques sont l'hôte pour lequel *R. sanguineus* s'est spécialisée. Elle peut être trouvée sur du bétail. Même si elle a été récupérée principalement de petits ruminants, elle a été trouvée dans de nombreuses autres espèces hôtes, qui pourrait agir comme vecteurs qui facilitent la propagation de cette espèce de tique parmi les troupeaux. Ceci est expliqué par la promiscuité avec les autres animaux. Il est maintenant bien connu chez *R. sanguineus* qui adopte une stratégie d'attaque et élargit sa sélectivité lorsque la température s'élève au delà de 30°C (198). Les chiens sont l'hôte pour tous les stades du développement. Le comportement de cette tique est domestique et généralement monotropique. Des hôtes autres que les chiens sont généralement infestés seulement pour maintenir la population de la tique. Au Sud d'Afrique, tous les stades sont trouvés sur les chiens d'Octobre à Mai. Même si cette espèce peut vivre dans des

environnements ouverts, elle s'est grandement adaptée pour vivre dans des chenils de chien et des habitations humaines. Ainsi c'est atypique pour les tiques *Rhipicephalus* qui sont généralement exophiliques. Les femelles grimpent les murs et mettent les œufs dans des fissures et crevasses de ces structures ou elles peuvent les mettre sous la literie des chiens ou à proximité des fissures et des crevasses. Les chiens attachés à un chenil peuvent devenir très infestés. Dans les habitats artificiellement chauffés, l'activité d'alimentation des tiques peut s'étendre jusqu'à l'hiver. A cause de son association avec les chiens domestiques, ces tiques apparaissent dans toutes les régions climatiques d'Afrique. Elles peuvent aussi survivre dans les régions climatiques tempérées fraîches, dans des chenils abritées et ainsi elle est étendue globalement. Cependant, elle a une population dense dans des climats chauds et humides contrairement aux climats désertiques. Comme exemple on a l'Afrique ; Madagascar et pleins d'autres pays où il y'a cohabitation entre chiens et humains (Latreille, 1806) (226).

Rhipicephalus turanicus est typique au bétail. Mouton et chiens sont les animaux domestiques à partir desquels *R. turanicus* a été le plus souvent récolté dans les régions sub-Sahariennes d'Afrique. Cette espèce de tique infecte souvent et fortement les moutons (226), (235). Elle a été aussi découverte sur des chevaux. Au Nord d'Afrique, elle est aussi trouvée au niveau des chameaux, buffles d'eau, des chèvres et des bovins. Les hôtes sauvages favoris sont en plus grande partie les carnivores et quelques oiseaux, avec quelques collections de zèbres et de phacochères. Les adultes sont plus nombreux pendant la fin des précipitations jusqu'au début de la saison sèche. *R. turanicus* est une tique des savannes, des steppes, du désert et des régions à climat méditerranéen. Elle apparaît dans les régions est du continent africain, au Soudan, en Ethiopie, Somalie au nord, jusqu'en Afrique du Sud au sud. Cependant plusieurs collectes ont été faites au nord de Namibi. Au Nord d'Afrique, elle apparaît principalement au Maroc, Algérie et Tunisie. Elle est trouvée aussi dans différents autres pays méditerranéens en Italie (229) où elle apparaît aussi le plus sur des moutons. Elle est trouvée aussi en Inde, au Pakistan et en Chine (Pomerantsev, 1936) (226).

Pour *Hyalomma detritum detritum*, les bovins sont les hôtes les plus communs pour cette espèce, mais les chevaux, moutons, chèvres et chameaux peuvent être aussi infectés. Les adultes apparaissent sur les bovins la fin du printemps avec un pic en juillet et disparaissent au début de Septembre. Cette tique est souvent domestique, l'infestation est souvent associée aux granges, écuries, hangars et enclos d'élevage. L'élevage devient infesté quand il est abrité

dans ces structures. Cette espèce de tique apparaît dans les régions avec climats méditerranéen du Nord d'Afrique du Maroc à la Tunisie, en passant par l'Algérie. Elle apparaît aussi dans les régions climatiques du désert et les steppes au nord du Soudan central. Ces zones peuvent avoir été envahies par *H. d. detritum* à partir des côtes de la mer rouge ou le long de la vallée de la rivière du Nil. Sa distribution continue vers l'Est dans beaucoup de zones larges à travers l'Asie central. Cette tique est la plus abondante des tiques Ixodidés infestant le bétail au Maroc et en Tunisie. Elle apparaît d'être absente de la Libye, mais des populations isolées ont été observées en Egypte (Schulze, 1919), (226).

Hyalomma anatolicum excavatum. Bovins, ovins, chèvres, chameaux, chevaux et ânes/baudets sont les hôtes de la tique adulte. C'est une tique ditropique. Cette tique se nourrit sur deux ou trois hôte dépendamment sur la disponibilité de l'hôte. Elle est robuste et est capable de se nourrir pendant la majeure partie de l'année, même dans des climats avec des hivers distincts. Au Nord d'Afrique elle est trouvée sur du bétail pendant toute l'année. Elle est adaptée au climat méditerranéen et les régions climatiques des steppes du monde en général et de l'Afrique du Nord spécifiquement. Elle est trouvée le plus souvent sur du bétail de la Mauritanie en Egypte, au Soudan, en Ethiopie et en Erythrée. Elle n'est pas couramment découverte au Sud du Sahara mais vers l'Est à travers l'Iran et Turkmenistan (Koch, 1844) (226).

Hyalomma lusitanicum est commune des régions européennes et du moyen-orient du bassin méditerranéen, et elle occupe certaines zones en Afrique du Nord. Les adultes sont trouvés sur des bovins et autres ruminants. En Afrique, cette tique est trouvée en Algérie et Maroc dans les climats des steppes et méditerranéen. Elle n'est pas distribuée largement ou à forte densité dans ces régions (Koch, 1844) (226).

Rhipicephalus bursa est l'une des espèces commune de l'élevage en Afrique du Nord. Dans le bassin méditerranéen, cette espèce est considérée comme un ectoparasite majeur de moutons (236), cependant, elle a été récupérée d'autres hôtes : chèvres, bovins, chevaux. Cette tique a souvent un comportement monotropique, avec les stades immatures se nourrissant sur une seule espèce hôte comme les adultes. Cependant, les stades immatures peuvent aussi se nourrir sur des rongeurs et des lapins. Elle se trouve dans les régions à climat méditerranéen

dans le bassin méditerranéen et la mer noire et la mer caspienne. En Afrique elle est confinée aux zones côtières, de la Libye au Maroc (Canestrini et Fanzago, 1878) (226).

Dans plus de 90% des cas, c'est la "puce du chat" (*Ctenocephalides felis*) qui est retrouvée sur les chats ou les chiens domestiques en zone tempérée. Au Québec (237), *Ctenocephalides felis* peut parasiter près de 50 espèces différentes, s'attaquant à plusieurs animaux qui partagent le même milieu dont les chats, les chiens, les humains, les rats, les écureuils, les lapins, les mouffettes, les rats-laveurs, les moutons et la volaille. En France, elle est aussi peu spécifique, infestant les carnivores quelque soit leur mode de vie, rural ou urbain (238). L'accroissement du nombre d'animaux de compagnie en milieu urbain a favorisé la réapparition des puces et des problèmes liés à leur présence. La puce s'est adaptée à l'environnement extérieur comme aux maisons. La température accélère ou freine le développement, un minimum de 22°C semble requis, au contraire une chaleur supérieure à 30°C diminue la longévité des adultes. En hiver, la température extérieure, proche de 0°C provoque la mort des larves et des pupes. Dans les maisons, si la température est de 19°C, seul les adultes pré-émergés demeurent, dans l'attente de conditions plus favorables et d'un stimulus d'émergence. Ces éléments expliquent la présence de puces toute l'année. L'émergence des puces à partir des cocons est soumise à divers stimulus. Le passage d'une ombre, des pas sur un sol, des vibrations peuvent induire la sortie des cocons. Les performances de saut de la puce sont remarquables et lui permettent d'atteindre facilement ses hôtes. La puce du chien (*Ctenocephalides canis*) ou du chat (*Ctenocephalides felis*) sont très présentes. Si la puce du chien peut parfois infester le chat, la plus fréquente est la puce du chat qui infestera le chien ... et parfois s'attaquera à l'homme! Seul 5% des puces se retrouveront sur l'animal alors que 95% seront dans l'environnement. La contamination d'un animal sera donc souvent due au milieu extérieur, par contre, il sera régulièrement recontaminé par son environnement familial. Un animal en contact avec l'extérieur ou avec d'autres animaux est fatalement exposé à une contamination (237), (239).

Melophagus ovinus, le pou du mouton, mélophage du mouton, ou faux poux du mouton est un parasite hématophage des ovins, occasionnellement des chèvres et des bovins. Originaire d'Europe incluant l'Islande et les îles Féroé, très fréquent en Belgique, il est devenu cosmopolite avec l'importation du mouton dans la plupart des régions tempérées du monde comme le nord-ouest d'Afrique, Mongolie, le nord d'Inde, aussi bien qu'au Kenya, Sud

d'Afrique, Japan, Australie, Nouvelle Zélande, Nord d'Amérique, et pleines de régions au Sud d'Amérique incluant Tristan da Cunha et les îles Malouines. La population du pou augmente rapidement à la fin d'hiver et au début du printemps jusqu'à un maximum en avril et début mai. Un déclin commence en mai et en Juin, la population diminue considérablement (240).

4.2 METHODOLOGIE :

4.2.1 EXTARCTION DES ADN DES ARTHROPODES PAR LES DEUX TECHNIQUES « KIT MACHEREY NAGEL ET THERMOLYSAT »

Par la méthode fluorométrique qualitative 100% des extraits par kit Macherey Nagel et 100% des extraits par thermolysat ont montré une bande d'acide nucléique plus ou moins visible.

Par la méthode spectrophotométrique quantitative seulement 10% des 20 extraits par kit sont positifs à la présence d'ADN, alors que 50% dans seulement 14 extraits par thermolysats sont positifs. De plus les deux méthodes montrent le même pourcentage de contamination protéique (à peu près 50%) ou autres (100%).

Cette étude nous donne un aperçu sur une probable, avantageuse découverte, concernant l'utilisation et la fiabilité d'extraction d'ADN par thermolysat en biologie moléculaire. En effet, le tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS ; phosphate buffered saline) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique à de nombreuses applications de par son isotonicité et sa non-toxicité. Ces couches minces d'eau permettent d'empêcher la dénaturation des biomolécules, ou des changements conformationnels. Des additifs permettent d'étendre son champ d'application. Pour l'extraction d'ADN en biologie moléculaire, on lui ajoute du sel de magnésium (MgCl₂). Il est clair que les kit sont un gain de temps non négligeable et sont faciles d'utilisation. Mais ils sont honorables et en fonction de la "catégorie" ou de la "qualité" du kit, l'ADN sera plus ou moins purifié. Le thermolysat prend du temps, mais les solutions sont faites sur place, elles sont peu honorables. Le kit apporte-t-il vraiment un plus? Pour une réponse, l'utilisation d'un large éventail d'échantillons d'arthropodes devrait être étudiée davantage par ces deux techniques d'extraction, la comparaison ne serait que plus fiable.

La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. Afin d'obtenir des acides nucléiques hautement purifiés exempts de tout contaminant visibles, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées. Les contaminants susceptibles d'inhiber la réaction PCR sont énumérés dans (Annexe 3). La méthode alternative, en l'occurrence la méthode de la plaque d'agarose au bromure d'éthidium, est utile lorsqu'on ne dispose aussi que de faibles quantités d'acide nucléique. La quantité d'acide nucléique peut être estimée par comparaison à une gamme de concentrations en utilisant l'intensité de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium lorsque celui-ci est irradié par la lumière UV. En addition, la contamination par ARN peut être détectée sur le gel d'agarose. L'ARN migre et donne un smear d'une molécule de faible poids moléculaire. L'ADN génomique donne une bande d'une molécule de grand poids moléculaire, qui peut être récupérée et purifiée pour l'amplification PCR (241).

4.2.2 RECHERCHE DE LA PRESENCE DU GENE *ftsZ* APRES PCR ET LECTURE DES GELS

Au cours de cette étude, 96.30 % des ADN amplifiés se sont révélés négatifs en utilisant le gène *ftsZ*. Ceci pourrait relever de la présence d'inhibiteurs (Annexe 13), de polymérase par exemple, dans les extraits d'arthropodes susceptibles d'interférer avec la PCR. Dans des travaux réalisés auparavant (242), (243) , il a été montré qu'il existait des inhibiteurs de PCR dans le sang des bovins, on pourrait aussi supposer qu'il en existe chez les arthropodes. Mais pour avoir 100% d'ihnhibition dans une même étude, dans différents arthropodes et différents hôtes, reste extraordinairement exceptionnel. Cette hypothèse ne peut néanmoins pas être écartée, car un risque existe toujours et pourrait faire objet d'une étude de recherche complète.

Dans le lot de notre échantillon, un extrait par kit Mecherey Nagel (n=4) d'une tique de bovin (3.70%) s'est révélée positif après amplification, contenant une bande qui correspond au fragment d'ADN de 333pb recherché. Le deuxième témoin positif expressément ajouté, provenant d'un tissu de rate d'hérisson, et qui s'est révélé positif, vient bien montrer la fiabilité de la technique de PCR portant sur le gène *ftsZ* pour ce genre de Bactéries et ce genre d'origine biologique (origine tissulaire). Ceci révèle que toutes les étapes d'investigation allant de la conservation des arthropodes jusqu'à l'électrophorèse, en passant par les étapes de

cette extraction et de la PCR sensible se sont bien déroulées. Des causes d'erreur pouvant être dues à des anomalies de techniques ou de manipulation n'ont pas eu lieu et l'absence d'inhibiteur est confirmée dans ce cas (bovin/*R. sanguineus*).

Lors de l'extraction par thermolysat, aucun test ne s'est avéré positif, même celui correspondant au test trouvé positif lors du thermolysat (n=T4). Ceci pourrait être dû aux problèmes de reproductibilité de la PCR par le gène *ftsZ* (7), (105). En effet, les extraits d'ADN donnés (21 à 36) étaient positifs lors de la première étude, contrairement à la notre.

Pour vérifier l'hypothèse de l'inhibition, vérifier tous les tests, notamment le test n=T4 et pour identifier les espèces *Bartonella*, un relancement d'une autre PCR avec des amorces des gènes (*rpoB*), *ITS*, *gltA* et *rib*, comme le séquençage sont nécessaires pour valider nos résultats et sont vus dans le cadre des perspectives.

