



HAL
open science

Étude préliminaire de la prévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez les oiseaux d'Ile-de-France

Adrien Étienne

► **To cite this version:**

Adrien Étienne. Étude préliminaire de la prévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez les oiseaux d'Ile-de-France. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03971877

HAL Id: dumas-03971877

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03971877v1>

Submitted on 3 Feb 2023

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

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

Année 2022

**ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA PRÉVALENCE
D'ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM CHEZ LES OISEAUX
D'ILE-DE-FRANCE**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 7 Septembre 2022

par

Adrien, Roger, Léon ETIENNE

sous la co-direction de **Pierre DESHUIILLERS et Pascal ARNÉ**

JURY		
Présidente du jury :	Mme Nadia HADDAD-HOANG XUAN	Professeure à l'EnvA
Directeur de thèse :	M. Pierre DESHUIILLERS	Maître de Conférences à l'EnvA
Invité co-encadrant :	M. Pascal ARNÉ	Maître de Conférences à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Anne-Claire LAGRÉE	Maître de Conférences à l'EnvA
Membres invités :	M. Henri-Jean BOULOUIS	Professeur émérite à l'EnvA
Membres invités :	Mme Cécile LE BARZIC	Praticienne hospitalière adjointe

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version du 8 février 2022

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Maître de conférences HDR	DPASP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquibet	Loic	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Fédérighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Perrot	Sébastien	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Constant	Fabienne	Maître de conférences	DPASP
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	De Paula Reis	Aline	Maître de conférences	DPASP
Mme	Decambon	Adeline	Maître de conférences	DEPEC
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Maignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mlmet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mespouhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Maître de conférences	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP

Remerciements

A la Présidente du Jury de cette thèse, Mme HADDAD-HOANG XUAN, Professeure à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, pour votre rigueur scientifique et vos commentaires pertinents lors de nos réunions hebdomadaires,
Hommage respectueux.

A M. DESHUIILLERS Pierre, Maitre de conférences à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur de co-diriger cette thèse.
Merci pour la proposition de ce sujet de thèse, pour votre aide dans les expériences et la discussion, pour la patience que vous m'avez accordé au cours de ce travail,
Mes plus sincères remerciements.

A M. ARNÉ Pascal, Maitre de conférences à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur de co-diriger cette thèse.
Merci d'avoir veillé à la bonne réalisation de ce projet au sein du ChuvFs.
Qu'il trouve ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

A Mme LAGRÉE Anne-Claire, Maitre de conférences à l'EnvA,

Pour avoir accepté d'être l'examinatrice de cette thèse, pour vos conseils avisés, votre disponibilité et votre bienveillance tout au long de ce projet,
Mes sincères remerciements.

A M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur émérite à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur de participer aux réflexions sur ce projet,
Qu'il trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance.

Au groupe VAMP de l'UMR BIPAR ANSES, EnvA et plus particulièrement à Clotilde ROUXEL,

Pour m'avoir accueilli dans les locaux, pour m'avoir aidé lors des expérimentations et conseillé lors de la rédaction, pour ta disponibilité et ta gentillesse,
Mes remerciements les plus chaleureux.

A l'ensemble des soigneurs et bénévoles du ChuvFs et plus particulièrement à Cécile LE BARZIC, Praticienne hospitalière adjointe,

Pour votre aide indispensable à l'organisation de la collecte des échantillons et pour votre disponibilité tout au long du projet,
Mes sincères remerciements.

A mes parents et mon frère,

Pour m'avoir aimé et accordé votre tendresse durant ces 28 années, pour votre écoute quotidienne et vos encouragements tout du long,
Je vous aime.

A tous mes amis d'Alfort, à Bérengère et toutes ces personnes attachantes rencontrées en stage,

Merci pour ces années qui resteront comme parmi les plus belles de ma vie.

Table des matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des abréviations.....	9
Introduction.....	11
Première partie : bibliographie.....	13
1. Etiologie : <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , agent causal de l'anaplasmose granulocytaire.....	13
A. Historique et taxonomie.....	13
a. Les dates clefs de la découverte d' <i>A. phagocytophilum</i>	13
b. <i>A. phagocytophilum</i> et l'ordre des Rickettsiales.....	14
B. Morphologie des bactéries du genre <i>Anaplasma</i> et particularités phénotypiques d' <i>A. phagocytophilum</i>	16
C. Cycle de développement et culture d' <i>A. phagocytophilum</i>	16
D. Pathogénicité d' <i>A. phagocytophilum</i> au sein des cellules hôtes vertébrés.....	18
a. Échappement à la réponse immunitaire innée.....	18
b. Echappement à la réponse immunitaire adaptative.....	18
c. Echappement aux autres mécanismes de défenses intracellulaires du neutrophile.....	19
d. Détournement des voies métaboliques de la cellule hôte.....	19
2. Le cycle de transmission d' <i>A. phagocytophilum</i>	20
A. Les acteurs du/des cycles.....	21
a. Une bactérie à plusieurs variants.....	21
b. Les vecteurs.....	22
c. Les hôtes vertébrés sensibles.....	24
d. Les réservoirs.....	24
B. Dynamique de l'infection à <i>A. phagocytophilum</i>	26
a. La contamination du vecteur lors du repas sanguin.....	26
b. La migration de la bactérie au sein de la tique.....	27
c. Transmission d' <i>A. phagocytophilum</i> du vecteur à l'hôte vertébré réceptif.....	28
d. Autres modes de transmission d' <i>A. phagocytophilum</i>	29
e. La dissémination de l'infection au sein de populations d'hôtes.....	29
f. Infections concomitantes.....	30
3. Epidémiologie descriptive de l'infection par <i>A. phagocytophilum</i>	30
A. Chez les vecteurs.....	30
a. Infection par <i>A. phagocytophilum</i> de tiques collectées dans l'environnement ou sur des hôtes vertébrés réceptifs.....	30
b. Infection par <i>A. phagocytophilum</i> de tiques collectées à partir de l'avifaune.....	31
B. Chez les hôtes vertébrés sensibles.....	31
a. L'anaplasmose granulocytaire humaine.....	31
b. L'anaplasmose granulocytaire des animaux domestiques.....	32
C. Chez les hôtes vertébrés réceptifs.....	33
a. Infection par <i>A. phagocytophilum</i> dans la faune sauvage hors avifaune.....	33
b. Infection de l'avifaune par <i>A. phagocytophilum</i>	35
4. Etude clinique, paraclinique et lésionnelle de l'infection par <i>A. phagocytophilum</i>	36
A. Au sein des espèces sensibles.....	37
a. Manifestations cliniques, paracliniques et lésionnelles de l'anaplasmose granulocytaire humaine (HGA).....	37
b. Manifestations cliniques, paracliniques et lésionnelles chez les animaux domestiques (ruminants, ovins, chevaux, chiens et chats).....	37
B. Au sein des espèces réceptives mais considérées comme non sensibles.....	38
a. Faune sauvage hors avifaune.....	38