De ce fait, l'affirmation qu'une tique est porteuse de *Bartonella* ne repose que sur la présence d'un amplifiat d'environ 333 pb. Cependant, différents auteurs utilisant ce système d'identification n'indiquent à aucun moment, pour cette taille d'amplifiat, d'autres hypothèses venant à l'encontre de cette déduction. En effet, la détection des bartonelles peut être vraiment un défi et son identification nécessite la capacité de détecter des bactéries dans les deux hôtes mammifères et les arthropodes vecteurs. L'amélioration de la détection de l'ADN de *Bartonella* dans arthropodes vecteurs par une méthode PCR, qui est suffisamment sensible et spécifique pour détecter un nombre varié d'espèces de *Bartonella* dans une large gamme d'échantillons environnementaux maintient encore un minimum de réactivité croisée avec les organismes vecteurs arthropodes. Les techniques de détection nucléiques à base d'acide peut être entravée par des inhibiteurs de l'environnement, faible sensibilité, et l'absence de genre amorces spécifiques (197), (244). Dans notre recherche, nous avons utilisé une détection PCR du gène *ftsZ* de *Bartonella* dans divers échantillons d'arthropodes provenant de mammifères et prélevés sur le terrain. Cette technique est spécifique pour les espèces de *Bartonella* et est assez sensible pour détecter *Bartonella* dans les hôtes mammifères et les arthropodes vecteurs. En plus d'autres comparaisons ont fait appel à ces gènes en raison de la grande quantité de données de séquences disponibles. Ceux-ci sont probablement dues à des réarrangements génétiques et événements de transfert horizontal de gènes qui se produisent fréquemment dans *Bartonella* (197), (84) (245), (73), (244). L'utilisation de la protéine *FtsZ*

comme un moyen de détecter et de différencier les espèces de *Bartonella* a été décrite (112). Le gène *ftsZ* code pour une protéine *FtsZ* qui joue un rôle important dans la division cellulaire bactérienne. Contrairement à la plupart des protéines *FtsZ* actuellement caractérisées pour d'autres bactéries, les protéines *FtsZ* de différentes espèces de *Bartonella* sont presque deux fois plus grande, avec une partie supplémentaire à l'extrémité C-terminale (112), (246). Une comparaison de cette extrémité montre qu'elle a un plus haut degré de divergence de séquence par rapport au gène codant la région N-terminale. *FtsZBh* et *FtsZBq* exposent respectivement 83 et 81% d'identité à *FtsZBb* et elles sont 91% identiques entre elles même. La conservation pour les trois protéines est particulièrement frappante dans les domaines N-terminaux, qui présentent une identité de 98 à 99% par rapport à une longueur de 321 acides aminés. Cette partie de *FtsZBh* et *FtsZBq* est respectivement 63% et 61% identique à leur homologue *FtsZ* de *Escherichia coli* (*FtsZEc*). Comme *FtsZBb*, *FtsZBh* et *FtsZBq* contiennent tous les domaines fonctionnels identifiés dans *FtsZEc* dans leurs domaines N-terminaux (246). Cette région contient la séquence d'acides aminés « GGGTGTG », fortement homologue au motif de la tubuline (GGGTGSG) soupçonnées d'être impliquées dans la liaison- GTP (Guanosine Tri-Phosphate) chez les eucaryotes (247). Quant à l'utilisation des amorces du gène ARNr 16S en PCR qui a été la première technique utilisée et pendant longtemps, montre que ces amorces ne sont pas du genre spécifique et conduit à l'amplification de fragments de gènes ARNr de beaucoup d'autres protéobactéries. La détection des bactérie du genre *Bartonella* par PCR devient alors facile et directe, en utilisant la paire de primers *ftsZ* conservés et spécifique au genre *Bartonella* (248).

Autres gènes ont été empiriquement utilisés pour tenter de classer les espèces de *Bartonella* : le gène *gltA* (61), *rpoB* (63), *16S-23S rRNA ITS* (99), *rib C* (101), et le gène *groEL* (249), (103). En plus de la partie C-terminale divergente, la séquence codant pour 900-base de la région N-terminale du gène *ftsZ* pour les espèces de *Bartonella* reconnues a été séquencée. Les séquences ont bien été conservées (81,2 à 98,3%) entre les espèces, mais la divergence trouvée a permis de développer un arbre phylogénétique pour la plupart des souches étudiées. Les similitudes constatées entre les arbres phylogénétiques obtenus avec les séquences de gènes *ftsZ* et ceux issus d'autres gènes montre que le gène *ftsZ* doit être considéré comme un outil utile pour être inclus dans les études de phylogénie. Les résultats faussement positifs par PCR en raison de problèmes de contamination peut être évitée en utilisant un certain nombre

de paires d'amorces qui ciblent des gènes différents. Ajout du gène *ftsZ* au panel de gènes disponibles pour la détection par PCR peut être utile (250).

En résumé, l'utilisation des amorces *ftsZ* (105), (112) en PCR apparaît d'être l'outil le plus fiable de par sa spécificité, sensibilité et rapidité, qui reste utile pour la détection et l'identification de *Bartonella*, ce qui devrait faciliter le travail de routine sur des échantillons d'arthropodes, en lui combinant l'utilisation des amorces des autres gènes spécifiques aux *Bartonella* et différentes techniques de détection/identification de *Bartonella*, qui vont permettre aussi de pallier aux problèmes d'inhibition, de réactivité avec l'environnement et de rendement. Certains auteurs proposent, quand elle est possible, une mise en culture préalable de l'agent pathogène à partir de la tique avant d'effectuer l'étude moléculaire. Ceci augmente la lourdeur des études. La qualité de l'extraction d'ADN est un point fondamental. Le choix des amorces est essentiel et il est important de vérifier la fiabilité des résultats postifs par une étape de séquençage (251). Les perspectives offertes par la PCR en temps réel en terme de qualité de lecture et de facilité d'emploi ouvrent de nouveaux horizons pour la détection des agents pathogènes dans les tiques (252).

Dans notre étude, les conditions de la recherche ne permettaient pas de valider tous les produits PCR, ni d'identifier l'espèce de *Bartonella*. Nous avons utilisé 38 arthropodes provenant de différents hôtes. Il s'agit d'une petite mosaïque d'échantillon. Les résultats obtenus ne peuvent donc faire objet d'une généralisation. En particulier, la portée épidémiologique de cette étude reste très limitée. Les taux d'infections des espèces arthropodes par mois, sexe, zone de collecte et type d'espèce hôte n'ont pu être définis.

4.3 IDENTIFICATION DE *BARTONELLA*

En matière de bartonellose des ruminants, les élans hébergent des *Bartonella* comme l'ont montré Chang et al (33). Deux espèces sont décrites chez ces animaux : *B. capreoli* (54) et *B. schoenbuchii* (53). Dans des études aux États-Unis, la prévalence de bactériémies à *Bartonella* ont été déterminées à 15% chez les wapitis (*Cervus elaphus*), 90% chez le cerf mulet, 0% dans 84 mouflon d'Amérique (*Ovis canadensis*), et environ 50% bétail domestique (*Bos taurus*) (29), (150). Les analyses de séquences partielles de gènes de la citrate synthase des isolats a montré qu'ils étaient tous étroitement liés les uns aux autres et aussi à *B. weissii*.

2 % d'infection à *Bartonella sp.* dans une étude portant sur 540 tiques selon Maillard (242) et des taux de 13,5 % à 27 % d'infection des tiques du genre *Dermacentor* sur 16 tiques de bovin selon Halos (253) ont été enregistrées. Schouls et al (4) ont montré aux Pays-Bas qu'un taux élevé (plus de 70 %) de 121 tiques *Ixodes ricinus* récoltées sur 38 chevreuils comportait des séquences de *Bartonella*. L'auteur concluait au rôle épidémiologique majeur du chevreuil et de ces tiques dans les infections à *Bartonella* (et d'*Ehrlichia* et de *Borrelia*, par ailleurs), en émettant l'hypothèse d'un réservoir constitué par des micromammifères sauvages comme les rongeurs (7). Des travaux sur des arthropodes isolés sur des mammifères sauvages comme les rongeurs, ont établi qu'un fort pourcentage d'entre elles hébergeait de l'ADN de *Bartonella* et qu'elles peuvent jouer un rôle dans l'épidémiologie des infections à bactéries du genre *Bartonella* (7). En Amérique du Nord, le rôle vecteur des tiques a été supposé pour l'infection du coyote et de l'homme (33). Au Pérou l'isolement de *B. rochalimae* en 2003 a été d'abord fait de puces de *Pulex* (254) puis d'un patient présentant une fièvre et une splénomégalie (58). En France, *B. alsatica* a été isolée d'un lapin sauvage (8) puis d'un patient souffrant d'endocardite (255). Parce que les gens pourraient être en contact avec des animaux différents, il est possible que certaines maladies inconnues soient causées par les *Bartonella*. Grâce à la biologie moléculaire, la recherche d'agent pathogène dans les arthropodes devient une orientation dans le cadre de « maladies émergentes », ainsi que dans la recherche épidémiologique de maladies professionnelles des forestiers ou des agriculteurs. Pour l'espèce bovine dans le cadre de l'étude de la babésiose (256), les études séro-épidémiologiques cèdent le pas aux études sur les vecteurs par le biais de la biologie moléculaire. Une approche similaire s'est faite jour en médecine vétérinaire dans l'espèce canine (257).

Dans notre étude, l'apparition de la bande positive indique que la tique femelle, *Rhipicephalus sanguineus*, provenant de bovin d'une zone rurale, pourrait être infectée par une *Bartonella sp.* Cette zone était infestée de trous de rongeurs et la présence de quelques chiens parmi le bétail était observée. En Algérie ou ailleurs, pas ou peu de recherches sont entreprises sur la biodiversité des bartonelles en relation avec les bovins, car les bovins ne présentent pas de symptôme ou ils ne sont pas identifiés. Maillard, Riegel et coll (55), ont montré la haute prévalence de *B. bovis* chez des bovins ne présentant aucun symptôme. Étant donné que le ruminant n'est a priori pas malade, aucun diagnostic différentiel n'est à envisager. Toutefois, chez la vache, la bactériémie à *B. bovis* a été corrélée à des troubles de la reproduction (mortalités embryonnaires, avortements dans le dernier tiers de la gestation)

(258). On peut donc penser à la fièvre Q, la leptospirose, la chlamydie, l'actinomycose, la brucellose, la salmonellose, l'épérythrozoose (ou mycoplasme) la toxoplasmose, la néosporose, ... L'infection des bovins par des bactéries du genre *Bartonella* est connue depuis les années trente du siècle dernier. Des *Bartonella* ont été retrouvées dans du sang de bovins en différents endroits du globe : tout d'abord en Algérie en 1934, en Palestine la même année, l'année suivante en Espagne. En 1947, des chercheurs mettent en relation des symptômes observés sur des bovins au Rwanda (amaigrissement, soif intense, constipation) avec des *Bartonella* isolées sur frottis sanguins. Depuis, d'autres bactéries ont été retrouvées sur des bovins, aux Etats-Unis par exemple, ou en Asie (7), (259), (260). *B. bovis* a été mise en évidence sur des bovins de Côte d'Ivoire pour la première fois par Kelly et ses collègues en 2005 (261). Les ruminants domestiques et sauvages (élan, cerf, orignal) sont infectés par la bactérie (33), (258), (262), (263). Mais les connaissances sur les bartonelloses des ruminants sont encore, à l'heure actuelle, incomplètes (264). Des interrogations persistent en effet sur la pathogénie chez les ruminants, les vecteurs et les modes de transmission. Seuls les bovins semblent les plus affectés parmi les ruminants domestiques, mais les symptômes ne sont pas bien identifiés, donc il n'y a pas de traitement mis en oeuvre, ni de prophylaxie. Dans ce cas, il n'existe pas de diagnostic clinique, mais les techniques de laboratoire permettent de détecter la bactérie (264).

Des séquençages des *Bartonella sp.* obtenus de *Rhipicephalus sanguineus*, dans différentes recherches antérieures ont abouti à la mise en évidence de plusieurs espèces de *Bartonella* à signification médicale et vétérinaire, comme *B. henselae*. *Rhipicephalus sanguineus* se nourrit d'une grande variété de mammifères, mais les chiens sont l'hôte de prédilection aux États-Unis (265), et la population peut atteindre des proportions nuisibles dans les maisons et les chenils (265) ou un total de 92,3% des espèces *Rhipicephalus sanguineus* ont été retirées de chiens. Elle a été confirmée comme étant les espèces de tiques les plus représentées en Sardaigne, représentant plus de 70% (229). Elle est devenue l'une des tiques les plus répandues au niveau mondial en raison de son association avec les chiens domestiques (266). Elle se nourrit rarement des êtres humains, en particulier dans les pays tempérés, il semble y avoir une plus grande affinité humaine dans les régions à températures plus élevées (265). Elle est capable de transmettre des agents pathogènes tels que *Rickettsia rickettsii* (229), (267), les espèces d'*Ehrlichia* et les espèces *Anaplasma* (229), (268), *Coxiella burnetii* (229), (269) et *Leishmania infantum* (229), (270). *Rickettsia rickettsii* provoque la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses ou RMSF (Rocky Mountain Spotted Fever)

chez les humains et les canins domestiques aux États-Unis (271), (272) et le Mexique (273), (274). Dans les régions de l'Europe méridionale (Afrique et en Asie, la tique brune du chien est le principal vecteur de *Rickettsia conorii*, qui est la bactérie qui cause la fièvre boutonneuse méditerranéenne chez l'homme. Les *Rhipicephalus sanguineus* d'Algérie contiennent *R. conorii* subsp. *P. conorii* souche Malish (275). *Rickettsia massiliae* a été aussi découverte, récemment, impliquée comme cause de la maladie humaine (276), (277). Elle a également été trouvée récemment dans *R. sanguineus* de l'Arizona (278). *R. sanguineus* a également été rapportée comme étant le vecteur du parasite protozoaire *Hepatozoon canis*, ce qui provoque l'hépatozoonose canine chez le chien (279), (280) ainsi que *Babesia canis* (babésiose canine) chez les chiens (271). *Bartonella henselae*, la bactérie qui cause la maladie des griffes du chat chez l'homme, est généralement associée aux puces, mais a récemment été détecté dans les tiques *R. sanguineus* en Californie (281). Un cas de péliose hépatique, dû à *Bartonella henselae*, a été décrit chez un chien (282). En Novembre 2011, l'ADN de *Bartonella rochalimae*, *B. quintana*, et *B. elizabethae* a été la première fois observé chez *Rhipicephalus sanguineus* et *Dermacentor nitens* au Pérou (283), qui est responsable d'endocardite chez le chien (282), (284), (285), (286). L'exposition des chiens à *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* est plus probable à la campagne (282), (286), (284), (285). Une enquête épidémiologique, réalisée sur 1920 chiens de la Caroline du Nord et de Virginie, révèle que les animaux présentant des anticorps sont généralement des chiens vivant à la campagne, ayant la possibilité de vagabonder, ayant des contacts avec d'autres animaux, comme les chiens, chevaux et bovins, tous exposés à de nombreuses piqûres de tiques. Il semble que l'hôte naturel de *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* soit une espèce animale sauvage (sans doute un rongeur) et que la transmission au chien se réalise par l'intermédiaire de tiques notamment *Rhipicephalus sanguineus* et *Dermacentor variabilis*. Le rôle de *Rhipicephalus sanguineus* est suggéré par le nombre important d'animaux co-infectés par *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* et *Ehrlichia canis* et/ou *Babesia microti*. Le rôle de *Dermacentor variabilis* est suggéré par le fait que 8% des animaux sont co-infectés par *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* et *Rickettsia rickettsii*. Toutefois, d'autres tiques, tels que *Amblyomma americanum* et *Ixodes scapularis*, pourraient être incriminées. La mise en évidence d'une co-infection des chiens par *Ehrlichia chaffeensis* et *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* conforte la possibilité d'une transmission par *Amblyomma americanum*. Compte tenu de l'écologie de ces diverses espèces de tiques, les auteurs de l'enquête épidémiologique pensent que *Dermacentor variabilis* et, peut-être, *Amblyomma americanum* et *Ixodes scapularis* seraient responsables de la transmission des rongeurs aux chiens alors que

Rhipicephalus sanguineus serait plutôt responsable de la transmission des chiens infectés aux chiens sains (52), (90), (204), (287). *Rhipicephalus sanguineus* est trouvée aussi chez les bovins pour sa probable propagation parmi des troupeaux (229), augmentant par conséquent le risque de transmission de *Bartonella spp.* des chiens à ces ruminants.

En effet, la répartition des *Bartonella sp.* semble liée à la répartition de leurs hôtes ou de leurs vecteurs. Pour s'en tenir aux seuls mammifères (288) cités ci-dessus, on peut noter que (i) le chat peut héberger *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae*, *B. henselae*, and “*B. weissii*,” récemment décrite comme *Bartonella bovis*; (ii) que le chien peut être infecté par *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella elizabethae*, *Bartonella henselae* et *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*; (iii) que *Bartonella bovis* don't l'infection aussi décrite par Boulouis et al et *Bartonella chomelii* sont fréquemment isolées du sang des bovins. Les bovins hébergent fréquemment aussi des espèces non encore totalement décrites (33); (iiii) et que les rongeurs peuvent contenir :*B. tribocorum*, *B. elizabethae*, *B. birtlesii*, *B. taylorii* et *B. vinsonii subsp. Arupensis*, *B. tamiae* (288). Des résultats d'une récente et première étude en Algérie et en Afrique du Nord ont révélé que 31% de 100 chiens errants étaient séropositifs pour les antigènes de *B. vinsonii subsp. berkhoffii*, *B. clarridgeiae* et / ou *B. henselae* (Kernif T et autres, données non publiées) et que 50% des chiens positifs à la Bartonella ont été infestés par les tiques ou les puces (141). Entre 2005-2007, les Bartonella ont été détectées dans des rongeurs, soit *B. elizabethae*, *B. tribocorum* et *Bartonella s.* (124). Des *Bartonella* ont été retrouvées, dans du sang de bovins en 1934 comme on l'a déjà vu. Un nouveau génotype spécifique à l'Algérie a été détecté à partir d'une puce *Xenopsylla cheopsis* collectée sur un rat (*Rattus norvegicus*) et souris (*Mus spretus*) capturées dans la région de Mascara (Ouled Ben Ouali). Ce génotype a été confirmé en utilisant quatre gènes (*ftsZ*, *rpoB*, *gltA*, *rib*) et un espace intergénique (ITS). *Candidatus Bartonella eldjazairii* à été le nom proposé (289). Il est connu que les tiques *Rhipicephalus sanguineus* pourraient être des vecteurs potentiels d'espèces de *Bartonella*, comme cela a été supposé depuis 1992 (290). Ils ont été infectés expérimentalement par *Bartonella vinsonii* (291), son rôle vecteur potentiel est seulement suggéré pour *Bartonella vinsonii subsp. Berkhoffii* et il n'est pas encore connu, s'il s'agit d'un vecteur potentiel pour *B. henselae*, comme c'est le cas pour le parasite *protozoan Leishmania chagasi*, qui cause les leishmanioses chez les humains et chiens (270), (292) ou pour *R. rickettsii* (Rocky Mountain spotted fever), et éventuellement pour *Anaplasma platys* et *Babesia gibsoni* chez les chiens domestiques (293). Des études expérimentales de transmission vectorielle doivent être effectuées afin de valider l'hypothèse que la tique

DISCUSSION

transmet les espèces de *Bartonella* aux animaux comme les bovins et aux humains (180), car les risques de transmission des *Bartonella* en Algérie sont réelles et pourraient être très importants. La présence de *Bartonella* chez les ruminants entrant dans la consommation humaine pose le problème de leur pouvoir pathogène, de leur transmission à l'homme, des professions exposées et de l'éventuel pouvoir contaminant de la viande, du lait et de leurs dérivés.

D'autant plus que même si le pourcentage de *Bartonella sp.* (3.70%) découvert semble faible, il n'est néanmoins pas insignifiant si on considère le nombre de *R. sanguineus* testée, qui est seulement de deux tiques *R.sanguineus*, et l'espèce mammifère source, qui est non spécifique (bovin), et que seulement 1puit/2 était positif , en comparaisant avec une étude faite en Italie en 2008 (229) , où l'hôte était spécifiques (chien) et où le nombre de *R. sanguineus* positif à *Bartonella* était supérieur (1/8 pools de chiens avec 5 tiques dans chaque pool). Même si cela voudrait dire que seulement une tique était positive, la prévalence 0.09% reste faible par rapport à la notre et à notre cas.

Ce cas qui relie la présence des tiques de type *Rhipicephalus sanguineus*, des bovins (hôtes non spécifiques), chiens (hôtes spécifiques) et rongeurs (réservoir) dans une zone rurale favorisant un changement de comportement de ces tiques et probablement des bactéries du genre *Bartonella* paraît être un événement naturel rare dans son genre et donc très peu étudié, mais son impact sur l'adaptation des *Bartonella* et donc sur l'épidémiologie pourrait être important, dépendamment des changements de notre société. Il serait très intéressant d'identifier l'espèce de *Bartonella*, afin de mesurer la portée de cet évènement en Algérie et dans le monde en général. Ces résultats approfondissent nos connaissances sur les maladies transmises par *R. sanguineus* et ils pourraient être utiles pour évaluer les problèmes de santé animales et humaines et de la prévention des risques, et pourrait servir de base à un plan visant à contrôler la propagation des maladies. Les variations entre les différents animaux hôtes, sites d'échantillonnage ou le mois d'échantillonnage sont fréquentes, et *Bartonella* est également plus fréquente dans les milieux agricoles que dans les zones urbaines (110)- (119).

Des études de co-infection sont aussi encouragées dans notre étude. Comme les *Bartonella* sont détectée en association avec d'autres bactéries, comme : *R. rickettsii* et *B. henselae* dans

DISCUSSION

les tiques *Rhipicephalus sanguineus* adultes, ceci nous permet de soulever des questions sur le but et le type de co-infection.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Y a-t-il plus d'émergences/ré-émergence maintenant qu'avant ? Elles sont peut-être le résultat de modifications du mode de vie dans nos sociétés. La majorité des problèmes émergents concernent donc des maladies infectieuses, avec une composante zoonotique. L'intégration de données environnementales ou animales à l'étude de la santé de l'homme est nécessaire à la compréhension de la transmission des infections. L'étude de l'évolution des microorganismes bactériens par la génétique est un sujet de recherche majeur. Le développement de nouveaux agents antimicrobiens à l'ère des maladies émergentes, réémergentes et des résistances accrues aux traitements est un défi.

Cette étude était entreprise pour examiner les arthropodes des populations animales domestiques et non domestique d'Algérie urbaine, péri-urbaine et rurale pour décrire des souches de *Bartonella* en relation avec des facteurs qui pourront affectés l'infection, tels que les espèces animale et la présence d'ectoparasites. La maîtrise des analyses de biologie moléculaire est efficace mais encore délicate. Il y'aurait le risque de tomber dans l'ambiguïté des résultats et interprétations .Il existe beaucoup de choix au niveau des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des populations bactériennes. La technique utilisée dépendra du but de l'étude, du budget, des habitudes du laboratoire, de la complexité de la population étudiée et du temps disponible. Même si les profils automatisés sont les plus faciles à comparer et reproduire, ils ne permettent pas le séquençage ultérieur. La plupart des études actuelles utilisent et comparent plusieurs méthodes. Un séquençage complet et une analyse génomique comparative permettent une comparaison entre des espèces dans le genre *Bartonella* et entre les souches de cette bactérie et fournirait des informations nécessaires pour déduire la microévolution de ces organismes. Des projets de collaboration internationale entre de nombreux laboratoires est nécessaire ; un séquençage d'un génome complet permet d'accéder à d'autres éléments essentiels, comme les locus polymorphes, points chauds d'évolution. Les répétitions en tandem sont l'une des sources les plus importantes de variabilité dans les génomes (294). Ces séquences particulières, constituées de répétitions successives de motifs nucléiques, sont présentes dans l'ensemble du monde vivant, et peuvent être situées dans les gènes comme dans les régions intergéniques. Même si leur fonction biologique reste à élucider, ces structures ont, grâce à leur polymorphisme, des applications dans de nombreux domaines. Chez les bactéries, elles, dont le nombre d'unités varie d'une souche à l'autre, se révèlent un outil puissant pour le génotypage de souches à des fins

épidémiologiques. A partir des nombreuses séquences génomiques disponibles, il faut être en mesure d'identifier les répétitions en tandem d'intérêt. Cette tâche peut être accomplie grâce à une discipline fortement associée à la génomique : la bioinformatique. Il est impensable d'espérer traiter les énormes quantités de données de séquençage générées quotidiennement sans outils informatiques efficaces.

Les recherches pointent les inégalités en matière de santé. L'accélération de la prise de conscience a stimulé des situations de riposte. L'impact de la communication pour sensibiliser le citoyen sur les effets des infections, semblent difficilement prévisibles. La santé demeure l'une des grandes priorités des politiciens. Les systèmes de surveillance primaire, c'est-à-dire sur le terrain, doivent être améliorés par des détections plus précoces et une communication en constante amélioration. Une augmentation des capacités en personnels et en laboratoires chargés de la surveillance est souhaitable, cette dernière étant étroitement dépendante de la possibilité économique de chaque pays à construire un système sanitaire efficace.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Berglund, E. C.** *Genome Evolution and Host Adaptation in Bartonella*. Uppsala : s.n., 2009. p. 68. ISBN:978-91-554-7616-8..
2. **Experimental infection of skin culture with Bartonella henselae. Neves Ferreira Vehlo, B. E., Cintra, L. M., Lania, B. G., Almeida, A., Vincent, L., Gupta, K. et Ericson, M. E.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens.
3. **Prevalence and genetic characterization of Bartonella in Wildlife in Japan. Sato, S., Kabeya, H., Yamazaki, M., Takino, S., Miruya, T., Suzuki, K., Kobayashi, S., Souma, K., Masuko, T., Bai, Y., Kosoy, M., Hirushi.** Raleigh, North Carolina, USA : 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens., 2012.
4. **Schouls, L.M., Van de Poli, I., Rijpkema, S.G.T., Schot, C. S.** Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks. *J. Clin. Microbiol.* 1999, Vol. 37, pp. 2215-2222.
5. **Chang, C.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Romano, V. and Tietze, N.** Molecular evidence of Bartonella spp. in questing adult Ixodes pacificus ticks in California. *J. Clin. Microbiol.* 2001, pp. 1221-1226.
6. **Chang, C.C., Kasten, R.W., Chomel, B.B., Simpson, D.C., Hew, C.M., Kordick, D.L., Heller, R., Piémont, Y. and Breitschwerdt, E.B.** Coyotes (Canis latrans) as the reservoir for a human pathogenic Bartonella spp.: molecular epidemiology of Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii infection in coyotes from central coastal California. *J. Clin. Microbiol.* 2000, pp. 4193-4200.
7. **Trottet, C.** *Etude de la vectorisation des bactéries du genre Bartonella chez les bovins par les tiques (thèse de doctorat vétérinaire)*. Alfort : s.n., 2003. p. 65 . n° 39.
8. **Heller, R., Kubina, M., Mariet, P., Riegel, P., Delacour, G., Dehio, C., Lamarque, F., Kasten, R., Boulouis, H.J ., Monteil, H., Chomel, B. and Piémont, Y.** Bartonella alsatica sp. nov., a new Bartonella species isolated from the blood of wild rabbits. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, Vol. 49, pp. 283-288.
9. **Birtles, R.J., Hazel, S., Bown, K., Raoult, D., Begon, M., Bennett, M.** Subtyping of uncultured bartonellae using sequence comparison of 16S/23S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. *Molecular and cellular probes.* 2000, Vol. 14, pp. 79-87.
10. **Llanos-Cuentas E.A., Warrell D.A.** *Bartonellose.* " In: D.A. Warrell. s.l. : (Ed.): Infektionskrankheiten. Edition Medizin, 1990. pp. 461-463. A. Sander. Epidemiologie, Klinik

und Diagnostik von Bartonella-Infektionen. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg. http://www.antibiotikamonitor.at/5_03/5_03_1.htm.

11. **Bass, J., Vincent, J., Person, D.** The expanding spectrum of Bartonella infections : I. Bartonellosis and trench fever. *Pediatr Infect Dis J.* 1997, Vol. 16, pp. 2-10.

12. **Garcia-Caceres, U., Garcia ,F.U.** Bartonellosis. An immunodepressiv disease and the life of Daniel Alcides Carrión. *Am. J. Clin. Pathol.* . 1991, Vol. 95 (Suppl.1), pp. 58-66.

13. **Poma, P.A.** Daniel A. Carrion: 1858-1885. *IMJ Ill Med J.* 1988, Vol. 174, pp. 27-9.

14. **Schultz, M.G.** Daniel Carrion's experiment. *N Engl J Med.* 1968, 278, pp. 1323-6.

15. **Barton, A. L.** El germen patogeno de la enfermedad de Carrion. *Cron Med Lima.* 1901, Vol. 8, p. 193 and 310. Sander A. Epidemiologie, Klinik und Diagnostik von Bartonella-Infektionen. Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg.http://www.antibiotikamonitor.at/5_03/5_03_1.htm.

16. **Cuadra, M.** Bartonella bacilliformis. *Medical microbiology and infectious diseases.* 1981, pp. 510-6.

17. **De Estete, M.** Relacion del viaje de Hernando Pizarro (1553) as cited by Hermilio Valdizán in Apuntes para la Historia de la verruga peruana. *Anal. Fac. Med.* 1925, Vol. 10, pp. 34-44. Sander A. Epidemiologie, Klinik und Diagnostik von Bartonella-Infektionen. Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg.http://www.antibiotikamonitor.at/5_03/5_03_1.htm.

18. *A case of Carrión's disease associated with human sacrifice from the Huari culture of southern Peru.* **Allison M.J., Pezzia A., Gerszten E., Mendoza D.** 1985, *Am. J. Phys. Anthropol.*, Vol. 41, pp. 295-300.

19. **Sander, A.** Epidemiologie, Klinik und Diagnostik von Bartonella-Infektionen. [En ligne] http://www.antibiotikamonitor.at/5_03/5_03_1.htm.

20. **Werner, H., Haenssler, E.** Über Fünftagefieber, febris quintana. *Münch. Med. Wochenschrift.* 1916, Vol. 63, pp. 1020-1023.

21. **Kostrzewski, J.** The epidemiology of trench fever. *Bull. Acad. Pol. Sci. (Med.).* 1949, Vol. 7, pp. 233-263.

22. **Munk, F., da Rocha-Lima, H.** Klinik und Ätiologie des sogen. "Wolhynischen Fiebers". (Werner-His'sche Krankheit) I. Klinischer Teil. *Münch. Med. Wochenschrift* 64. 1917, Vol. 42, pp. 1357-1361.

23. **Thörner, W.** Zur Kenntnis des Fünftagefiebers. (Febris quintana, Febris wolhynica). *Münch. Med. Wochenschrift.* 1916, Vol. 63, pp. 1775-1776.