b. Avifaune	39
5. Méthode de diagnostic et de dépistage de laboratoire	40
A. Identification par des méthodes microscopiques avec ou sans coloration	40
B. Identification par culture, réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et typage moléculaire	40
C. Sérologie	41
6. Traitement et prévention de l'anaplasmose granulocytaire	42
A. Traitement de l'anaplasmose granulocytaire	42
B. Prévention de l'anaplasmose granulocytaire	42
Deuxième partie : étude expérimentale	45
1. Introduction	45
2. Matériels et méthodes	45
A. Les animaux : de la sélection aux prélèvements des échantillons	45
a. Corvidés et passereaux	45
b. Aire et période d'étude des oiseaux	46
c. Taille des échantillons : objectifs initiaux	46
d. Critères d'inclusion et d'exclusion des oiseaux	47
e. Examen clinique et signalement	48
f. Euthanasie des oiseaux au ChuvFs	48
g. Conditions de conservation des cadavres et de prélèvements des organes	48
B. Extraction d'ADN	50
a. Sur prélèvements tissulaires spléniques, hépatiques et cutanés	50
b. Evaluation de la concentration et de la pureté des éluats d'extraction d'ADN	51
c. Contrôle de la conformité de l'extraction d'ADN	51
C. Détection de l'ADN d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i> par qPCR	52
a. qPCR ciblant le gène msp2	52
b. Protocole de la qPCR msp2	52
c. Sensibilité analytique de la qPCR msp2	53
d. Séquençage des échantillons	53
D. Confirmation de la positivité des échantillons et premières études phylogéniques	53
a. PCR nichée ciblant la séquence codant l'ARNr 16S	53
b. PCR nichée ciblant un gène codant une protéine de liaison GTP (GTP-binding protein)	55
c. Migration sur gel d'agarose et révélation	56
d. Séquençage des échantillons	56
E. Eléments d'épidémiologie	56
3. Résultats de l'étude	56
A. Résultats de la collecte menée par le ChuvFs	56
B. Résultat de l'histologie de la rate	58
C. Caractéristiques épidémiologiques descriptives relatives aux oiseaux	60
a. Origine des oiseaux	60
b. Age des oiseaux	67
c. Motif d'admission des oiseaux	68
D. Résultats de la PCR ARNr 12S	70
E. Résultats de la qPCR msp2	70
F. Résultats du séquençage des produits de qPCR par la société Eurofins	71
G. Résultats des PCR nichées	71
a. PCR nichée ciblant la séquence de l'ARNr 16S	71
b. PCR nichée ciblant le gène typA	73
H. Résultats des séquençages par la société Eurofins	74
4. Discussion	76
A. Flux migratoires des oiseaux en France et risques de dissémination des maladies transmissibles par les tiques	76
B. Géographie de l'Île-de-France	79
C. Effet de l'urbanisation sur la population des tiques et des hôtes	79

<i>D. L'avifaune, bien présente en ville.....</i>	<i>80</i>
<i>E. Méthode analytique et résultats de la collecte</i>	<i>82</i>
a. Une étude préliminaire de la prévalence d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i> chez les oiseaux d'Ile-De-France	82
b. Les effectifs d'oiseaux	82
c. Le profil des oiseaux : origine, âge et motif d'admission	84
d. Le choix des prélèvements	84
e. Qualité et validité des résultats	85
f. Résultats de l'épidémiologie moléculaire	86
Conclusion.....	95
Liste des références bibliographiques	97
Annexes	108

Liste des figures

Figure 1 : Formation des morula d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i> au sein du cytoplasme du granulocyte neutrophile (source : (Rikihisa, 2011)).....	17
Figure 2 : Les étapes de la vie d'une tique (source : ESCCAP France, s. d.)	23
Figure 3 : <i>A. phagocytophilum</i> manipule le vecteur tique à son propre avantage (source : Severo <i>et al.</i> , 2012)	28
Figure 4 : Morula d' <i>A. phagocytophilum</i> dans une cellule d'hôte vertébré – souris (source : de la Fuente <i>et al.</i> , 2017).....	40
Figure 5 : Visualisation du foie après ouverture du bréchet chez une Pie bavarde (<i>Pica pica</i>)	49
Figure 6 : Visualisation de la rate chez trois espèces d'oiseaux	50
Figure 7 : Histologie de la rate d'une Corneille noire en coupe transversale colorée à l'HES (grossissement x 20) et zoomé à 25 % - 100 % - 150 % (légendé selon Cordonnier (2018)).	59
Figure 8 : Répartition des <i>Corvus corone</i> (Corneille noire) selon le département de découverte	60
Figure 9 : Répartition des <i>Pica pica</i> (Pie bavarde) selon le département de découverte.....	61
Figure 10 : Répartition des <i>Garrulus glandarius</i> (Geai des chênes) selon le département de découverte	61
Figure 11 : Répartition des <i>Corvus frugilegus</i> (Corbeau freux) selon le département de découverte	62
Figure 12 : Répartition des <i>Parus major</i> (Mésange charbonnière) et <i>Cyanistes caeruleus</i> (Mésange bleue) selon le département de découverte	64
Figure 13 : Répartition des <i>Turdus merula</i> (Merle noir) selon le département de découverte	64
Figure 14 : Répartition des <i>Passer domesticus</i> (Moineau domestique) selon le département de découverte	65
Figure 15 : Répartition des <i>Sturnus vulgaris</i> (Etourneau sansonnet) selon le département de découverte	65
Figure 16 : Répartition des <i>Erithacus rubecula</i> (Rouge-gorge familier) selon le département de découverte	66
Figure 17 : Résultats d'électrophorèse après révélation sous UV de l'amplification par PCR <i>ARNr 12S</i> (échantillons de rate et de foie) pour les effectifs d'Etourneaux sansonnets, Geais des chênes et Rouges-gorges familiaux.....	70

Figure 18 : Résultats d'électrophorèse de la PCR 1 Ge3a-G10R (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR <i>msp2</i>	72
Figure 19 : Résultats d'électrophorèse de la PCR 2 Ge9F-Ge2R (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR <i>msp2</i>	72
Figure 20 : Résultats d'électrophorèse de la PCR typA Ext (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR <i>msp2</i>	73
Figure 21 : Résultats d'électrophorèse de la PCR typA Int (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR <i>msp2</i>	74
Figure 22 : Les flux migratoires et les zones à risques pour la transmission d'agent pathogène en France (modifié d'après (Reynard <i>et al.</i> , 2021 ; ANSES, 2021 ; Ligue pour la Protection des Oiseaux <i>et al.</i> , 2007)).	78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales anaplasmoses d'importance vétérinaire et/ou zoonotique (d'après Moutailler <i>et al.</i> , 2017, Carson <i>et al.</i> , 1974, Smith <i>et al.</i> , 1989).....	15
Tableau 2 : Hôtes aviaires testés et infectés par <i>A. phagocytophilum</i> pour évaluer leur capacité à s'infecter et transmettre la bactérie à des tiques, Sud-Est de l'Etat de New York, EUA, 2008-2010 (source : modifié d'après Keesing <i>et al.</i> (2012)).....	36
Tableau 3 : Objectifs initiaux des tailles d'échantillon pour l'étude préliminaire de la prévalence d'ADN d' <i>A. phagocytophilum</i> chez les oiseaux d'Ile-de-France	47
Tableau 4 : Bilan brut de la collecte des passereaux de mars à octobre 2021 (par ordre d'effectif décroissant selon l'espèce) et tentative d'estimation de la proportion de chacune d'elle en IdF (modifiée d'après (Centre Ornithologique Ile-de-France <i>et al.</i> , 2010; Malher, 2020)).....	57
Tableau 5 : Répartition géographique des corvidés selon le département de découverte et effectifs associés	63
Tableau 6 : Répartition géographique des autres passereaux selon le département de découverte et effectifs associés.....	67
Tableau 7 : Répartition des corvidés en fonction de l'âge à l'admission au ChuvFs	68
Tableau 8 : Répartition des autres passereaux en fonction de l'âge à l'admission au ChuvFs	68
Tableau 9 : Répartition des corvidés en fonction du motif d'admission au ChuvFs et de l'âge	69
Tableau 10 : Répartition des autres passereaux en fonction du motif d'admission au ChuvFs et de l'âge.....	69
Tableau 11 : Résultats du séquençage des produits des PCR nichées	75
Tableau 12 : Territoires de nidifications, mode de vie et alimentation des corvidés de l'étude (source : d'après (Brichetti et Dicapi, 2000)).....	80
Tableau 13 : Territoires de nidifications, mode de vie et alimentation des autres passereaux de l'étude (source : d'après (Brichetti et Dicapi, 2000)).....	81
Tableau 14 : Bilan brut de la collecte des espèces de passereaux retenues pour l'étude (par ordre de proportions décroissantes) et tentative d'estimation de la proportion de chacune d'elle en IdF (modifiée d'après (Centre Ornithologique Ile-de-France <i>et al.</i> , 2010 ; Malher, 2020))83	
Tableau 15 : Classement par ordre croissant des prévalences d'ADN d' <i>A. phagocytophilum</i> chez les oiseaux et chez les tiques récoltées sur les oiseaux sur les différents continents (Europe de l'Est, de l'Ouest, Amériques du Nord et du Sud et Asie).....	87

Tableau 16 : Intérêt de chacune des biopsies pour étudier la prévalence d'*A. phagocytophilum*
.....92

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
AnkA : protéine avec des répétitions d'ankyrine
ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Ap-ha : variant d'*A. phagocytophilum* pathogène pour l'homme
Ap-variant : variant d'*A. phagocytophilum* non pathogène pour l'homme
AptA : toxine A d'*A. phagocytophilum*
ApV : vacuole d'*A. phagocytophilum*
ARNr : acide ribonucléique ribosomal
Ats-1 : *Anaplasma translocated substrate 1* ou substrat d'*Anaplasma* transloqué 1
BIPAR : biologie moléculaire et immunologie parasitaires
BET : bromure d'éthidium
ChuvFs : Centre hospitalier universitaire vétérinaire de la Faune Sauvage
Ct : cycle threshold ou seuil de cycle
CtrA : cycle regulator ou régulateur de cycle
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate quelconque
EGA : *equine granulocytic anaplasmosis* ou anaplasmosse granulocytaire équine
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* ou technique d'immunoabsorption par enzyme liée
EnvA : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
EpAnk : gène de la protéine AnkA
ER : réticulum endoplasmique
EUA : Etats-Unis d'Amérique
gltA : citrate synthase
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GroESL : complexe de protéine chaperonne
GroEL : *chaperon protein* ou protéine chaperonne
GyrA : *DNA gyrase subunit A* ou sous-unité A de l'ADN gyrase
HES : hémalun-éosine-safran
HGA : *human granulocytic anaplasmosis* ou anaplasmosse granulocytaire humaine
HGE : *human granulocytic ehrlichiosis* ou ehrlichiose granulocytaire humaine
HL60 : lignée de promyélocytes leucémiques d'origine humaine non différenciés ou différenciés en granulocytes neutrophiles
IdF : Ile-de-France
IFA : épreuve d'immunofluorescence indirecte
IgM : immunoglobulines M
IgG : immunoglobulines G
IL : Interleukine
kDa : kilodalton
LDL : *low density lipoprotein* ou lipoprotéine de faible densité
LDLR : récepteur de LDL
LPS : lipopolysaccharides
LTh : lymphocytes T auxiliaires
LI : *louping-ill*

MLST : *multilocus sequence typing* ou typage par séquençage multilocus
MLVA : *multilocus variable-number tandem-repeat analysis* ou analyse multilocus du nombre variable de répétitions en tandem
MSP : *major surface protein* ou protéine de surface majeure
NADPH oxydase : complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydoréductases
NCBI : National Center for Biotechnology Information
VNTR : *Variable-Number Tandem-Repeat* ou nombre variable de répétitions en tandem
NY-18 : souche humaine américaine d'*A. phagocytophilum*
pb : paire de bases
PCR : *polymerase chain reaction* ou réaction de polymérase en chaîne
PleD : *response regulator* ou régulateur de réponse
PolA : *DNA polymérase* ou ADN polymérase
Protéine Psgl-1 : *P-selectin glycoprotein ligand 1* ou ligand 1 de la glycoprotéine P-sélectine
qPCR : *quantitative polymerase chain reaction* ou réaction de polymérase en chaîne quantitative
RecG : *ATP-dependant DNA helicase* ou hélicase d'ADN dépendant en ATP
ROS : *reactive oxygen species* ou espèces réactives de l'oxygène
Spp : *species plurimae* ou plusieurs espèces
Sspl : enzyme de restriction
STOC : Suivi Temporel des Oiseaux Communs par Échantillonnage Ponctuel Simple
TBF : *tick-borne fever* ou fièvre transmissible par les tiques
TypA : *GTP binding protein* ou protéine de liaison GTP
UV : ultra-violet
VAMP : vecteurs et agents microbiens pathogène

Introduction

Certaines espèces de tiques (arachnides acarïens) parasitent une grande variété d'hôtes vertébrés et tiennent une place importante dans le passage de la barrière d'espèce, la transmission d'agents de zoonoses et l'émergence de certains agents infectieux. Parmi eux, *Anaplasma phagocytophilum* est l'agent causal de l'anaplasmose granulocytaire, une maladie émergente vectorisée par les tiques de la famille des *Ixodidae* et infecte les granulocytes neutrophiles des hôtes vertébrés.

L'anaplasmose granulocytaire à *A. phagocytophilum* est une zoonose bactérienne qui touche de nombreuses espèces de mammifères domestiques dont les bovins (*Bos taurus*), les ovins (*Ovis aries*), les chevaux (*Equus caballus*), les chiens (*Canis lupus familiaris*) et les chats (*Felis silvestris catus*). Les mammifères sauvages avec, entre autres, les cervidés mais également des micromammifères sauvages parmi lesquels de petits rongeurs, figurent également parmi les espèces hôtes d'*A. phagocytophilum* (Stuen *et al.*, 2013). Ceci rend l'étude épidémiologique de cette maladie multi-hôtes particulièrement complexe à appréhender et complique la mise en œuvre de mesures de gestion sanitaire. Par sa fréquence en France, l'anaplasmose granulocytaire est considérée comme la deuxième maladie transmissible par les tiques en médecine vétérinaire avec des cas observés dans les troupeaux de bovins et chez les chevaux dans tous les départements français (Joncour *et al.*, 2006). Elle engendre des pertes économiques considérables pour les élevages de ruminants touchés, en provoquant des retards de croissance, des avortements, de l'agalaxie et des pertes de production (Stuen, 2007).

Pour pouvoir proposer des mesures de contrôle, il est donc essentiel de déterminer quels vertébrés sauvages participent aux cycles épidémiologiques de la bactérie et quelles sont leurs contributions respectives à la transmission d'*A. phagocytophilum* aux mammifères domestiques. En ce sens, l'avènement des techniques de biologie moléculaire contribue à la mise en évidence de l'agent pathogène au sein des hôtes.

L'objectif de cette étude est de contribuer à élucider les zones d'ombre quant à la nature de l'espèce réservoir d'*A. phagocytophilum* à travers l'étude de l'infection d'espèces sauvages communément rencontrées en Europe : les oiseaux.

L'étude sera divisée en deux parties. Dans la première partie bibliographique, les connaissances actuelles portant sur l'étiologie, le cycle de transmission, l'épidémiologie, la clinique, les moyens de diagnostic, de dépistage et de lutte contre l'anaplasmose granulocytaire chez les vertébrés seront synthétisées. La seconde partie documentera la présence d'*A. phagocytophilum* dans des cadavres d'oiseaux originaires d'Ile-de-France par des techniques de biologie moléculaire et comparera les résultats de la détection de la bactérie selon le type des prélèvements effectués (biopsie de rate, biopsie de foie et biopsie cutanée) pour à terme connaître le(s) prélèvement(s) les plus appropriés dans l'étude des infections à *A. phagocytophilum*, tout au moins chez l'avifaune.