24. **Logan, J.S.** Trench fever in Belfast and the nature of the relapsing fevers in the United Kingdom in the nineteenth century. *Ulst. Med. J.* 1989, Vol. 58, pp. 83-88.
25. **Swift, H.F.** Trench fever. *Ann. Intern. Med.* 1920, Vol. 26, pp. 76-98.
26. **Maurin M., Raoult D.** Bartonella (Rochalimaea) quintana-Infections. *Clin. Microbiol. Reviews.* 1996, Vol. 9, pp. 273-92.
27. **Raoult, D., Ndiokubwayo, J.B., Tissot-Dupont, H., Roux, V., Faugere, B., Abegbinni, R., Birtles, R.J.** Outbreak of epidemic typhus associated with trench fever in Burundi. *The Lancet.* 1998, Vol. 352, pp. 353-358.
28. **Vayssier-Taussat, M.** Bartonellose. [En ligne] <http://www.maladies-atiques.com/Bartonelloses.htm>.
29. **Jacomo, V., Kelly, P.J., Raoult, D.** Natural History of Bartonella Infections (an Exception to Koch's Postulate). *Clin Vaccine Immunol.* 2002, Vol. 9, p. 18.
30. **Brumpt, E.** Note sur le parasite des hématies de la taupe. *Grahamella talpae* n. g. n. sp. *Bull Soc Pathol Exo.* 1911, Vol. 4, pp. 514-7.
31. **Piemont, Y., Bermond, D.** Maladies provoquées par les Bartonella. *John Libbey Eurotext.* 2001, Vol. 59, pp. 593-604.
32. **Bermond, D., Heller, R., Barrat, F., Delacour, G., Dehio, C., Alliot, A., Monteil, H., Chomel, B., Boulouis, H.J. et Piemont, Y.** Bartonella birtlesii sp. nov. isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000, Vol. 6, pp. 1973-1979.
33. **Chang, C.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Heller, R., Kocan, K.M., Uenok, Yamamoto, K., Bleich V.C., Pierce, B.M., Gonzales, B.J., Swift, P.K., Boyce, W.M., Jang, S.S., Boulouis, H. J., Piemont, Y.** Bartonella spp. Isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg. Infect. Dis.* 2000, Vol. 3, pp. 306-311.
34. **Chomel, B., Abbott, R.C., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K.A., Kass, P.H., Glaser, C.A., Pedersen, N.C. and Koehler, J.E.** Bartonella henselae prevalence in domestic cats in California : risk factors and association between bacteriemia and antibody titers. *J. Clin. Microbiol.* 1995, Vol. 33, pp. 2445-2450.
35. **Droz, S., Chi, B., Horn, E., Steigerwalt, A.G., Whitney, A.M. and Brenner, D.J.** Bartonella koehlerae sp. nov. isolated from cats. *J. Clin. Microbiol.* 1999, pp. 1117-1122.
36. **Heller, R., Riegel, P., Hansmann, Y., Delacour, G., Bermond, D., Dehio, C., Lamarque, F., Monteil, H., Chomel, B., Piémont, Y.** Bartonella tribocorum sp. nov., a new Bartonella isolated from the blood of wild rats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998, Vol. 48, pp. 1333-1339.

37. **Kordick, D.L., Wilson, K.H., Sexston, D.J., Hadfield, T.L., Berkhoff, H.A., Breitschwerdt, E.B.** Prolonged Bartonella bacteriemia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 1995, Vol. 33, pp. 3245-3251.
38. **Kerkhoff, F.T., Bergmans, A.M.C., van der Zee, A. and Rothova, A.** Demonstration of Bartonella grahamii DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J. Clin. Microbiol.* 1998, pp. 4034-4038.
39. **Raoult, D., Fournier, P.E., Drancourt, M., Marrie, T.J., Etienne, J., Cosserat, J., Cacoub, P., Poinignon, Y., Leclercq, P., Sefton, A.M.** Diagnosis of 22 new cases of Bartonella endocarditis. *Ann. Intern. Med.* 1996, Vol. 125 (8), pp. 646-652.
40. **Regnery, R.L., Olson, J.G., Perkins, B.A., Bibb, W.** Serological response to Rochalimaea henselae antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet.* 1992, Vol. 339, pp. 1443-1445.
41. **Roux, V., Eykyn, S.J., Wyllie, S., Raoult, T.D.** Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii as an agent of a febrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J. Clin. Microbiol.* 2000, Vol. 38, pp. 1698-1700.
42. **Sander, A., Zagrozek, A., Bredt, W., Schiltz, E., Piémont, Y., Lanz, C., Dehio, C.** Characterization of Bartonella clarridgeiae flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. *J. Clin. Microbiol.* 2000, pp. 2943-2948.
43. **Welch, D.F., Pickett, D.A., Slater, L.N., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J.** Rochalimaea henselae sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992, pp. 275-280.
44. *Clinical manifestation in human and animals. Update on Clinical Aspects of Bartonella Infection In Humans.* **Koehler, J.E.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
45. **Brenner, D.J., O'Connor, S.P., Winkler, H.H., Steigerwalt, A.G.** Proposals to unify the genera Bartonella and Rochalimaea, with descriptions of Bartonella quintana comb. nov., Bartonella vinsonii comb. nov., Bartonella henselae comb. nov., and Bartonella elizabethae comb. nov., and to remove the family Bartonellace. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 1993, Vol. 43, pp. 777-786.
46. **Birtles, R.J., Harrison, T.G., Saunders, N.A., Molyneux, D.H.** Proposals to unify the genera Grahamella and Bartonella, with descriptions of Bartonella talpae comb. nov., Bartonella peromysci comb. nov., and three new species, Bartonella grahamii sp. nov., Bartonella taylorii sp. nov., and Bartonella doshiae sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, Vol. 45, pp. 1-8.

47. **Joblet, C., Roux, V., Drancourt, M., Gouvernet, J., Raoult, D.** Identification of Bartonella (Rochalimaea) species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate-synthase gene. *J. Clin. Microbiol.* 1995, Vol. 33, pp. 1879-1883.
48. **Regnery, R.L., Anderson, B.E., Clarridge J.E., Rodriguez-Barradas, M.C., Jones, D.C., Carr, J.H.** Characterization of a novel Rochalimaea species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.* 1992, Vol. 30, pp. 265-274.
49. **Kordick, D.L., Swaminathan, B., Greene, C.E., Wilson, K.H., Whitney, A.M., O'Connor, S., Hollis, D.G., Matar, G.M., Steigerwalt, A.G., Malcolm, G.B., Hayes, P.S., Hadfield, T.L., Breitschwerdt, E.B., Brenner, D.J.** Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii subsp. nov., isolated from dogs; Bartonella vinsonii subsp. vinsonii; and emended description of Bartonella vinsonii. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996, Vol. 46, pp. 704-709.
50. **Pappalardo, B.L., Correa, M.T., York, C.C., Peat, C.Y., Breitschwerdt, E.B.** Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to Bartonella vinsonii in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1997, Vol. 58, pp. 467-471.
51. **Lawson, P.A., Collins, M.D.** Description of Bartonella clarridgeiae sp. nov. isolated from the cat of a patient with Bartonella henselae septicemia. *Med. Microbiol. Lett.* 1996, pp. 64-73.
52. **Welch, D.F., Carroll, K.C., Hofmeister, E.K., Persing, D.H., Robinson, D.A., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J.** Isolation of a new subspecies, Bartonella vinsonii subsp. arupensis, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with borrelia burgdorferi and babesia microti among naturally infected mice. *J. Clin. Microbiol.* 1999, Vol. 37, pp. 2598-2601.
53. **Dehio, C., Lanz, C., Pohl, R., Behrens, P., Bermond, D., Piemont Y., Pelz, K. and Sander, A.** Description of a new Bartonella species, Bartonella schoenbuchii sp. nov., isolated from blood of wild roe deer. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 2001, Vol. 51, pp. 1557-1565.
54. **Bermond, D., Boulouis, H.J., Heller, R., van Laere G., Dehio, C., Monteil, H., Chomel, B.B., Sander, A. et Piemont, Y.** Bartonella bovis Bermond et al. sp. nov. and Bartonella capreoli sp. nov., isolated from European ruminants. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 2002, Vol. 52, pp. 383-390.
55. **Maillard, R., Riegel, P., Barrat, F., Bouillin, C., Thibault, D., Gandoin, C., Halos, L., Demanche, C., Alliot, A., Guillot, J., Piémont, Y., Boulouis, H.J. and Vayssier-Taussat,**

- M. Bartonella chomelii** sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, Vol. 54, pp. 215-220.
56. **Gundi, V.A.K.B., Taylor, C., Raoult, D. and La Scola, B.** *Bartonella rattaaustraliani* sp. nov., *Bartonella queenslandensis* sp. nov. and *Bartonella coopersplainsensis* sp. nov., identified in Australian rats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009, Vol. 59, pp. 2956-2961.
57. **Inoue, K., Kabeya, H., Shiratori, H., Ueda, K., Kosoy, M.Y., Chomel, B.B., Boulouis, H.J. and Maruyama, S.** *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from Apodemus mice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, Vol. 60, pp. 759-763.
58. **Eremeeva, M.E., Gerns, H.L., Lydy, S.L., Goo, J.S., Ryan, E.T., Mathew, S.S., Ferraro, M.J., Holden, J.M., Nicholson, W.L., Dasch, G.A. and Koehler, J.E.** Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. *N. Engl. J. Med.* 2007, Vol. 356, pp. 2381-2387.
59. *Genome and Evolution.* **Kirby, J.E.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. p. 86.
60. *Characterization of pathogenicity and ecology of Bartonella species through whole genome sequence analysis.* **Kirby, J. E., Kosoy, M.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. p. 86.
61. **Birtles, R.J. and Raoult, D.** Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol.* 1996, Vol. 46, pp. 891-897.
62. **La Scola, B., Zeaiter, Z., Khamis, A. and Raoult, D.** Gene-sequence based criteria for species definition in bacteriology. *Trends Microbiol.* 2003, Vol. 11, pp. 318-321.
63. **Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V. and Raoult, D.** Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* 2001, Vol. 39, pp. 430-437.
64. **Teyssier, C., Marchandin, H., Masnou, A.J.L. Jeannot, M.S.** Pulsed-field gel electrophoresis to study the diversity of whole-genome organization in the genus *Ochrobactrum*. *Electrophoresis.* 2005, Vol. 26, pp. 2898-2907.
65. **Alsmark, C.M., Frank, A. C., Karlberg, E. O., Legault, B. A., Ardell, D. H., Canback, B., Eriksson, A. S., Naslund, A. K., Handley, S. A., Huvet, M., La Scola, B., Holmberg, M. and Andersson, S. G.** The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci.* 2004, Vol. 101, pp. 9716-9721.

66. **Saenz, H.L., Engel, P., Stoeckli, M.C., Lanz, C., Raddatz, G., Vayssier- Taussat, M., Birtles, R., Schuster, S.C. and Dehio, C.** Genomic analysis of Bartonella identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. *Nat Genet.* 2007, Vol. 39, pp. 1469-1476.
67. **Anderson, B., Goldsmith, C., Johnson, A., Padmalayam, I. and Baumstark, B.** Bacteriophage-like particle of Rochalimaea henselae. *Mol Microbiol.* 1994, Vol. 13, pp. 67-73.
68. **Barbian, K.D. and Minnick, M. F.** A bacteriophage-like particle from Bartonella bacilliformis. *Microbiology.* 2000, Vol. 146, pp. 599-609.
69. **Maggi, R.G. and E.B. Breitschwerdt.** Isolation of bacteriophages from Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii and the characterization of Pap31 gene sequences from bacterial and phage DNA. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2005, Vol. 9, pp. 44-51.
70. **Umemori, E., Sasaki, Y., Amano, K.** A phage in Bartonella bacilliformis. *Microbiol Immunol.* 1992, Vol. 36, pp. 731-736.
71. **Arvand, M., Feil, E. J., Giladi, M., Boulouis, H. J. and Viezens, J.** Multilocus sequence typing of Bartonella henselae isolates from three continents reveals hypervirulent and feline-associated clones. *PLoS ONE.* 2007, Vol. 2, p. e1346.
72. **Iredell, J., Blanckenberg, D., Arvand, M., Grauling, S., Feil, E.J. and Birtles, R. J.** characterization of the natural population of Bartonella henselae by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2003, Vol. 41, pp. 5071- 507.
73. **Lindroos, H., Vinnere, O., Mira, A., Repsilber, D., Naslund, K. and Andersson, S.G.** Genome rearrangements, deletions, and amplifications in the natural population of Bartonella henselae. *J Bacteriol.* 2006, Vol. 188, pp. 7426- 7439.
74. **Li, W., Chomel, B.B., Maruyama, S., Guptil, L., Sander, A., Raoult, D. and Fournier, P.E.** Multispacer typing to study the genotypic distribution of Bartonella henselae populations. *J Clin Microbiol.* 2006, Vol. 44, pp. 2499-2506.
75. **Foucault, C., La Scola, B., Lindroos, H., Andersson, S. G. and Raoult, D.** Multispacer typing technique for sequence-based typing of Bartonella quintana. *J Clin Microbiol.* 2005, Vol. 43, pp. 41-48.
76. **Woolley, M.W., Gordon, D.L. and Wetherall, B.L.** Analysis of the first Australian strains of Bartonella quintana reveals unique genotypes. *J Clin Microbiol.* 2007, Vol. 45, pp. 2040-2043.
77. **Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H. and Maruyama, S.** Evolutional and geographical relationships of Bartonella grahamii isolates

- from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. *Microb Ecol.* 2009, Vol. 57, pp. 534-541.
78. **Vayssier-Taussat, M., Le Rhun, D., Deng, H.K., Biville, F., Cescau, S., Danchin, A., Marignac, G., Lenaour, E., Boulouis, H.J., Mavris, M., Arnaud, L., Yang, H., Wang, J., Quebatte, M., Engel, P., Saenz, H., Dehio, C.** The Trw Type IV Secretion System of *Bartonella* Mediates Host-Specific Adhesion to Erythrocytes. *PLoS Pathog.* 2010, Vol. 6.
79. **Deng, H., Le Rhun, D.C., Cotte, V., Buffet, J.P., Read, A., Birtles, R.J. and Vayssier-Taussat, M.** Strategies of exploitation of mammalian reservoirs by *Bartonella* species. *Vet Res.* 2012, Vol. 43 (1), p. 15.
80. *Specificity and diversification: new insight into biology and evolution of Bartonella effector proteins.* **Harms, A., Goepfert, A., Stanger, F., Engel, P., Schirmer, T. and Dehio, C.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. p. 86.
81. **Schmid, M.C., Scheidegger, F., Dehio, M., Balmelle-Devaux, N, Schulein, R., Guye, P, Chennakesava, C.S., Biedermann, B. and Dehio, C.** A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS Pathog.* 2006, Vol. 2. e115.
82. **Schmid, M.C., Schulein, R., Dehio, M., Denecker, G., Carena, I. and Dehio, C.** The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol Microbiol.* 2004, Vol. 52, p. 81.
83. **Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C., Carena, I. and Dehio, C.** A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2005, Vol. 102, pp. 856-861.
84. **Frank, A.C., Alsmark, C.M., Tholleson, M. and Andersson, S.G.** Functional divergence and horizontal transfer of type IV secretion systems. *Mol Biol Evol.* 2005, Vol. 22, pp. 1325-1336.
85. **Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F., and Dehio, C.** A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol.* 2003, Vol. 49, pp. 1253-1266.
86. **Nystedt, B., Frank, A.C., Tholleson, M. and Andersson, S.G.** Diversifying selection and concerted evolution of a type IV secretion system in *Bartonella*. *Mol Biol Evol.* 2008, Vol. 25, pp. 287-300.

87. **Dehio, C.** Infection-associated type IV secretion systems of Bartonella and their diverse roles in host. *Vet. Res.* 2009, Vol. 40, p. 29. B.B. Chomel et al. Page 18 of 22 (page number not for citation purpose).cell interaction, *Cell. Microbiol.* (2008) 10: 1591–1598.
88. **Ljungh, A., Wadstrom, T.** Binding of extracellular matrix proteins. [éd.] Academic Press. *Enzymology, Methods in.* 1995, Vol. 253, pp. 501–515.
89. **Roux, V., Raoult, D.** Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. *J. Clin. Microbiol.* 1999, pp. 596-599.
90. **Euzéby, J.P.** Bartonella. *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.* [En ligne] <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bartonella.html>.
91. **Liang, Z., Raoult, D.** Differentiation of Bartonella species by microimmunofluorescence assay, sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis, and Western immunoblotting. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000, Vol. 7 (4), pp. 617-624.
92. **Sweger, D., Resto-Ruiz, S., Johnson, D.P., Schmieder, M., Hawke, N., Anderson, B.** Conservation of the 17-kilodalton antigen gene within the genus Bartonella. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000, pp. 251-257.
93. **Mainardi, J.L., Figliani, C., Goldstein, F.W., Blanche, P., Baretrigoulet, M., Galezowski, N., Fournier, P.E., Raoult, D.** Cat-scratch disease due to Bartonella henselae serotype Marseille (Swiss cat and seronegative patient). *J. Clin. Microbiol.* 1998, Vol. 36, p. 2800.
94. Maladies infectieuses. [En ligne] Ben Brown Online Ministries, 2004. http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/portail2/index.php?option=com_content&task=view&id=71&Itemid=44.
95. **Minnick, M.F.** Identification of Bartonella using PCR : genus and species- specific primer sets. *J. Mic. Meth.* 1997, Vol. 31, pp. 51-57.
96. **Bouchouicha, R.** *Etude épidémiologique et phylogénétique chez Bartonella henselae par la technique MLVA.(Thèse).* 2010. AgroParisTech..
97. **Rolain, J.M., Fournier, P.E., Raoult, D., Bonerandt, J.J.** First isolation and detection by immunofluorescence assay of Bartonella Koehlerae in erythrocytes from a French cat. *J. Clin Microbiol.* 2003, Vol. 41, pp. 4001-4002.
98. **Holmberg, M., McGill, S., Ehrenborg, C., Wesslén, L., Hjelm, E., Darelid, J., Blad, L., Engstrand, L., Regnery, R., Friman, G.** Evaluation of human seroreactivity to Bartonella species in Sweden. *J Clin Microbiol.* 1999, Vol. 37(5), pp. 1381-4.
99. **Houpikian, P., Raoult, D.** 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of Bartonella species. 2001, Vol. 39(8), pp. 2768- 78.