Première partie : bibliographie

1. Etiologie : *Anaplasma phagocytophilum*, agent causal de l'anaplasmose granulocytaire

A. Historique et taxonomie

a. Les dates clefs de la découverte d'*A. phagocytophilum*

En 1932, des chercheurs écossais étudiant le Louping-ill (LI) et son virus chez des ovins, une maladie transmissible par des tiques qui provoque des troubles neurologiques, observent pour la première fois chez ces animaux, une forte fièvre se distinguant du LI. La maladie est alors dénommée « fièvre à tique » ou TBF pour *tick-borne fever* (Macleod et Gordon, 1933).

En 1951, l'agent responsable de la TBF est identifié et étudié en détails. En raison de son appartenance à la famille des Rickettsiaceae, la bactérie est initialement dénommée *Rickettsia phagocytophilum* (Foggie, 1951). Elle est ensuite renommée *Cytoecetes phagocytophila* à cause de sa morphologie similaire à celle de *Cytoecetes microti* et de son association avec les granulocytes des hôtes qu'elle infecte avant d'être décrite en 1984 sous le nom d'*Ehrlichia phagocytophila* (Woldehiwet, 2006).

Les premiers cas d'ehrlichiose granulocytaire équine (EGA) à *Ehrlichia equi* sont décrits aux Etats-Unis d'Amérique (EUA) en 1969 (Stannard *et al.*, 1969).

Depuis sa découverte, des cas de TBF ont été rapportés dans le reste de l'Europe, chez des ruminants domestiques (bovins et ovins principalement) mais également au sein de l'espèce canine. En 1982, aux Etats-Unis d'Amérique, est découverte une bactérie responsable d'une ehrlichiose granulocytaire chez le chien. L'agent est semblable à *E. equi* tout en étant différenciable par des techniques de Western Blot (Madewell et Gribble, 1982). Il est ensuite renommé *Ehrlichia ewingii* en 1992 (Anderson *et al.*, 1992).

Dans l'espèce humaine, des cas d'ehrlichiose granulocytaire sont décrits pour la première fois en 1994 chez des patients dont le sérum a réagi positivement avec *E. phagocytophila* et/ou *E. equi*. L'agent responsable de cette forme humaine est alors dénommé « agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine » ou HGE pour *human granulocytic ehrlichiosis* (Chen *et al.*, 1994).

En 2001, l'étude phylogénétique visant à réorganiser la classification de l'ordre des Rickettsiales a regroupé ces trois espèces de bactéries granulocytaires (*E. phagocytophila*, *E. equi* et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine) en une unique espèce bactérienne appartenant à la famille des Anaplasmataceae. La bactérie a alors été renommée *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 2001).

b. *A. phagocytophilum* et l'ordre des *Rickettsiales*

Au sein de la classe des *Alphaproteobacteria*, l'ordre des *Rickettsiales* regroupe des bactéries à Gram négatif, pour la plupart intracellulaires obligatoires et transmises par des arthropodes hématophages. Auparavant, des critères principalement morphologiques et écologiques permettaient de classer les *Rickettsiales* en différentes familles. L'évolution des techniques de biologie moléculaire a amélioré notre connaissance de ces organismes. En 2001, sur la base d'une classification phylogénique basée principalement sur les gènes de l'ARN ribosomal 16S, de la protéine de choc thermique GroESL et sur l'analyse des gènes codant des protéines de surface, Dumler *et al.* (2001) subdivisent l'ordre des *Rickettsiales* en deux familles, à savoir les *Rickettsiaceae* et les *Anaplasmataceae*. Les bactéries de la famille des *Rickettsiaceae* sont présentes à l'état libre dans le cytoplasme, tandis que celles de la famille des *Anaplasmataceae* sont contenues au sein de vacuoles cytoplasmiques dérivées de la membrane de la cellule-hôte. Une troisième famille, les *Holosporacées*, a été proposée bien que des recherches phylogénétiques plus approfondies soient encore nécessaires (Brenner *et al.*, 2005). Des travaux récents, principalement basés sur la caractérisation et l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S, ont montré l'existence d'un quatrième clade indépendant au sein de l'ordre des *Rickettsiales* qui comprend une seule espèce candidate, « *Candidatus Midichloria mitochondrii* » (Sassera *et al.*, 2006).

La famille des *Anaplasmataceae* se répartit en six genres distincts : *Aegyptianella*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Lyticum*, *Neorickettsia* et *Wolbachia*. De par leurs similitudes génétiques, biologiques et antigéniques *E. phagocytophila*, *E. equi* et l'agent de HGE sont regroupés dans le genre *Anaplasma* sous la dénomination d'*A. phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 2001). Ce genre compte sept espèces distinctes : *A. bovis*, *A. caudatum*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis*, *A. platys* et enfin *A. phagocytophilum*. Les caractéristiques des principales espèces du genre *Anaplasma* sont récapitulées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Principales anaplasmoses d'importance vétérinaire et/ou zoonotique (d'après Moutailler *et al.*, 2017, Carson *et al.*, 1974, Smith *et al.*, 1989)

Agent	Maladie	Tiques vectrices	Hôtes principaux	Cellules hôtes	Distributions géographiques
<i>A. bovis</i>	Anaplasmosse monocytaire bovine	<i>Amblyomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.	Bovins	Monocytes, macrophages	Afrique, Amérique du Sud, Asie
<i>A. caudatum</i>	Anaplasmosse érythrocytaire bovine	<i>I. ricinus</i> , <i>R. bursa</i> , <i>R. sanguineus</i>	Bovins, cervidés	Hématies	Amérique du Nord
<i>A. centrale</i>	Anaplasmosse érythrocytaire bovine atténuée	<i>Rhipicephalus sinus</i>	Bovins	Hématies	Afrique du Sud
<i>A. marginale</i>	Anaplasmosse bovine	Plusieurs, surtout <i>Dermacentor</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp	Bovins, ovins, caprins, cervidés	Hématies	Surtout régions tropicales, et subtropicales, moins en régions tempérées
<i>A. ovis</i>	Anaplasmosse érythrocytaire ovine	Surtout <i>Dermacentor</i> spp. et <i>Rhipicephalus</i> spp.	Ovins, caprins, bovins	Hématies	Europe, Amérique (du Nord et du Sud), Afrique, Asie
<i>A. platys</i>	Thrombocytopénie infectieuse cyclique canine	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Chiens	Plaquettes	Europe, Amérique (du Nord et du Sud), Asie
<i>A. phagocytophilum</i>	Anaplasmosse granulocytaire humaine et animale	<i>Ixodes</i> spp.	Ruminants chiens, chats, chevaux	Granulocytes	Eurasie, Amérique

B. Morphologie des bactéries du genre *Anaplasma* et particularités phénotypiques d'*A. phagocytophilum*

Les bactéries du genre *Anaplasma* se présentent sous la forme de bactéries immobiles à coloration de Gram négative, de petite taille, allant de 0,2 à 2 µm, souvent pléomorphes, coccoïdes à ellipsoïdes. Ce sont des bactéries à métabolisme aérobie obligatoire dont la paroi semble dépourvue de peptidoglycane ou possède un peptidoglycane peu rigide expliquant la fragilité du genre *Anaplasma* en dehors des cellules (Rar *et al.*, 2021). Elles infectent les cellules matures ou immatures du système hématopoïétique des mammifères. Elles sont retrouvées dans le cytoplasme des granulocytes neutrophiles, des hématies, des plaquettes, des monocytes ou des macrophages et plus rarement dans les granulocytes éosinophiles. Les bactéries du genre *Anaplasma* vivent et se répliquent au sein de vacuoles formées par les membranes des cellules infectées portant le nom de morula. Les études par microscopie électronique révèlent l'existence de deux formes morphologiques au sein des morulas, des corps élémentaires ou corps initiaux denses (ou *dense-cored forms*) et des corps réticulés (ou *reticulate form*) (Rar *et al.*, 2021).

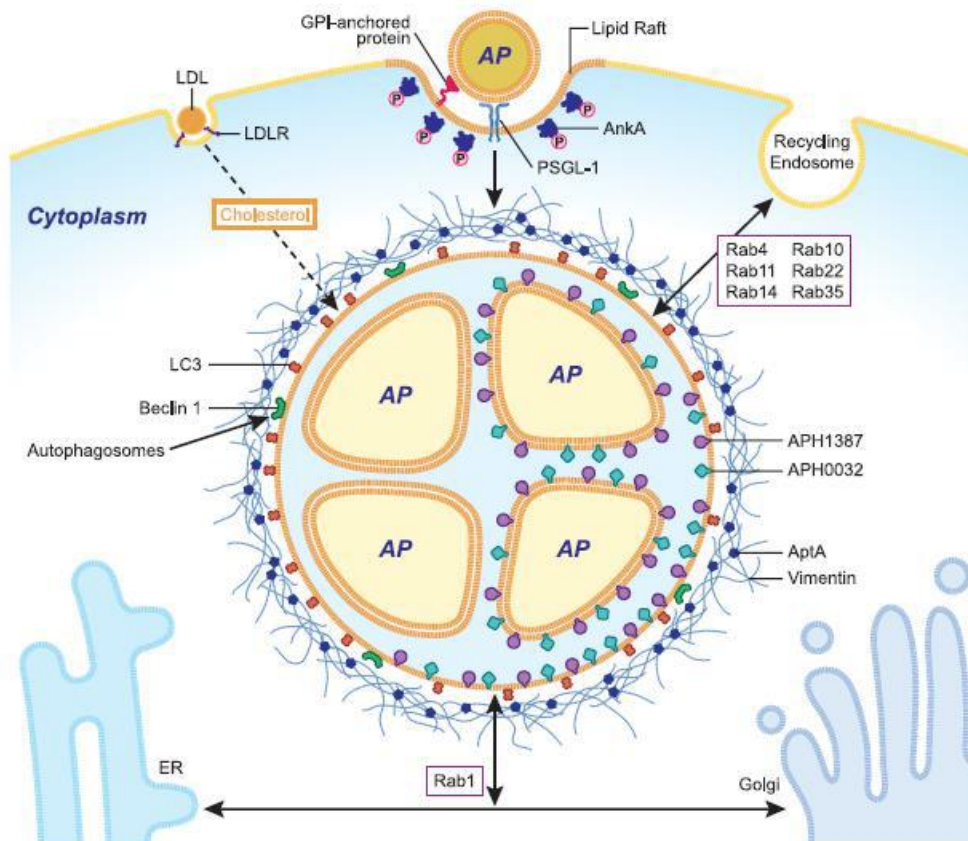
A. phagocytophilum partage les caractères morphologiques du genre *Anaplasma* et infecte les cellules des lignées myéloblastiques granulocytaires des mammifères, notamment les granulocytes neutrophiles et, dans une moindre mesure, les granulocytes éosinophiles. Les corps réticulés ont un diamètre pouvant atteindre 2 µm. Les morulas ne sont pas en contact avec les mitochondries et ont généralement un diamètre compris entre 1,5 et 2,5 µm mais pouvant parfois atteindre 6 µm (Euzéby *et al.*, 2005). Le morphotype réticulé est la forme non infectieuse, répliquative par scission binaire du cycle de développement d'*A. phagocytophilum* tandis que le morphotype en noyau dense est la forme infectieuse, résistante dans l'environnement (notamment à la dessiccation ou aux changements d'osmolarités), et capable de sortir de la cellule de l'hôte pour en infecter une autre (Troese *et al.*, 2011; Woldehiwet et Scott, 1982). *A. phagocytophilum* ne dispose d'aucun gène de biosynthèse du peptidoglycane, contrairement à *A. marginale* ; Hotopp *et al.*, (2006) interprètent cette perte comme un élément facilitateur de l'infection des cellules de l'immunité des hôtes vertébrés. Enfin, *A. phagocytophilum* est dépourvu de gènes de biosynthèse du lipide A : elle ne possède pas de LPS (Lin et Rikihisa, 2003). La membrane externe est donc fragilisée chez cette espèce.

C. Cycle de développement et culture d'*A. phagocytophilum*

A. phagocytophilum se retrouve préférentiellement dans les granulocytes neutrophiles et dans les tissus du système phagocytaire mononucléé qui se composent du foie, de la rate et de la moelle osseuse (Bayard-Mc Neeley *et al.*, 2004). Le cycle de développement de la bactérie se rapproche de celui des *Chlamydiae* impliquant des corps infectants puis des corps élémentaires et réticulés qui composent des morulas. En effet, dans un premier temps, *A. phagocytophilum* pénètre dans le cytoplasme des granulocytes par endocytose. Les protéines majeures de la surface bactérienne impliquées dans l'adhésion du germe à la cellule-hôte sont les protéines MSP2 (p44) tandis que les principaux récepteurs à la surface du granulocyte

neutrophile sont représentés par la protéine PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*) (Figure 1). La forme « corps dense » est la seule forme infectieuse capable de se lier au récepteur de la cellule-hôte. Lors de l'endocytose, les bactéries incorporent le cholestérol de l'hôte, nécessaire à l'internalisation et à la survie de la bactérie dans la cellule-hôte (Rikihisa, 2011).

Figure 1 : Formation des morula d'*Anaplasma phagocytophilum* au sein du cytoplasme du granulocyte neutrophile (source : (Rikihisa, 2011))



A. phagocytophilum se lie à PSGL-1, une protéine à ancrage GPI (*GPI-anchored protein*), ou à un ou plusieurs récepteurs non identifiés de la cellule hôte qui sont localisés dans des microdomaines membranaires riches en cholestérol. Trois voies de transport vésiculaire convergent pendant la formation des inclusions d'*A. phagocytophilum* : les endosomes de recyclage (plusieurs protéines Rab sont concernées), les auto-phagosomes (LC3 et Beclin 1) et les voies d'absorption des LDL (cholestérol libre). Ce processus crée un refuge qui permet à *A. phagocytophilum* d'acquérir des nutriments tout en restant à l'écart des lysosomes et des NADPH oxydases. Trois protéines d'*A. phagocytophilum* sont associées à la membrane d'inclusion : APH1387, APH0032, et APH0233 (également appelée toxine A d'*A. phagocytophilum* ou AptA).

AP, *A. phagocytophilum* ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; LDLR, récepteur LDL ; ER, réticulum endoplasmique.

La phase exponentielle de multiplication d'*A. phagocytophilum* débute dès 12 heures après la pénétration dans la cellule hôte et la lyse dès 36 h post-infection (Troese et Carlyon, 2009). Sa position intra-cytoplasmique lui confère une certaine protection, même si celle-ci

dépend de différentes stratégies lui permettant de survivre et se multiplier dans la cellule-hôte qui seront détaillées dans la partie dédiée à la pathogénie de la bactérie.

A. phagocytophilum est une bactérie intracellulaire stricte dont la culture sur les milieux de culture usuels est très difficile. De plus, son tropisme pour les neutrophiles à courte durée de vie rend sa culture *in vitro* également difficile et très peu de cellules sont connues comme permissives pour assurer la culture de la bactérie. Elle a été cultivée pour la première fois en 1996 sur la lignée HL60 (lignée de promyélocytes leucémiques d'origine humaine non différenciés ou différenciés en granulocytes neutrophiles) (Goodman *et al.*, 1996) mais également à partir de cellules embryonnaires d'*Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus* et de cellules endothéliales d'origines animales (Euzéby *et al.*, 2005).