100. **Roux, V., Raoult, D.** The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of Bartonella (Rochalimaea) species is longer than usually described in other bacteria. *NEJM's*. 1995, Vol. 156 (1), pp. 107-11.
101. **Bereswill, S., Hinkelmann, S., Kist, M., Sander, A.** Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in Bartonella henselae and use of the ribC gene for differentiation of Bartonella species by PCR. *J Clin Microbiol*. 1999, Vol. 37(10), pp. 3159-66.
102. **Johnson, G., Ayers, M., McClure, S.C., Richardson, S.E., Tellier, R.** Detection and identification of Bartonella species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (ribC). *J Clin Microbiol*. 2003, Vol. 41, pp. 1069- 1072.
103. **Zeaiter, Z., Fournier, P.E., Ogata, H. and Raoult, D.** Phylogenetic classification of Bartonella species by comparing groEL sequences. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol*. 2002, Vol. 52, pp. 165-171.
104. **Zeaiter, Z., Liang, Z., Raoult, D.** Genetic classification and differentiation of Bartonella species based on comparison of partial ftsZ gene sequences. *J Clin Microbiol*. 2002, Vol. 40(10), pp. 3641-7.
105. **Ehrenborg, C., Wesslen, L., Jakobson, A., Friman, G., Holmberg, M.** Sequence variation in the fts Z gene of Bartonella henselae isolates and clinical samples. *J. Clin. Microbiol*. 2000, pp. 682-687.
106. **Doern, G.V.** Detection of fastidious bacteria. *Clin. Inf. Dis*. 2000, Vol. 30, pp. 166-173.
107. **Drancourt, M.** Tropheryma whippelii, pathogène émergent à culture intracellulaire responsable de la maladie de Whipple. *La Presse Médicale*. 1999, Vol. 8, pp. 435-439.
108. **Resto-Ruiz, S.I., Sweger, D., Widen, R. H., Valkov, N., Anderson, B.E.** Transcriptional activation of the htrA (high temperature requirement A) gene from Bartonella henselae. *Inf. and Imm*. 2000, Vol. 68 (10), pp. 5970-5978.
109. **Del Prete, R., Fumarola, D., Ungari, S., Fumarola, L. and Miragliotta, G.** Polymerase chain reaction detection of Bartonella henselae bacteraemia in an immunocompetent child with cat-scratch disease. *Eur. J. Pediatr*. 2000, Vol. 159, pp. 356-359.
110. **Sander, A., Posselt, M., Boehm, N., Ruess M., Altwegg, M.** Detection of Bartonella henselae DNA by two different PCR assays and determination of the genotype in histologically defined cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol*. 1999, Vol. 37, pp. 993-997.
111. **Diederer, B.M., Vermeulen ,M.J., Verbakel, H., van der Zee, A., Bergmans, A. and Peeters, M.F.** Evaluation of an internally controlled real-time polymerase chain reaction

assay targeting the groEL gene for the detection of Bartonella spp. DNA in patients with suspected cat-scratch disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007, Vol. 26(9), pp. 629-33.

112. **Kelly, T.M., Padmalayam, I., Baumstark, B.R.** Use of the cell division protein ftsZ as a means of differentiating among Bartonella species. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998, pp. 766-772.

113. **Bajer, A., Pawelczyk, A., Behnke, J. M., Gilbert, F. S. and Sinski, S.** Factors affecting the component community structure of haemoparasites in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology.* 2001, Vol. 122, pp. 43-54.

114. **Hsieh, J.W., Tung, K.C., Chen, W.C, Lin, J.W., Chien, L.J., Hsu, Y.M., Wang, H.C., Chomel, B.B. and Chang, C.C.** *Epidemiology of Bartonella Infection in Rodents and Shrews in Taiwan.* s.l. : Zoonoses Public Health, 2009.

115. **Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Yamada, N., Ohashi, N., Sato, Y., Yukawa, M., Masuzawa, T., Kawamori, F., Kadosaka, T., Takada, N., Fujita, H. and Kawabata, H.** prevalence and genetic diversity of Bartonella species isolated from wild rodents in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2008, Vol. 74, pp. 5086-5092.

116. **Jardine, C., Appleyard, G., Kosoy, M.Y., McColl, D., Chirino-Trejo, M., Wobeser, G. and Leighton, F.A.** Rodent-associated Bartonella in Saskatchewan, Canada. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2005, Vol. 5, pp. 402-409.

117. **Knap, N., Duh, D., Birtles, R., Trilar, T., Petrovec, M. and Avsic-Zupanc, T.** molecular detection of Bartonella species infecting rodents in Slovenia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007, Vol. 50, pp. 45-50.

118. **Kosoy, M., Mandel, M., Green, D., Marston, E. and Childs, J.** Prospective studies of Bartonella of rodents. Part I. Demographic and temporal patterns in population dynamics. *vector Borne Zoonotic Dis.* 2004, Vol. 4, pp. 285-295.

119. **Telfer, S., Begon, M., Bennett, M., Bown, K.J., Burthe, S., Lambin, X., Telford, G. and Birtles, R.** Contrasting dynamics of Bartonella spp. In cyclic field vole populations: the impact of vector and host dynamics. *Parasitology.* 2007, Vol. 134, pp. 413-425.

120. **Pretorius, A.M., Beati, L. and Birtles, R.J.** Diversity of bartonellae associated with small mammals inhabiting Free State province, South Africa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004, Vol. 54, pp. 1959-1967.

121. **Winoto, I.L., Goethert, H., Ibrahim, I.N., Yuniherlina, I., Stoops, C., Susanti, I., Kania, W., Maguire, J.D., Bangs, M.J., Telford, S.R.3rd, and Wongsrichanalai, C.**

Bartonella species in rodents and shrews in the greater Jakarta area. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005, Vol. 36, pp. 1523-1529.

122. **Mediannikov, O., Ivanov, L., Zdanovskaya, N., Vysochina, N., Fournier, P.E., Tarasevich, I. and Raoult, D.** Molecular screening of Bartonella species in rodents from the Russian Far East. *Ann N Y Acad Sci*. 2005, Vol. 1063, pp. 308-311.

123. *Bartonella Prevalence in Three Invasive Rattus Species From Urban, Periurban and Rural South Africa.* **Brettschneider, H., Mostert, M.E., Chimimba, C.T. et Bastos, A.D.S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th international Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.

124. **Bitam, I., Rolain, J.M., Kernif, T., Baziz, B., Parola, P. and Raoult, D.** Bartonella species detected in rodents and hedgehogs from Algeria. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*. 2008.

125. **Kosoy, M.Y., Regnery, R.L., Kosaya, O.I., Jones, D.C., Marston, E.L. and Childs, J.E.** Isolation of Bartonella spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. *J. Wildlife Diseases*. 1998, Vol. 34, pp. 305-309.

126. *Identification of Animal Reservoir of Bartonella Species in Guatemala.* **Daniel, L., Garcia, Ying Bai, Alvarez, D., Moran, D., Renee Lopez, M. etl Kosoy, M.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th international Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.

127. **Heller, R., Bermond, D., Delacour G., Boulouis, H.J., Chomel, B. and Piemont Y.** Distribution of Bartonella in European wild mammals. *J. Microbiol. Methods*. 1999, pp. 279-280. 1st International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens.“ Tübingen, Germany. March 5-7, 1999.

128. **Duncan, A.W., Maggi, R.G. and Breitschwerdt, E.B.** Bartonella DNA in dog saliva. *Emerg Infect Dis*. 2007, Vol. 13 (12), pp. 1948 – 1950.

129. **Donatien, A., Lestoquard, F.** Sur une Bartonella nouvelle du boeuf, Bartonella bovis sp. *Bull. Soc. Path. Ex*. 1934, Vol. 7, pp. 652-654.

130. **Pollard, M., Parmer, D. G.** Observations on a Bartonella organism in cattle. *Tex. Ref. Biol. Med*. 1952, Vol. 10, pp. 73-75.

131. *Investigation of Bartonella infections in domestic ruminants and identification of bovis in Zebu cattle and water Buffalo from rural Thailand.* **Boomar, S., Sawat-Wong, P., Peruski, L., Fanan, Suksawat, Chanlan, A., Bai, Y., Osikowicz, L., Kosoy, M. and Maloney, S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.

132. **Boulouis, H.J., Chang, C. C., Henn, J. B., Kasten, R. V. and Chomel, B. B.** Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections. *Vet Res.* 2005, Vol. 36, pp. 383-410.
133. *Variability of Bartonella henselae in the feline population of northern Spain.* **Gil, H., Escudero, R., Pons, I., Rodriguez-Vargas, M., Garcia-Amil, C., Lobo, B., Rodriguez-Moreno, I., Jado, I., Jimenez, S., Perez, A. and Anda, P.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
134. **Maruyama, S., Tanaka S., Sakai T., Katsube Y.** Prevalence of Bartonella species among pet cats in Japan. *J. Microbiol. Methods.* 1999, pp. 284-285. 1st International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens.“ Tübingen, Germany.March 5-7, 1999.
135. **Arvand, M., Klose, A.J., Schwarz-Porsche, D., Hahn, H., Wendt, C.** Genetic variability and Prevalence of Bartonella henselae in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic to humans. *J. Clin. Microbiol.* 2001, Vol. 39, pp. 743-746.
136. **Kordick, D.L., Breitschwerdt, E.B.** Persistent infection of pets within a household with three Bartonella species. *Emerg. Infect. Dis.* 1998, Vol. 4, pp. 325-328.
137. **Heller, R., Artois, M., Xémar, V., De Briel, D., Géhin, H., Jaulhac, B., Monteil, H., Piémont, Y.** Prevalence of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae in stray cats. *J. Clin. Microbiol.* 1997, Vol. 35, pp. 1327-1331.
138. **Chomel B.B., Carlos E.T., Kasten R.W., Yamamoto K., Chang C-C., Carlos R.S., Abenes M.V., Pajares C.M.** *Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae infection in domestic cats from the Philippines.* s.l. : Am. J. Trop. Med. Hyg., 1999. Vol. 60. 593-597.
139. **Marston E.L., Finkel B., Regnery R.L., Winoto I.L., Ross Graham R., Wignal S., Simanjuntak G., Olson J.O.** Prevalence of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae in an urban Indonesian cat population. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999, Vol. 6, pp. 41-44.
140. **Chomel B.B., Kasten R.W., Yamamoto K., Chang C., Honadel T.E., Kikuchi Y.** Epidemiology of Bartonella infections in domestic and wild carnivores and ruminants. *J. Microbiol. Methods,* 1999, 280-281. 1st International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens.“ Tübingen, Germany. March 5-7, 1999.
141. **Kernif, T., Aissi, M., Doumandji, S.-E., Chomel, B.B., Raoult, D.and Bitam, I.** Molecular Evidence of Bartonella Infection in Domestic Dogs from Algeria, North Africa, by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010, Vol. 83(2), pp. 298–300.

142. *Bartonella* spp. Infection in domestic dogs, jackals and red foxes in Iraq. **Chomel, B. B., McMillan-Cole, A. C., Kasten, R. C., Stuckey, M. J., Sato, S., Maruyama, S., Diniz P. P. V. P. and Breitschwerdt, E. B.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
143. **Adelson, M. E., Rao, R. V., Tilton, R. C., Cabets, K., Eskow, E., Fein, L., Occi, J. L. and Mordechai, E.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. *J Clin Microbiol.* 2004, Vol. 42, pp. 2799-2801.
144. **Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B. and Raoult, D.** Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. 2003, pp. 338-342.
145. **Dehio, C., Sauder, U. and Hiestand, R.** Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. *J Clin Microbiol.* 2004, Vol. 42, pp. 5320-5323.
146. **Abbot, P., Aviles, A. E., Eller, L. and Durden, L. A.** Mixed infections, cryptic diversity, and vector-borne pathogens: evidence from *Polygenis* fleas and *Bartonella* species. 2007, Vol. 73, pp. 6045-6052.
147. *Molecular detection and identification of Bartonella species in rat fleas from northeastern Thailand.* **Billeter, S.A., Colton SomboomSangmaneedet, L., Suksawat, F., Evans, B.E. et Kosoy, M.Y.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
148. *Disparity between Bartonella species detected in Rattus norvegicus and their respective fleas from Los Angeles, California.* **Billeter, S.A., Gundi, V.A.K.B., Rood, M.P. and Kosy, M.Y.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
149. **Boulouis, H. J., Marignac, G., Haddad, N., Maillard, R. et Chomel, B.** Les animaux réservoirs et victimes de *Bartonella*. *Bull. Acad. Vét.* 2008, Vol. 161 (3), pp. 211 – 220.
150. **Breitschwerdt, E. B., Sontakke, S., Cannedy, A., Hancock, S. I. and Bradley, J. M.** Infection with *Bartonella weissii* and detection of *Nanobacterium* antigens in a North Carolina beef herd. *J. Clin. Microbiol.* 2001, Vol. 39, pp. 879-882.
151. **Yamamoto, K., Chomel, B.B., Lowenstine, L.J., Kikuchi, Y., Phillips, L.G., Barr, B.C., Swift, P.K., Jones, K.R., Riley, S.P.D., Kasten, R.W., Foley, J.E., Pedersen, N.C.** *Bartonella henselae* antibody prevalence in free-ranging and captive wild felids from California. *J. Wildlife Diseases.* 1998, Vol. 34, pp. 56-63.