D. Pathogénicité d'*A. phagocytophilum* au sein des cellules hôtes vertébrés

A. phagocytophilum se multiplie au sein des granulocytes neutrophiles des vertébrés : il lui faut d'échapper au système immunitaire de l'hôte mais également bloquer les mécanismes de défense intracellulaires du neutrophile et pour finir retarder l'apoptose programmée des granulocytes neutrophiles qui ont normalement une durée de vie trop courte pour permettre la multiplication des bactéries.

a. *Échappement à la réponse immunitaire innée.*

A. phagocytophilum ne synthétise pas de LPS car le gène codant le lipide A (un composant majeur du LPS) n'est pas présent dans son génome ainsi que la quasi-totalité des gènes codant les peptidoglycanes (Lin et Rikihisa, 2003). Or, les lipopolysaccharides et les peptidoglycanes sont normalement impliqués dans l'activation du système immunitaire inné de l'hôte.

b. *Echappement à la réponse immunitaire adaptative.*

Chez des espèces hôtes comme le mouton, l'anaplasmose granulocytaire induit une diminution des concentrations sériques en interleukine 2 (IL-2) et en interleukine 4 (IL-4), qui participent à la différenciation des lymphocytes T auxiliaires (LTh) en LTh1 ou LTh2 impliqués respectivement dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire versus humorale (Galindo *et al.*, 2008).

Aussi, dans le cas d'infection à *A. phagocytophilum*, l'échappement à la réponse immunitaire est assuré par une variabilité antigénique de la protéine MSP2 (p44), une protéine de surface contre laquelle l'hôte vertébré produit des anticorps protecteurs. L'analyse des séquences protéiques met en évidence une zone hypervariable d'environ 120 acides aminés, qui fait l'objet de recombinaisons génétiques et met en jeu une centaine de pseudo-gènes à l'origine de variants antigéniques de la protéine MSP2 (p44) (Rikihisa, 2011).

c. Echappement aux autres mécanismes de défenses intracellulaires du neutrophile

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) résultent de la réduction du dioxygène O₂ en anion superoxyde O₂⁻ et sont à l'origine d'un stress oxydatif employé par le système immunitaire pour se défendre contre les microorganismes. Ces ROS sont produits par les cellules phagocytaires de l'organisme (neutrophiles, monocytes notamment) à l'aide de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique formé à la surface du phagosome.

Dans le cas présent, *A. phagocytophilum* est capable de se protéger de ce stress oxydant en détoxifiant les ROS et en empêchant l'assemblage des composants de la NADPH oxydase au sein de la membrane de son phagosome. En effet, la protéine bactérienne AnkA est capable d'interagir avec le génome de la cellule-hôte et ainsi perturber l'expression de gènes de défense de l'hôte codant des composants de la NADPH-oxydase (Rikihisa, 2011).

Il a également été montré *in vitro* que la bactérie retarde l'apoptose des neutrophiles ce qui lui laisse le temps de s'y multiplier et de se propager aux cellules voisines (Borjesson *et al.*, 2005). L'inhibition de cette apoptose est en partie due au transfert de la protéine ATS-1 qui interagit avec la protéine BECLIN-1 de l'autophagie au sein des mitochondries, inhibant l'ancrage de la protéine cellulaire Bax, ce qui inhibe l'apoptose (Niu *et al.*, 2010). En effet, les neutrophiles ont intrinsèquement une durée de vie très courte, leur apoptose survient seulement six à douze heures après leur arrivée dans la circulation sanguine. Or, la multiplication de la bactérie n'est détectable que 24 heures après infection des granulocytes (Ge *et al.*, 2005) ce qui témoigne de sa capacité à inhiber l'apoptose spontanée des cellules hôtes de vertébrés.

d. Détournement des voies métaboliques de la cellule hôte

Après son internalisation, *A. phagocytophilum* se localise dans des vacuoles de la cellule hôte. Afin d'assurer sa survie et sa multiplication, la bactérie va détourner au moins deux voies métaboliques de la cellule hôte à son profit.

L'autophagie est la première voie métabolique détournée par *A. phagocytophilum*. Ce processus catabolique permet d'éliminer et de recycler des composants cellulaires et joue également un rôle important dans l'élimination des agents pathogènes intracellulaires. Le mécanisme de formation de l'autophagosome passe par l'élongation d'une portion de membrane du réticulum endoplasmique de la cellule qui va ensuite se détacher pour envelopper la cible de l'autophagie et fusionner finalement avec des lysosomes. Or, la bactérie est capable d'empêcher la fusion avec le lysosome ce qui permet à la bactérie de rester à l'abri de la destruction tout en contournant la voie de l'autophagie afin de se fournir en nutriments nécessaires à sa croissance dans la vacuole (Niu *et al.*, 2012).

La deuxième voie métabolique de la cellule hôte détournée par *A. phagocytophilum* concerne celle impliquant le cholestérol et les acides aminés. En effet, la bactérie de par son petit génome ne peut pas synthétiser le cholestérol dont elle a pourtant besoin en grande quantité dans sa membrane afin d'en maintenir l'intégrité. Pour pallier cela, la bactérie détourne à son profit la voie lipidique de son hôte. En effet, les cellules hôtes de la bactérie

captent plus de LDL (low density lipoprotein) aboutissant à une concentration de cholestérol deux fois plus importante dans ces cellules que dans celles qui ne sont pas infectées (Rikihiisa, 2011). D'autres nutriments comme des acides aminés sont également détournés par la bactérie. En effet, lorsque le développement des autophagosomes contenant la bactérie est stoppé *in vitro* dans les neutrophiles par l'action de la 3-méthyladénine, cela stoppe également la croissance d'*A. phagocytophilum*. Cependant, l'inhibition de la croissance bactérienne est partiellement levée après supplémentation en acides aminés, ce qui suggère, selon les auteurs, que par le biais de l'autophagosome, des acides aminés sont acheminés par la cellule hôte aux bactéries (Niu *et al.*, 2012).

2. Le cycle de transmission d'*A. phagocytophilum*

Pour bien comprendre le cycle de transmission d'*A. phagocytophilum*, il est important de rappeler les notions d'hôtes, de réservoirs, de vecteurs, de compétence vectorielle et de sensibilité/réceptivité. Ainsi, un hôte, au sens épidémiologique du terme, est un organisme qui héberge un agent pathogène (Toma *et al.*, 2018). Le réservoir d'un agent infectieux est l'habitat dans lequel l'agent vit, se développe et se multiplie normalement. Les réservoirs comprennent les humains, les animaux et l'environnement. Le réservoir peut ou non être la source à partir de laquelle un agent est transféré à un hôte (US Department of health and human Services. Centers for Disease Control and Prevention, 2021). Le vecteur est un arthropode vivant qui peut transmettre de façon active ou passive un agent infectieux d'un animal infecté à un être humain ou à un autre animal (from European Food Safety Authority, s. d.). La compétence vectorielle est définie pour les arthropodes comme l'aptitude à ingérer un agent pathogène, en assurer la multiplication et/ou le développement et le transmettre d'un hôte vertébré à un autre hôte vertébré. L'aptitude d'un arthropode à jouer le rôle de vecteur biologique (ou « vrai » ou encore « actif ») est donc indissociable de sa compétence vectorielle.

De façon plus concrète, dans cette étude, l'agent pathogène est *A. phagocytophilum*, vectorisée par des tiques dures (de la famille des *Ixodidae*), qui transmettent la bactérie aux hôtes réceptifs et sensibles que sont les humains, les équidés, les ruminants domestiques, ou encore les carnivores domestiques. Ces espèces hôtes sont dites « sensibles » à la bactérie car elles expriment cliniquement la maladie. De plus, le(s) cycle(s) d'*A. phagocytophilum* semble(nt) être entretenu(s) par des hôtes réservoirs composés de vertébrés encore mal connus en Europe, dont possiblement l'avifaune.