152. *Bartonella* in wildlife. **Chomel, Bruno B.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
153. **Fournier, P.E., Taylor, C., Rolain, J.M. Barrassi, L., Smith, G. and Raoult, D.** Bartonella australis sp. nov. from kangaroos, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2007, Vol. 13, pp. 1961-1962.
154. *Bartonella* infection in a mother and son from Kentucky exposed to wood louse Hunter spiders. **Mascarelli, P.E., Bradely, J.M., Trull, C., Maggi, R.G. and Breitschwerdt, E.B.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
155. *Diversity of Bartonella species within a rodent population in a french periurban forest, the Senat forest.* **Buffer, J.P., Chapuis, J.L., Pisanu, B., Le Rhun, D., Hales, L. and Vayssier-Taussat, M.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
156. *Infection of the Cape Dune Mole, Bathyeergus suillus: Implication for Zoonosis.* **VanSandwyk, J.H.T., Harrisson, A., Bennett, N.C. et Bastos, A.D.S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
157. *Bartonella grahamii Korean isolates.* **Ko, S., Kim, S.-J., Kang, J.-G., Won, S.-H., Kim, H.-C., Klein, T.A., Choi, K.-S., Hwa-Young et Chae J.,-S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
158. **Bai, Y., Kosoy, M., Recuenco, S., Alvarez, D., Moran, D. et Turmelle, A.** Bartonella spp. in bats, Guatemala. *Emerg Infect Dis.* 2011, Vol. 17 (7), pp. 1269 - 1272.
159. *Bartonella henselae : first case of scratch disease , confirmed by molecular analysis, in an aids patient in the state of Rio de Janeiro, Brazil.* **Favocho, A. R. M., Kitada, A. A. B., Roger, I., Varon, A., Gomes, R., Pessoa Jr. A. A., Barreira, J. D., Pereira, S. A. et Lemos, E. R. S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
160. *Serological analysis for Bartonellosis in cats with sporotrichosis patient in the state of Rio de Janeiro, Brazil.* **Kitada, A. A. B., Favocho, A. R. M., Pessoa Jr. A. A., Gomes, R., Honse, R. O., Lemos, E. R. S. et Pereira, S. O.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
161. *Prevalance of Bartonella spp. In suspected cases of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil.* **Favocho, A. R. M., Kitada, A. A. R., Pereira, S. A., Pessoa Jr. A. A., Almeida, E.**

- B., Gomes, R., Barros, M. B., Schubach, A. O. et Lemos, E. R. S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
162. **Higgins, R.** Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Rev sci tech Off in. Epiz.* 2004, Vol. 23 (2), pp. 569-581.
163. **Breitschwerdt, E. B., Kordick, D. L.** Bartonella Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000, Vol. 13 (3), pp. 428-438.
164. **Mosbacher, M.E., Klotz, S., Klotz, J., Pinnas, J.L.** Bartonella henselae and the Potential for Arthropod Vector-Borne Transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011, Vol. 11 (5), pp. 471 - 477.
165. **Karbowiak, G., Rychlik, L., Nowakowski, W., Wita, I.** Natural infections of small mammals with blood parasites on the borderland of boreal and temperate forest zones. *Acta Theriologica.* 2005, Vol. 50 (1), pp. 31-42.
166. **Kröber T, Guerin P.** *The Tick Blood Meal: From a Living Animal or from a Silicone Membrane?* s.l. : Altex 24 Special issue, 2007. pp. 39 - 41.
167. **Telford, S.R. III, Wormser, G.P.** Bartonella spp. transmission by ticks not established. *Emerg Infect Dis.* 2010, Vol. 16 (3), pp. 385 - 384.
168. **Angelakis, E., Billeter, S. A., Breitschwerdt, E. B., Chomel, B. B. et Raoult D.** Potential for tick-borne bartonellosis. *Emerg Infect Dis.* 2010, Vol. 16 (3), pp. 379 - 381.
169. **Reis, C., Cote, M., Le Rhun D., Lecuelle, B., Levin, M.L., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S.I.** Vector competence of the tick Ixodes ricinus for transmission of Bartonella birtlesii. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011, Vol. 5(5). e1186. Epub 2011 May 31..
170. **Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Beugnet, F., Le Menach, A., Boulouis, H.J., Vayssier-Taussiat, M.** Evidence of Bartonella sp. in questing adult and nymphal Ixodes ricinus ticks from France and co-infection with Borrelia burgdorferi sensu lato and Babesia sp. *Vet. Res.* 2005, Vol. 36, pp. 79-87.
171. **Halos, L., Mavris, M., Vourc'h, G., Maillard, R., Barnouin, J., Boulouis, H.J. and Vayssier-Taussat, M.** Broad-range PCR-TTGE for the first-line detection of bacterial pathogen DNA in ticks. *Vet Res.* 2006, Vol. 37 (2), pp. 245 - 53.
172. **Levin, M.L., Fish, D.** *Infect. Immun.* 2000, Vol. 68, pp. 2183- 2186.

173. **Aeschlimann, A., Burgdorfer, W., Matile, H., Peter, O., Wyler, R.** New aspects of the part of the vector played by *Ixodes ricinus* L. in Switzerland. Preliminary note. *Acta Trop.* 1979, Vol. 36(2), pp. 181-91.
174. **Estrada Peña, A., Jongejan, F.** Ticks feeding on humans: a review of records human-biting Ixodoidea with special reference pathogen transmission. *Exp Appl Acarol.* 1999, Vol. 23, pp. 685-715, 19.
175. **Nijhof, A.M., Bodaan, C., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F., Jongejan, F.** Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007, Vol. 7 (4), pp. 585 - 95.
176. **van Overbeek, L., Gassner, F., van der Plas, C.L., Kastelein, P., Nunes-da Rocha, U., Takken, W.** Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008, Vol. 66 (1), pp. 72-84. Résumé.
177. **Pichon, B., Kahl, O., Hammer, B., Gray, J.S.** Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006, Vol. 6 (4), pp. 382 - 7.
178. **Sekeyova, Z., Subramanian, G., Mediannikov, O., Diaz, M.Q., Nyitraya, A., Blaskovicova, H., Raoult, D.** Evaluation of clinical specimens for *Rickettsia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Anaplasma*, *Franciscella* and *Diplorickettsia* positivity using serological and molecular biology methods. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012, Vol. 64 (1), pp. 82-91.
179. **Sanogo, Y, Zeaiter, Z, Caruso, G, et al.** *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari : Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2003, Vol. 9, pp. 329-32.
180. **Billeter, S. A., Levy, M. G., Chomel, B. B., Breitschwerdt, E. B.** Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol.* 2008, Vol. 22 (1), pp. 1-15.
181. **Chomel B.B., Kasten R.W., Floyed-Hawkins K., Chi-Yamamoto B., Roberts-Wilson J., Gurfield A.N., Abbott R.C., Pedersen N.C., Koehler J.E.** Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. 1996, Vol. 34, 1952-1956.
182. **Koehler, J.E., Glaser, C.A., Tappero, J.W.** *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as a reservoir. *JAMA* 271. 1994, pp. 531-535.
183. **La Scola, B., Davoust, B., Boni, M. and Raoult, D.** Lack of correlation between *Bartonella* DNA detection within fleas, serological results, and results of blood culture in a *Bartonella*- infected stray cat population. *Clin Microbiol Infect.* 2002, Vol. 8, pp. 345-51.

184. **Parola, P., Sanogo, Y., Lerdtusnee, K., et Coll.** Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in fleas from the Thai-Myanmar border. *Ann N Y Acad Sci.* 2003, Vol. 990, pp. 173-81.
185. **Kelly, P.J., Meads, N., Theobald, A. et Coll.** *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 2004, Vol. 10, pp. 967-8.
186. **Lappin, M.R., Griffin, B., Brunt, J. et Coll.** Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, Ehrlichia species, Anaplasma phagocytophilum, and Neorickettsia risticii DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg.* 2005.
187. **Shaw, S.E., Kenny, M.J., Tasker, S., Birtles, R.J.** Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouche) in the United Kingdom. *Vet Microbiol.* 2004, Vol. 102, pp. 183-8.
188. **Rolain, J.M., Bourry, O., Davoust, B., Raoult, D.** *Bartonella quintana* and *Rickettsia felis* in Gabon. *Emerg Infect Dis.* 2005, Vol. 11, pp. 1742-4.
189. **Marié, J.L., Fournier, .PE., Rolain, J.M. et Coll.** Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. doshiae*, *B. taylorii*, and *Rickettsia felis* in rodent fleas collected in Kabul, Afghanistan. *Am J Trop Med Hyg.* 2006. (in press).
190. **Avidor, B., Graidy, M., Efrat, G. et Coll.** *Bartonella koehlerae*, a new cat- associated agent of culture- negative human endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2004, Vol. 42, pp. 3462- 8.
191. **Bown, K. J., Bennet, M., Begon, M.** Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerg Infect Dis.* 2004, Vol. 10, pp. 684- 7.
192. **Daly, J.S., Worthingto, M.G., Brenner, D.J. AND Coll.** *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1993, Vol. 31, pp. 872- 81.
193. *Transmission of Bartonella species OE 1-1 to Mariones crassus jirds by Xenopsylla ramesis fleas.* **Harrus, S., Morick, D., Khokhlova, I.S., Krasnov, B.** raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. p. 86.
194. *Bartonella henselae* SA2 infection in an owner and two papillon dogs exposed to tropical rat mites (*Ornithonyssus bacoti*). **Mascareli, P.E., Bradley, J.M., Maggi, R.G. and Breitschwerdt, E.B.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human pathogens. p. 86.
195. **Brinkerhoff, R. J et Kabeya, H., Inoue, K., Bai ,Y., Maruyama, S.** Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and reproductive tissues of fleas collected from sympatric mammals. *SME J.* 2010, Vol. 4 (7), pp. 955-8.

196. **Maggi, R.G., Kosoy, M., Mintzer M., Breitschwerdt, E.B.** Isolation of *Candidatus Bartonella melophagi* from human blood. *Emerg Infect Dis.* 2009, Vol. 1 (1), pp. 66 - 68.
197. **Doring, G., Unertl, K. and Heininger, A.** Validation criteria for nucleic acid amplification techniques for bacterial infections. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008, Vol. 46, pp. 909-918. [PubMed].
198. **Becker, Cl. et Pérez-Eid, M.** Transmission vectorielle. *Health On the Net Foundation's MedHunt*. [En ligne] <http://www.maladies-a-tiques.com/Transmission-vectorielle.htm>..
199. **Rodhain, F.** Les maladies à vecteurs. Que sais-je ? *Presses Universitaires de France.* 1999, p. 12.
200. **Rodhain, F, Pérez, C.** *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire.* Maloine, Paris : s.n., 1985.
201. *Bartonella infections in dogs and cats: can they be ticktransmitted? The california experience.* **Chomel, B., Kasten, R.W., Chang, G., Honadel, T.E., Yamamoto, K., McDonald, K.A. et al.** Amsterdam : s.n., 2001. 3rd Meril International Forum on Tick Borne Disease. pp. 40-42.
202. **La Scola, B., Fournier, P. E., Brouqui, P., Raoult, D.** Detection and culture of *Bartonella quintana*, *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter* spp. From decontaminated human body lice. *J. Clin. Microbiol.* 2001, pp. 1707-1709.
203. **Baneth, G., Brietschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Pappalardo, B. et Ryan, J.** A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Vet Parasitol.* 1998, Vol. 74, pp. 133-42.
204. **Hofmeister, E.K., Kolbert, C.P., Abdulkarim, A.S., Magera, J.M.H., Hopkins, M.K., Uhl, J.R. and Ambyaya, A.** Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. *Emerg. Infect. Dis.* 1998, Vol. 177, pp. 409-416.
205. **Hinrichsen, V.L., Whitworth, U.G., Breitschwerdt, E.B., Hegarthy, B.C. and Mather, T.N.** Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organism in dogs. *JAVMA.* 2000, pp. 1092-1097.
206. **Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., Mcpherson, J.T. and Maccormmack J.N.** Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 1999, pp. 2631-2638.

207. **Eskow, E., Rao, R.V.S., Mordechai, E.** Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*. *Arch. Neurol.* 2001, Vol. 58, pp. 1357-1363.
208. **Abbott, R.C., Chomel, B., Kasten, R.W., Flyod-Hawskins, K.A., Kikuchi, Y., Koehler, J.E. and Pedersen, N.C.** Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. 1997, Vol. 20, pp. 41-51.
209. **Bergmans, A.M.C., de Jong, D.M.A., van Amerongen, G., Schot ,C.S. et Schouls, L.M.** Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 1997, Vol. 35, pp. 2256-2261.
210. *The general stress response in Bartonella henselae.* **Tu, N., Smith, L., Stevens, S., Anderson, B.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. p. 86.
211. **Wignall, S.T.** Bartonellosis. *Hunter's tropical medicine.* 1991, pp. 426-9.
212. *Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease.* **Arias-Stella, J., Lieberman, P. H., Erlandson, R. A., Arias-Stella J. Jr.** 1986, *Am J Surg Pathol*, Vol. 10, pp. 595-610.
213. **Dehio, C.** Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annual Review of Microbiology.* 2004, Vol. 58, pp. 365-390.
214. **Maillard, R., Halos, L., Boulouis, H.-J.** Les bartonelloses chez le chat, le chien et les bovins. *Le Point Vétérinaire.* 2005, Vol. 36 (254), pp. 22-27.
215. **Bouloui, H. J., Maillard, R., Halos, L., Vayssier-Taussat, M., Chomel, B.** Zoonoses, les infections à *Bartonella* chez les mammifères. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire.* 2005, Vol. 24, pp. 30-34.
216. *Bartonella henselae* adhesin Bad A negatively effects effector secretion through the *VirB/D4* Type IV secretion system. **Lu, Y.Y., Franz, B., Truttmann, M.C., Riess, T., Faustmann, M., Kempfand, V.A.J., Dehio, C.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. p. 86.
217. *Outer membrane protein 43(OMP43) of Bartonella henselae induces vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) up-regulation in human umbilical vein endothelial cells.* **Kang, J.G., Ko, S., Won, S.H., Youn, H.Y. et Chae J.S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. p. 86.

218. *Functional characterization of the variably expressed outer membrane proteins (VOMP) of Bartonella Quintana.* **Davis, N.J. et Koehler, J.E.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
219. *Adhesins of Bartonella spp. And their role in pathogenicity.* **Kempf, V. A. J.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
220. *Immune response in Bartonella elizabethae infected BALB/c and C57BL/6 mice.* **Kabeya, H., Araki, K., Okamura, T., Bai, Y., Kosoy, M. et Maruyama, S.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
221. *Canine Bartonellosis mimics other tick-borne diseases.* **Perez, P., Diniz, P.p.V.P., EL Pultorak, Maggi, R. G. and Breitschwerdt, E. B.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
222. **Pappalardo, B.L., Brown, T., Gebhardt, D., Sontakke, S., Breitschwerdt, E.B.** Cyclic CD8+ lymphopenia in dogs experimentally infected with Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii. *Vet Immunol Immunopath.* 2000, Vol. 75, pp. 43-57.
223. *In vitro infection of human synoviocytes with Bartonella henselae.* **Cherry, N.A., Nordone, S.K., Breitschwerdt, E.B.** Raleigh, North Carolina, USA : s.n., 2012. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens. p. 86.
224. **Bouloui, H. J., Chomel, B.** Actualités sur les bartonelloses. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.* 1999, Vol. 183 (7), pp. 1399-1412.
225. **Beugnent, F., Boulouis, H. J., Chabanne, L., Clement, M. L., Davoust, B., Haddad, N., Marotel, M. et Vayssier, M.** Approche clinique des maladies vectorielles des carnivores domestiques. *La Dépêche Technique, Supplément technique à la Dépêche Vétérinaire.* Vol. 99, p. 42.
226. **Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J. L., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Latif, A. A., Pegram, R. G., Preston, P. M.** *Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species.* s.l. : Bioscience reports, 2003. ISBN 0-9545173-0-X.
227. **Beaucournu, J.C., Launay, H.** *Les puces (Siphonaptera): De France et du Bassin méditerranéen occidental.* s.l. : Faune de France, 1990. ISBN : 2-903052-10-7.
228. **Pajot, F.-X.** *Les poux (Insecta, anoplura) de la région afrotropicale.* Paris : s.n., 2000. Vol. 37. ISSN : 1286-4994. E ISBN : 2-7099-1456-5.

229. **Satta, G., Chisu, V., Cabras, P., Fois, F. and Masala, G.** Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *J Med Microbiol.* 2011, Vol. 60, pp. 1 63-68.
230. **Psaroulaki, A., Ragiadakou, D., Kouris, G., Papadopoulos, B., Chaniotis, B. & Tselentis, Y.** Ticks, tick-borne rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek island of Cephalonia. *Ann N Y Acad Sci* . 2006, Vol. 1078, pp. 389–399.
231. **Daniel, M., Cerny, V., Dusbabek, F., Honzakova, E. and J. Olejnicek.** Influence of microclimate on the life cycle of the common tick *Ixodes ricinus* (L.) in the thermophilic oak forest. *Folia Parasitol.* 1976, Vol. 23, pp. 327–342.
232. **Poljak, S.C.** *Epidemiologische Studie zu zeckenübertragenen Krankheitserregern in Ixodes ricinus aus bayerischen Parkanlagen.* Giessen, Germany : VVB LAUFERSWEILER VERLAG, 2012. p. 135. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
233. **Pretzmann, G., Radda, A. und Loew, H.** Studien zur Ökologie von *Ixodes ricinus* L. in einem Endemiegebiet der Frühsommermeningoencephalitis (FSME) im Bezirk Neunkirchen (Niederösterreich). *Z Morph Ökol Tiere.* 1964, Vol. 54, pp. 393-413.
234. **Bussieras, J., Chermette, R.** *Parasitologie vétérinaire : entomologie.* s.l. : Maisons Alfort, ENVA, 1991. p. 155.
235. **Genchi, C. and Manfredi, M. T.** Tick species infesting ruminants in Italy: ecological and bio-climatic factors affecting the different regional distribution. *Parassitologia.* 1999, Vol. 41, pp. 41–45.
236. **Yeruham, I., Hadani, A. and Galker, F.** The life cycle of *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1877 (Acarina: ixodidae) under laboratory conditions. *Vet Parasitol.* 2000, Vol. 89, pp. 109–116.
237. **Michaud, O.** Le chasse-insectes dans la maison. [En ligne] 1988. <http://courriel.ville.montreal.qc.ca/insectarium/toile/nouveau/preview.php?s>.
238. Pulicose. [En ligne] <http://www.dermavet.com/modules/atlasparasito/htm/puli/puli.htm>.
239. Les puces. [En ligne] 2005. http://pharmadata.starconet.com/Prints/pdf/Conseils_puces.pdf.
<http://pharmadata.starconet.com/prints/puce.htm>.
240. **Hunter, P. M., Uilenberg, G. et Meyer, G.** *La santé animale. Principales maladies.* France : Quae, c/o Inra, RD10, 2006. p. 303.
241. **Oswald, N.** Determining DNA Concentration & Purity in Tech Tips. [En ligne] MO BIO Laboratories, 2007. <http://nucleicacids.bitesizebio.com/articles/dna-concentration-purity/>.

242. **Maillard, R.** *Infection à Bartonella chez les ruminants : dépistage de la bactériémie et de la présence des bactéries chez les vecteurs potentiels par RFLP. Mémoire de recherche.* 2001.
243. **Schwartz, I., Varde, S., Nadelman, R.B., Wormser, G.P., Fish D.** Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am J Trop Med Hyg.* 1997, Vol. 56(3), pp. 339-342.
244. **Philippe, H., and Douady, C.G.** Horizontal gene transfer and phylogenetics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003, Vol. 6, pp. 498-505. [PubMed].
245. **Berglund, E. C., Frank, A. C., Calteau, A., Vinnere Pettersson, O., Granberg, F., Eriksson, A. S., Naslund, K., Holmberg, M., Lindroos, H. and Andersson, S. G.** Run-off replication of host-adaptability genes is associated with gene transfer agents in the genome of mouse-infecting *Bartonella grahamii*. *PLoS Genet.* 2009, Vol. 5. [PMC free article] [PubMed].
246. **Padmalayam, I., Anderson, B., Kron, M., Kelly, T. and Baumstark, B.** The 75-kilodalton antigen of *Bartonella bacilliformis* is a structural homolog of the cell division protein ftsZ. *J. Bacteriol.* 1997, Vol. 179, pp. 4545-4552. [PMC free article] [PubMed].
247. **Lutkenhaus, J.** FtsZ ring in bacterial cytokinesis. *Mol Microbiol.* 1993, pp. 403-409. [PubMed].
248. **Relman, D.A., Loutit, J.S., Schmidt, T.M., Falkow, S., Tompkins, L.S.** The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med.* 1990, Vol. 323, pp. 1573-1580. [PubMed].
249. **Marston, E. L., Sumner, J.W. and Regnery, R.L.** Evaluation of intraspecies genetic variation within the 60-kDa heat-shock protein gene (groEL) of *Bartonella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, Vol. 49, pp. 1015-1023. [PubMed].
250. **Raoult, D., Aboudharam, G., Crubezy, E., Larrouy, G., Ludes, B. and Drancourt, M.** Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of medieval Black Death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, Vol. 97, pp. 12800-12803. [PMC free article] [PubMed].
251. **Shukla, S.K., Vandermause, M.F., Belongia, E.A., Reed, K.D., Paskewitz, S.M., Kazmierczak, J.** Importance of primer specificity for PCR detection of *Anaplasma phagocytophila* among *Ixodes scapularis* ticks from Wisconsin. *J Clin Microbiol.* 2003, Vol. 41(8), p. 4006.

252. **Courtney, J.W., Kostelnik, L.M., Zeidner, N.S., Massung, R.F.** Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol.* 2004, Vol. 42(7), pp. 3164-3168.
253. **Halos, L.** *Techniques moléculaires de détection de l'ADN d'agents pathogènes dans les tiques (acarien : Ixodidae) : modèle d'arthropodes ectoparasites vecteurs. Mémoire de DEA Biologie, Génétique et Immunologie des infections parasitaires.* 2002.
254. **Parola, P., Shpynov, S., Montoya, M., Lopez, M., Houpikian, P., Zeaiter, Z. et al.** First molecular evidence of new *Bartonella* spp. in fleas and a tick from Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2002, Vol. 67(2), pp. 135–6.
255. **Raoult, D., Roblot, F., Rolain, J.M., Besnier, J.M., Loulergue, J., Bastides, F. et al.** First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2006, Vol. 44, pp. 278–9. Rolain, J.M., Bourry, O., Davoust, B., Raoult, D. First molecular detection of *Bartonella quintana* in *Pulex irritans* fleas from *Cercopithecus cephus* monkey in Gabon. *Emerg Infect Dis* 2005;11(11):1742–4.
256. **L'Hostis, M.** Aspects vétérinaires des maladies transmises par les tiques: exemple de la babésiose bovine. *Méd. Mal. Infect.* 1998, pp. 359-362.
257. **Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., Breitschwerdt, E. B.** Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitol.* 2001, Vol. 17 (2), pp. 74-80.
258. **Maillard, R., Grimard, B., Chastant-Maillard, S, Chomel, B., Delcroix, T., Gandoin, C., Bouilli, C., Halos, L., Vayssier-Taussat, M., Boulouis, H.-J.** Effects of cow age and pregnancy on *Bartonella* infection in a herd of dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006, Vol. 44 (1), pp. 42-46.
259. **Akardjoudj, S., Cossart, A.** Etude de la biologie de l'infection à *Bartonella* de bovins du Pas-De-Calais, Thèse de Doctorat Vétérinaire. 2003, Vol. 61, p. 178.
260. **Delacroix, T., Barbazange, F.** Infection à *Bartonella* dans un élevage bovin laitier des Yvelines ; épidémiologie et conséquences sur la reproduction, Thèse de Doctorat Vétérinaire. 2003, Vol. 4, p. 137.
261. **Kelly, P.J., Davoust, B., Gomez, J., Raoult, D., La Scola, B.** *Bartonella bovis* in cattle in Africa, *Veterinary Microbiology.* 2005, Vol. 105 (2), pp. 155-156.
262. **Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Girard, B., Guillot, J., Chomel B. et coll.** Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. *Applied and Environmental Microbiology.* 2004, Vol. 70 (10), pp. 6302-6305.
263. **Maillard, R., Vayssier-Taussat, M., Bouillin, C., Gandoin, C., Halos, L. Chomel, B., Piemont, Y., Boulouis, H.-J.** Identification of *Bartonella* strains from wild and domestic

ruminants by a single-step PCR analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *Veterinary Microbiology*. 2004, Vol. 98 (1), pp. 63-69.

264. **Pailley, J.** *Les bactéries hémotropes des ruminants transmises par les arthropodes hématophages en France.*(Thèse pour le doctorat en vétérinaire). Alfort : s.n., 2007.

265. **Lord, C.C.** Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Arachnida: Acari: Ixodidae). Featured creatures, University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, Department of Entomology and Nematology. [En ligne] 2012. http://www.entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/medical/brown_dog_tick.htm.

266. **Dantas-Torres, Otranto, D. and Filipe.** Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*. 2010, Vol. 3 (1). PMC 2818618. PMID 20145730.

267. **Dantas-Torres, F.** The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol*. 2008, Vol. 152, pp. 173–185. CrossRefMedline.

268. **Sarih, M., M'Ghirbi, Y., Bouattour, A., Gern, L., Baranton, G. & Postic, D.** Detection and identification of Ehrlichia spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. *J Clin Microbiol*. 2005, Vol. 43, pp. 1127–1132. Abstract/FREE Full Text.

269. **Bernasconi, M. V., Casati, S., Péter, O. and Piffaretti, J. C.** *Rhipicephalus* ticks infected with Rickettsia and Coxiella in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect Genet Evol*. 2002, Vol. 2, pp. 111–120. CrossRefMedline.

270. **Coutinho, M. T., Lacerda, L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M., Genaro, O. and Linardi, P. M.** Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2005, Vol. 128, pp. 149–155. CrossRefMedline.

271. **Dantas-Torres, F.** Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis*. 2007, Vol. 7, pp. 724-732.

272. **Demma, L.J., Traeger, M.S., Nicholson, W.L., Paddock ,CD., Blau, D.M., Ereemeeva, M.E., Dasch, G.A., Levin M.L., Singleton, J. Jr., Zaki, .SR., Cheek, J.E., Swerdlow ,D.L. and McQuiston, J.H.** Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *New England J. Medicine*. 2005, Vol. 353, pp. 587-594.

273. **Mariotte, C.O., Bustamante, M.E., Varela, G.** Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas, en Sonora (Mexico). *Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop*. 1944, Vol. 5, pp. 297–300.

274. **Bustamente, M. E., Varela, G.** Distribucion de las rickettsias en Mexico. *Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop.* 1947, Vol. 8, pp. 3–14.
275. **Bitam, I., Parola, P., Matsumoto, K., Rolain, J. M., Baziz, B., Boubidi, S. C., Harrat, Z., Belkaid, M. et Raoult, D.** First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. *Environ. Microbiol.* 2006, Vol. 72, pp. 5569-5577. PubMed.
276. **Parola, P., Paddock, C.D., and Raoult, D.** Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, Vol. 18, pp. 719-756.
277. **Vitale, G., Mansuelo, S., Rolain, J.M., and Raoult, D.** *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, Vol. 12, pp. 174-175.
278. **Eremeeva, M.E., Bosserman A., Demma, L.J., Zambrano, M.L., Blau, D.M. and Dasch, G.A.** Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Arizona. s.l. : Appl. E, 2007.
279. **Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., and Shkap, V.** Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Parasitology.* 2001, Vol. 87(3), pp. 606-611.
280. **Nordgren, R.M., Craig, T.M.** Experimental transmission of the texas strain of *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.* 1984, Vol. 16, pp. 207–214.
281. **Wikswa, M.E., Hu, R., Metzger, M.E., Eremeeva, M.E.** Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks from California. *J. Med. Entomol.* 2007, Vol. 44(1), pp. 158-162.
282. **Kitchell, B.E., Fan, T., Walenberg, G., Kordick, D.L., Breitschwerdt, E.B.** Peliosis hepatis in dog associated with *Bartonella henselae*. *J Am Vet Assoc.* 2000, Vol. 216, pp. 519-23.
283. **Billeter, S. A., Cáceres, A. G., Gonzales-Hidalgo, J., Luna-Caypo, D. et Kosoy, M. Y.** Molecular Detection of *Bartonella* Species in Ticks From Peru. *Journal of Medical Entomology.* 2011, Vol. 48 (6), pp. 1257–1260.
284. **Breitschwerdt, E. B., Kordick, D. L., Malarkey, D. E., Keene, B., Hadfield, T.L. and Wilson, K.** Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* 1995, Vol. 33, pp. 154-60.
285. **Breitschwerdt, E. B., Atkins, C. E., Brown , T. T., Kordick, D. L and Snyder, P. S.** *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* and related members of the alpha Proteobacteria in

dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. *J Clin Microbiol.* 1999, Vol. 37, pp. 3618-26.

286. **Pappalardo, B.L., Brown, T., Gookin, J.L., Morrill, C.L., Breitschwerdt, E.B.** Granulomatous disease associated with Bartonella infection in two dogs. *J Vet Intern Med.* 2000, Vol. 14, pp. 37-42.

287. **Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C. et Hanckok, S. I.** Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii. *J. Clin. Microbiol.* 1998, Vol. 36, pp. 2645-2651.

288. **Euzéby, J.P.** LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN). [En ligne] <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>.

289. **Bitam, I., Rolain, J.M., Nicolas, V., Tsai, Y., Parola, P., Gundi, V.A.K.B., Chomel, B.B. and Raoult, D.** A multi-gene analysis of diversity of bartonella detected in fleas from algeria. *SciVerse ScienceDirect*. Presented at the 6th International Meeting on Rickettsia and Rickettsial Diseases at Heraklion, Crete, Greece on June 5–7, 2011.

290. **Lucey, D., Dolan, M.J., Moss, C.W., Garcia, M., Hollis, D.G., Wegner, S., Morgan, G., Almeida, R., Leong, D., Greisen, K.S., et al.** Relapsing illness due to Rochalimaea henselae in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis.* 1992, Vol. 14(3), pp. 683-688.

291. **Billeter, S. A., Kasten, R. W., Killmaster, L. F., Breitschwerdt, E. B., Levin, M. L., Levy, M. G., Kosoy, M. Y. and Chomel, B. B.** Experimental infection by capillary tube feeding of Rhipicephalus sanguineus with Bartonella vinsonii subspecies berkhoffi. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis.* 2012, Vol. 35(1), pp. 9-15. doi: 10.1016/j.cimid.2011.09.004.

292. **Blanc, G. et Caminopetros, J.** La transmission du Kala—Azar méditerranéen par une tique: Rhipicephalus sanguineus. *C. R. Acad. Sci.* 1930, Vol. 191, pp. 1162–1164.

293. **Companion Animal Parasite Council, Copyright 2012. Accessed June 16, 2012.** <http://www.capcvet.org/capc-recommendations/ticks/>. Companion Animal Parasite Council, Copyright 2012. Accessed June 16, 2012. . [En ligne] <http://www.capcvet.org/capc-recommendations/ticks/>.

294. **Denoeud.** *Analyse des génomes à la recherche de répétitions en tandem polymorphes : outils d'épidémiologie bactérienne et locus hypermutables humains (thèse).* France : s.n., 2003. p. 216.

ANNEXE

Annexe 1: Critères de répartition des zones

En règle générale, il existe deux grands types de critères qui sont utilisés pour définir des notions d'urbain et de rural : quantitatifs et qualitatifs (voire subjectifs). Ces définitions recouvrent des distinctions qui ne sont pas soumises à une définition unique qui serait applicable à tous les domaines. Notre étude ne tient pas compte des limites administratives. Les principaux critères de classification des zones urbaines utilisés ici sont : la taille de l'agglomération (qui doit être inférieure à 2000 habitants pour les zones rurales, entre 2000 et 5000 pour les zones sub-urbaines et plus de 5000 pour les zones urbaines) et la proportion de l'activité agricole.

Zones urbaines : Dély Ibrahim, El Harrach, Blida ville.

Zones sub-urbaines : Baba Ali, Sidi Ayad, Chebli.

Zones rurales : Médéa rurale.