A. Les acteurs du/des cycles

a. Une bactérie à plusieurs variants

A. phagocytophilum est considérée comme une unique espèce bactérienne admettant plusieurs variants et capable d'infecter un large éventail d'hôtes (Stuen *et al.*, 2013).

- *Variabilité génétique*

Des études phylogénétiques basées sur des techniques de typage moléculaire ont pu mettre en évidence que plusieurs variants coexistaient au sein de cette espèce bactérienne. La diversité génétique d'*A. phagocytophilum* a été étudiée en utilisant différents loci. Par exemple, le gène conservé de l'ARNr 16S a notamment permis de différencier les variants pathogènes et non pathogènes pour l'homme, respectivement Ap-ha et Ap-variant 1 aux EUA (Massung *et al.*, 2002). L'apport des techniques moléculaires en matière de typage de séquences monolocus (gènes *ankA*, *groEL* et *gltA*) et de familles multigéniques (gènes *msp2* et *msp4*) a ainsi permis de distinguer plusieurs souches distinctes de la bactérie avec un tropisme d'hôte(s) distinct. Par ailleurs, on observe parfois que la bactérie circule entre des hôtes partageant des niches écologiques similaires (Stuen *et al.*, 2013).

- *Notion d'écotype*

En biologie, un écotype est un variant engendré par les effets de la sélection au sein d'un biotope particulier et adapté génétiquement à ce biotope. L'analyse phylogénétique des séquences *groEL* obtenues par PCR a permis d'identifier quatre écotypes de la bactérie présentant un tropisme d'hôte(s) différent (Jahfari *et al.*, 2014). Le premier écotype (écotype I) est le plus important en matière de diversité d'hôtes puisqu'il contient le variant bactérien obtenu à partir de tiques *Ixodes ricinus* et *I. pacificus* se nourrissant sur des humains, des chevaux, des chiens, des chats, des sangliers (*Sus scrofa*), des ruminants sauvages, des hérissons (*Erinaceidae*), des rats laveurs (*Procyon lotor*) et des ours (*Ursidae*). Cet écotype a été mis en évidence en Europe, en Amérique du Nord et du Sud. En Europe et en Asie, le deuxième écotype (écotype II) concerne un variant isolé à partir de tiques *I. ricinus* collectées sur des cerfs (*Cervidae*), de bisons d'Europe (*Bison bonasus*) et de ruminants sauvages. Le troisième écotype (écotype III) a été retrouvé en Europe et en Asie à partir de petits mammifères (campagnols (*Muridae*), musaraignes (*Soricidae*) et souris (*Muridae*)) hébergeant les vecteurs tiques *I. trianguliceps* et *I. persulcatus*. Enfin l'écotype IV comprend *A. phagocytophilum* provenant de tiques *Ixodes frontalis* se nourrissant sur des oiseaux originaires d'Europe (Jahfari *et al.*, 2014). Ces résultats indiquent donc une spécialisation d'hôte et suggèrent que l'écotype IV pourrait être adapté à un cycle de vie comprenant exclusivement des oiseaux et des vecteurs propres à ce taxon. Cependant, la technique utilisée n'est basée que sur la variabilité d'un seul gène, ce qui donne une robustesse faible à cette classification. Celle-ci mériterait donc d'être confirmée par des analyses complémentaires.

b. *Les vecteurs*

L'anaplasmose granulocytaire est une maladie non contagieuse, transmissible par l'intermédiaire d'un vecteur biologique, soit un arthropode permettant la transmission active d'un agent pathogène d'un hôte réceptif et/ou sensible à un autre hôte réceptif et/ou sensible.

Dans les habitats naturels, *A. phagocytophilum* est transmis aux hôtes mammifères par les tiques *Ixodidae* généralement du genre *Ixodes*. Les principaux vecteurs de la bactérie sont *I. ricinus* en Europe, *I. scapularis* dans l'est des EUA, *I. pacificus* dans l'ouest des EUA et *I. persulcatus* en Asie et en Russie (Dugat *et al.*, 2015).

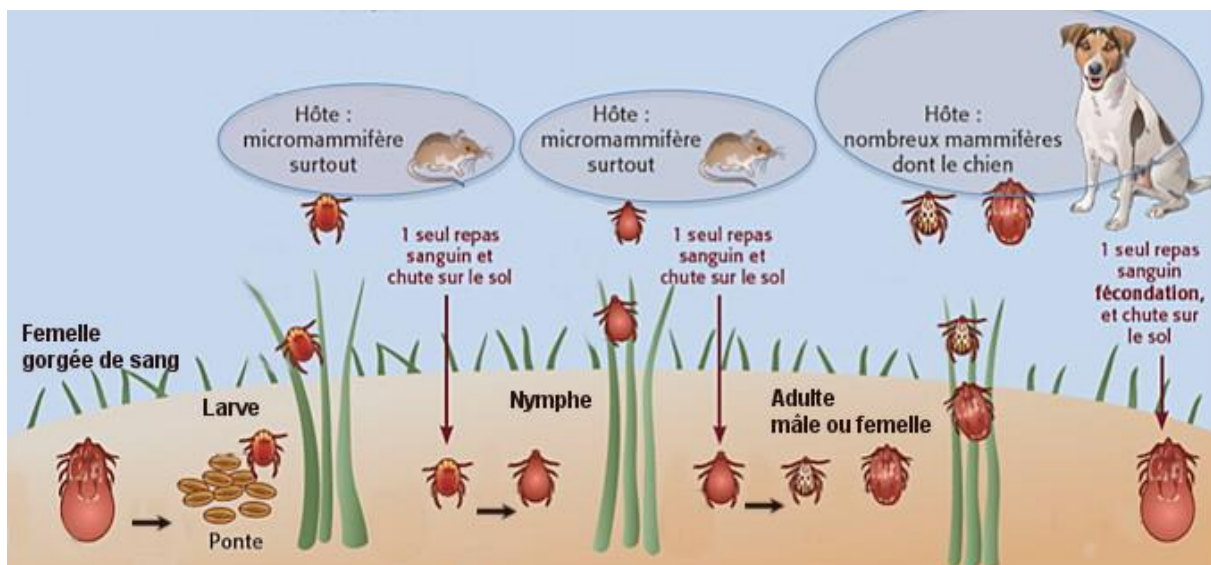
- *Rappel anatomique et cycle biologique du vecteur*

Les *Ixodidae* sont des tiques dures, appelées ainsi en raison de l'écusson chitinisé qu'elles possèdent. La tête se prolonge par le rostre qui porte deux pédipalpes, deux chélicères et un hypostome. Les pédipalpes servent notamment à écarter les poils de l'hôte vertébré. Les chélicères possèdent des crochets et permettent de former des microlésions et de « scier » ainsi la peau jusqu'à l'hypoderme pour laisser pénétrer l'hypostome. Ce dernier forme une gouttière canalisant le passage du sang et porte des denticules dirigées vers l'arrière qui lui permettent de s'ancrer fortement dans l'hypoderme (Bussiéras et Chermette, 1995).

Les tiques sont des arthropodes hématophages vivant en alternance librement dans l'environnement ou fixés à des hôtes vertébrés qu'ils parasitent. Cette fixation est limitée dans le temps (3 à 5 jours pour les larves, 4 à 7 jours pour les nymphes et 7 à 11 jours pour les femelles adultes) tandis que les périodes de vie libre dans l'environnement peuvent s'étendre sur plusieurs mois voire années (Rizzoli *et al.*, 2014).

Les tiques du genre *Ixodes* ont un cycle de vie triphasique et trixène (c'est-à-dire nécessitant trois hôtes successifs) : après accouplement et gorgement sanguin, les femelles pondent leurs œufs qui éclosent pour libérer des larves. Après un repas sanguin, les larves muent en nymphes qui se métamorphosent en tiques adultes mâles et femelles après un dernier gorgement. A l'exception du mâle adulte qui ne se nourrit pas, chaque stade effectue un unique repas sanguin (Figure 2). C'est au cours d'un repas sur un hôte infecté par la bactérie que la tique va absorber *A. phagocytophilum*.