Annexe 2: Position géographique des régions échantillonnées

Région	Position géographique
Baba Ali	36°46'34"N 3°03'36"E
Blida	36°29'00"N 2°50'00"E
Chebli	36°35'00"N 3°01'00"E
Dély Ibrahim	36°45'00"N 2°59'00"E
El Harrach	36°43'16"N 3°08'15"E
Médéa	36°16'03"N 2°45'00"E
Sidi Ayad	36°44'14"N 2°54'39"E

Annexe 3: Tableaux des échantillons

Date de prélèvement	Code (Kit/Thermolysat)	Espèce d'arthropode	Sexe	Hôte	Région
avr-12	1 / T1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	mâle	Chien	Dely Ibrahim
avr-12	2 / T2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Femelle	Chien	Dely Ibrahim
avr-12	3 / T3	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	4 / T4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Femelle	Bovin	Médéa
avr-12	5 / T5	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Femelle	Chien	Dely Ibrahim
avr-12	6 / T6	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Mâle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	7 / T7	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Femelle	Bovin	Sidi Ayed
mai-12	8 / T8	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Mâle	Bovin	Baba Ali
mai-12	9 / T9	<i>Hyalomma detritum detritum</i>	Mâle	Bovin	Médéa
mai-12	10 / T10	<i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	femelle	Bovin	Baba Ali
mai-12	11 / T11	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	12 / T12	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	13 / T13	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	14 / T14	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	15 / T15	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	16 / T16	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	17 / T17	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	18 / T18	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
mai-12	19 / T19	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Dely Ibrahim
juin-12	20 / T20	<i>Melophagus ovinus</i>	femelle	Bovin	Médéa
mai-11	21	<i>Xenopsylla cheopis</i>	femelle	Chien	Ain kerma
mai-11	22	<i>Xenopsylla cheopis</i>	femelle	Chien	Ain kerma

ANNEXE

mai-11	23	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	El Ghora
mai-11	24	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	El Ghora
mai-11	25	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chien	Ain kerma
mai-11	26	<i>Ctenocephalides felis</i>	femelle	Chèvre	El ghora
Fev-12	27	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	femelle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	28	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	femelle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	29	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	femelle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	30	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	mâle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	31	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	femelle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	32	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	femelle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	33	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	mâle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	34	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	femelle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	35	<i>Archaeopsylla erinacei</i>	femelle	Hérisson	Boumerdes
Fev-12	36	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	mâle	Bovin	El Ghora
janv-11	37	<i>Pediculus humanus capitis</i>	femelle	Humain	Alger
janv-11	38	<i>Pediculus humanus capitis</i>	femelle	Humain	Alger
Fev-12	2T+	Rate	-	Hérisson	Boumerdes

Annexe 4 : Photo d'hotte de décontamination à ultraviolet utilisée lors des investigations de la biologie moléculaire



Annexe 5 : Photos et étapes d'extraction par kit « Macherey Nagel »

-180 µl du « réactif T1 » est mise avec une moitié de chaque arthropode dans chaque eppendorf pour la lyse tissulaire suivit d'un broyage mécanique jusqu'à perte d'aspect des structures chitineuses. 15 µl de « protéinase k » sont ajoutés pour dénaturer l'ADNase, afin d'éviter la perte de l'ADN. Les amboux sont changés à chaque fois. Après avoir bien fermé les couvercles des eppendorfs, on vortexe puis on incube à 37°C pendant 20h ou à 56°C pendant 2h pour favoriser la lyse. On vortexe encore une fois après l'incubation, puis on ajoute 180 µl du « lyse buffer B3 » pour compléter la lyse. On vortexe pour homogénéiser et on incube à 70°C pendant 10 minutes. Puis 200 µl d'éthanol sont ajoutés pour arrêter la lyse.



Figure 15: Photos originales des étapes de lyse de l'extraction par kit « Macherey Nagel ».

-On verse le contenu de l'eppendorf dans une colonne à filtre, après avoir vortexé. Cela permettra de retenir l'ADN par le filtre et de laisser passer les débris cellulaires et tissulaires. On centrifuge à 11000 tours/minute pendant 1 minute, on récupère le filtre et on le met dans un nouveau tube collecteur. On ajoute 500 µl du « wash buffer BW » pour commencer le lavage. S'ensuit une centrifugation à 11000 tours/minute pendant 1 minute. On ajoute 500 µl du « wash buffer B5 » au filtre séparé pour un deuxième lavage. On centrifuge encore une fois à 11000 tours/minute pendant 1 minute. L'élimination des débris et liquides restants se fait par une autre et même centrifugation. Les filtres sont mis dans de nouveaux tubes collecteurs après chaque centrifugation.



Figure 16: Photo de la centrifugation lors de l'étape de purification.

-On met, cette fois-ci, le filtre dans un tube eppendorf et on ajoute 150 μ l « d'ellution buffer BE » au lieu de 180 μ l pour la récupération d'un ADN purifié et concentré. On laisse agir pendant 5 minutes pour avoir un meilleur rendement. On centrifuge une dernière fois à 11000 tours/minute pendant 1 minute, puis on récupère le produit.

Les solutions d'ADN sont alors conservées à +4°C.

Annexe 6: Etapes de l'extraction par thermolysat

On broie manuellement la deuxième moitié d'arthropodes dans 1ml de PBS MgCl₂ ou Phosphate Buffered Saline dichlorure de magnésium (pH 7.4, 8g NaCl, 0.2g KH₂ PO₄, 1.45g Na₂ HPO₄, 0.2g KCl, 2.135g MgCl₂, 1l eau distillée), puis on les centrifuge à 10000 tours/minute pendant 15minutes. Après récupération du culot, on ajoute 1ml de PBS MgCl₂ et on centrifuge une deuxième fois à 10000 tours/minute pendant 15 minutes aussi. Au culot obtenu est ajouté 1ml de PBS MgCl₂. On centrifuge une dernière fois comme décrit ci-dessus. Le culot final est mis en suspension dans 40ul d'eau distillée puis on incube ces dernières à 100°C pendant 15minutes.

Les produits finis sont conservés à +4°C.

Annexe 7 : Tableau de composition du Tris Borate EDTA

Composants du Tris Borate EDTA (Ethylène Diamine Tétracétate), PH=8.3	Quantité utilisée
Tris (tris hydroxyméthyl aminométhane)	54 g
Acide borique	27.5 g
EDTA (sel disodique d'ethylène diamine tétraacétate)	20 ml

Annexe 8 : Etapes et photo d'électrophorèse sur gel d'agarose

Le mélange de la poudre d'agarose et du tampon aqueux Tris Borate EDTA (1 fois concentré) est chauffé au micro-onde pendant 2 minutes jusqu'à ce que l'agarose se transforme en une solution claire. On ajoute 4.5 μ l de BET (Bromure d'éthidium); utilisé comme révélateur des acides nucléiques et le tout est versé dans une cuve d'électrophorèse où le(s) peignes(s) et barrières ont été préalablement positionné(s). On met à refroidir à température ambiante jusqu'à formation d'un gel rigide. En se polymérisant, l'agarose forme un support de migration.

Après retrait des peignes, des barrières et immersion du gel par le tampon de migration: TBE 0.5 fois concentré. 3 μ l du tampon de charge (0.2 mg bleu de bromophénol, 5.1g saccharose, 0.01 Tris, pH 8) et 7 μ l de chaque échantillon d'ADN sont mélangés et spotés dans les puits du gel du côté cathode, à l'aide d'une micropipette en changeant de cône à chaque prélèvement. Le tampon de charge permet de suivre visuellement l'avancement de la migration.

On branche les électrodes de la cuve à une alimentation électrique de 120v (volts) correspondant à 1 heure de migration. La visualisation des bandes révélées avec le bromure d'éthidium nécessite un transilluminateur UV (longueur d'onde : 302 nm, voire 254 nm et 365 nm) dans une chambre noire.



Figure 17: Photo du dépôt d'échantillons dans une plaque de gel d'agarose (électrophorèse).

Annexe 9 : Spectrophotométrie et photos

Le dosage des acides nucléiques par la spectrophotométrie est une méthode plus simple et plus rapide pour quantifier l'ADN et déterminer sa pureté. Les bases azotées des acides nucléiques ont la propriété d'absorber les U.V. à une longueur d'onde de 260 nm, une lecture de l'absorbance à cette longueur d'onde permettra de déterminer la concentration d'un échantillon d'un acide nucléique en utilisant un facteur de corrélation selon la loi de Beer-Lambert ($\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{DO (densité optique)} \times 260\text{nm} \times 50$). Sur une longueur de parcours de 10 mm avec une longueur d'onde de 260 nm, l'absorption $A = 1$ correspond à environ 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin ou ADNds (ADN double stranded), environ 37 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN mono brin, 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN ou environ 30 $\mu\text{g/ml}$ d'oligonucléotides. L'absorbance maximale de solutions à base de protéines (tyrosine et tryptophane) est de 280 nm. Le ratio entre les valeurs à 260 nm et à 280 nm (A_{260}/A_{280}) fournit une estimation du degré de pureté des acides nucléiques. Échantillon d'ADN pur : A_{260}/A_{280} compris entre 1,8 et 2 si le rapport est $< 1,7$ présence de protéines. Si le rapport est > 2 présence d'ARN. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} devrait être d'environ 2,2.

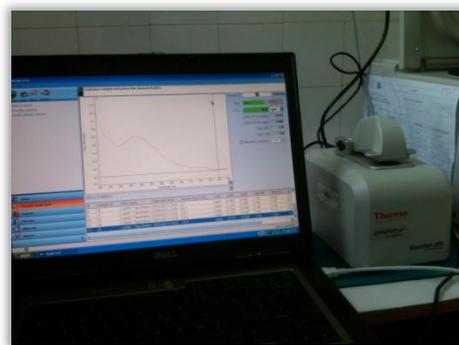
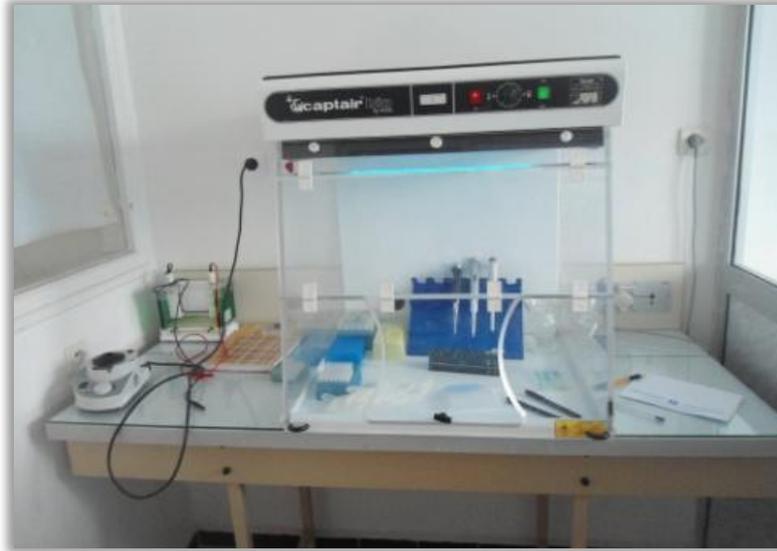


Figure 18: Photos du dépôt d'échantillons sur le nanodrop-2000 et l'apparition du graphe de mesure de la concentration d'ADN.

Annexe 10 : Photo de la zone du laboratoire de la préparation du master-mix



Annexe 11 : Tableaux des amorces des différents gènes utilisés pour la détection et l'identification de *Bartonella*

Amorces	Séquences
<i>ITS</i> (espace intergénique)	<i>URB1</i> : 5'GGG-GCC-GTA-GCT-CAG-CTG3' <i>URB2</i> : 5'TGA-ATA-TAT-CTT-CTC-TTC-ACA3'
<i>gltA</i> (citrate synthase)	<i>gltA1</i> : 5'TTA-CCT-ATG-ATC-CKG-GYT-TTA3' <i>gltA2</i> : 5'GCT-ATG-TCT-GCA-TTC-TAT-CA3'
<i>rpoB</i> (protéine du choc thermique)	<i>rpoBf</i> : 5'TGT-TGG-ACC-AAA-CGA-AGT-TG3' <i>rpoBr</i> : 5'CCA-ACA-ATT-GGT-GTT-TGT-GG3'
<i>ftsZ</i> (protéine impliquée dans la division cellulaire)	<i>ftsZf</i> : 5'CCG-TGA-ATA-ATA-TGA-TTA-ATG-C3' <i>ftsZr</i> : 5'TTG-AAA-TGG-CTT-TGT-CAC-AAC3'
<i>ribC</i> (riboflavine C)	—

Annexe 12: Quelques inhibiteurs de la PCR (Inhibiteur/Concentration inhibitrice)

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) > 0,005%

Phénol > 0,2%

Éthanol > 1%

Isopropanol > 1%

Acétate de sodium > 5 mM

Chlorure de sodium > 25 mM

EDTA > 0,5 mM

Hémoglobine > 1 mg/ml

Héparine > 0,15 i.m/ml

Urée > 20 mM

Mélange de réactifs > 15%

Annexe 13: Tableau récapitulatif des résultats de la spectrophotométrie "NanoDrop-2000"

Sample	Nucleic Acid Concentration	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	40,6	ng/μl	0,811	0,431	1,88	1,28	DNA	50
2	5	ng/μl	0,1	0,058	1,73	1,17	DNA	50
3	49,7	ng/μl	0,994	0,509	1,95	1,56	DNA	50
4	57,9	ng/μl	1,158	0,596	1,94	1,69	DNA	50
5	36,6	ng/μl	0,733	0,381	1,92	1,51	DNA	50
6	4,1	ng/μl	0,082	0,06	1,36	0,46	DNA	50
7	56,7	ng/μl	1,133	0,566	2	1,62	DNA	50
8	25,3	ng/μl	0,505	0,268	1,88	1,34	DNA	50
9	23,5	ng/μl	0,471	0,249	1,89	1,14	DNA	50
10	23,6	ng/μl	0,473	0,269	1,75	1	DNA	50
11	6,7	ng/μl	0,134	0,091	1,47	0,47	DNA	50
12	3,3	ng/μl	0,065	0,055	1,18	0,74	DNA	50
13	4,1	ng/μl	0,082	0,072	1,14	0,55	DNA	50
14	8,4	ng/μl	0,168	0,106	1,58	0,27	DNA	50
15	2,8	ng/μl	0,056	0,042	1,34	0,37	DNA	50
16	3,5	ng/μl	0,07	0,046	1,52	0,84	DNA	50
17	2,5	ng/μl	0,051	0,044	1,15	0,7	DNA	50
18	2,3	ng/μl	0,047	0,031	1,52	0,68	DNA	50
19	2,4	ng/μl	0,047	0,038	1,25	0,61	DNA	50
20	5,6	ng/μl	0,111	0,062	1,8	1,21	DNA	50

ANNEXE

T1	113,9	ng/μl	2,279	1,175	1,94	1,03	DNA	50
T2	407,6	ng/μl	8,152	4,359	1,87	1,12	DNA	50
T3	67,7	ng/μl	1,355	0,716	1,89	1,04	DNA	50
T4	130,1	ng/μl	2,602	1,431	1,82	1,1	DNA	50
T5	50,8	ng/μl	1,015	0,591	1,72	0,81	DNA	50
T6	197	ng/μl	3,941	2,272	1,73	1,02	DNA	50
T8	23,7	ng/μl	0,475	0,297	1,6	0,6	DNA	50
T11	17,2	ng/μl	0,345	0,249	1,39	0,51	DNA	50
T13	29,2	ng/μl	0,583	0,354	1,65	0,56	DNA	50
T14	14,8	ng/μl	0,296	0,207	1,43	0,44	DNA	50
T16	14,1	ng/μl	0,281	0,192	1,46	0,58	DNA	50
T18	19,2	ng/μl	0,383	0,264	1,45	0,4	DNA	50
T19	23,2	ng/μl	0,463	0,326	1,42	0,43	DNA	50
T20	88,3	ng/μl	1,766	1,251	1,41	0,45	DNA	50