Figure 2 : Les étapes de la vie d'une tique (source : ESCCAP France, s. d.)



Chez les espèces du genre *Ixodes*, la transmission trans-stadiale de la bactérie, à savoir de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte, est observée, contrairement à la transmission transovarienne, signifiant que les œufs d'une femelle adulte infectée ne sont pas porteurs de la bactérie (Rar *et al.*, 2021). La tique infectée peut transmettre l'agent pathogène à un hôte lors d'un nouveau repas sanguin. Chez *Ixodes* spp., chaque stade, à l'exception des œufs, peut donc être infecté mais seules les nymphes et les adultes femelles sont susceptibles de transmettre *A. phagocytophilum*. (Dugat *et al.*, 2015).

- *Ixodes ricinus*, la principale tique vectrice d'*A. phagocytophilum* en Europe

Ixodes ricinus est l'espèce de tique la plus répandue en Europe et le principal vecteur de l'agent pathogène *A. phagocytophilum* (Stuen *et al.*, 2013). C'est une espèce capable de se nourrir sur une gamme d'hôtes vertébrés très large incluant mammifères, reptiles et oiseaux (Rizzoli *et al.*, 2014). Les larves ont une préférence pour les petits mammifères (rongeurs), les nymphes pour des mammifères plus gros (renards (*Vulpes vulpes*), hérissons, carnivores domestiques) et les adultes se fixent préférentiellement sur les grands mammifères (cervidés, sangliers, bovins) (Dugat *et al.*, 2015).

I. ricinus est sensible à la dessiccation lorsque la température excède 30°C et que l'hygrométrie est inférieure à 80 % (Dugat *et al.*, 2015). L'été, la tique utilise différentes stratégies comme se placer sous des feuilles mortes ou s'enfouir légèrement. Ainsi *I. ricinus* trouve dans les sous-bois un environnement lui permettant de satisfaire ses besoins physiologiques en matière d'humidité.

En Europe, la répartition géographique d'*I. ricinus* s'est étendue au cours des dernières années probablement suite à des modifications climatiques et écologiques, essentiellement

associées à des facteurs anthropiques. *I. ricinus* est présente sur la totalité du territoire français, bien que moins abondante au niveau du pourtour méditerranéen et des zones dont l'altitude est supérieure à 1000 m (Rizzoli *et al.*, 2014). Ainsi la faible spécificité du tropisme d'hôte d'*I. ricinus* et sa répartition géographique étendue peuvent expliquer la large dissémination d'*A. phagocytophilum* en Europe.

- *Autres espèces de tiques vectrices en Europe*

L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été identifié chez d'autres espèces de tiques dont entre autres *I. hexagonus*, *I. trianguliceps*, *I. persulcatus* et *I. frontalis* en Europe (Rar *et al.*, 2021). Ces espèces sont susceptibles de jouer un rôle dans la transmission d'*A. phagocytophilum* aux petits mammifères, et ainsi maintenir la bactérie dans le milieu naturel ou participer à des cycles de transmission communs avec d'autres tiques exophiles, disséminées dans des habitats extérieurs divers, la plupart du temps ouverts ou semi-ouverts (forêt, prairies, etc.) telles que *I. ricinus*. Par ailleurs, Dugat *et al.* (2017) ont montré qu'un variant particulier d'*A. phagocytophilum* infecte les bovins en Camargue (France), où *I. ricinus* est censée être rare, voire absente, suggérant que d'autres tiques telles que *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp. et peut-être d'autres espèces encore pourraient être impliquées dans la transmission de ce variant dans cette région de France. Cependant, leur rôle effectif dans la transmission d'*A. phagocytophilum* nécessite d'autres études approfondies. La transmission transovarienne d'*A. phagocytophilum* a été démontrée seulement chez *Dermacentor albipictus* (Rar *et al.*, 2021). Ainsi, les *Ixodes* spp. ne peuvent pas servir de réservoir pour *A. phagocytophilum*, et le rôle des hôtes vertébrés dans le maintien du cycle endémique dans la nature reste crucial.

c. *Les hôtes vertébrés sensibles*

L'anaplasmose granulocytaire à *Anaplasma phagocytophilum* peut toucher de nombreux mammifères domestiques. Elle est ainsi décrite chez les bovins, les ovins, les chevaux, les chiens et les chats. L'anaplasmose granulocytaire peut également toucher l'Homme (Rar *et al.*, 2021).

d. *Les réservoirs*

Du fait de son caractère intracellulaire, le réservoir d'*A. phagocytophilum* est nécessairement un réservoir biologique c'est-à-dire un être vivant ou un ensemble d'êtres vivants capable(s) de maintenir la bactérie dans un environnement viable entre deux saisons d'activité des vecteurs afin de permettre sa transmission à un autre hôte vertébré par le biais du vecteur.

- *Espèces identifiées comme possibles réservoirs d'A. phagocytophilum*

Un large éventail d'animaux sauvages, y compris les ruminants, les rongeurs, les Insectivores, les Carnivores, les rats laveurs, les sangliers et, plus rarement, les oiseaux ou les reptiles, ont été mentionnés comme infectés par *A. phagocytophilum* (Rar *et al.*, 2021). Cependant, certaines espèces ne sont que des hôtes de liaison (également appelés hôte de maintenance ou hôte relais), dans le sens où elles permettent de faciliter la transmission de la bactérie entre les réservoirs sauvages et les hôtes vertébrés sensibles, en particulier lorsque les contacts entre ces deux catégories d'hôtes sont peu fréquents, sans toutefois manifester une quelconque compétence de réservoir (Dugat *et al.*, 2015).

Aux EUA, les souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*), le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), le rat des bois à pieds sombres (*Neotoma fuscipes*), les tamias (*Tamias* spp.), les rats laveurs et les écureuils (*Sciuridae*) constituent les principaux hôtes réservoirs pour des variants distincts d'*A. phagocytophilum* (Rar *et al.*, 2021).

En Europe, un large éventail d'espèces mammaliennes de la faune sauvage (ruminants sauvages, rongeurs, Insectivores, Carnivores, sangliers, etc.) peuvent être infectées par la bactérie, à l'instar du chevreuil (*Capreolus capreolus*) et du cerf élaphe (*Cervus elaphus*) jouant un rôle important en tant qu'hôtes réservoirs (Rar *et al.*, 2021).

De même, en Asie, l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été principalement trouvé chez les ruminants sauvages (cerf sika (*Cervus nippon*), cerf d'eau de Corée (*Hydropotes inermis argyropus*), et chevreuil de Sibérie (*Capreolus pygargus*)), des rongeurs (campagnols, souris, rats (*Rattus* spp.)), tamias et hamsters (*Cricetidae*) et des musaraignes (Rar *et al.*, 2021).

A ce jour, la persistance d'*A. phagocytophilum* chez ces animaux sauvages est insuffisamment étudiée. Des études ont démontré une persistance de la bactérie relativement courte chez les espèces concernées par ces études, soit d'un à trois mois chez les rongeurs.

- *La position des oiseaux dans le cycle de transmission d'A. phagocytophilum*

Les oiseaux sont reconnus comme des acteurs potentiels de la diffusion sur de longues distances des tiques et des maladies transmissibles par ces vecteurs (Hildebrandt *et al.*, 2010). Pour faire face aux risques associés, il est important de comprendre comment les oiseaux réagissent aux infestations de tiques.

Certaines études indiquent que l'avifaune migratrice peut être responsable de la répartition géographique des vecteurs infectés par *A. phagocytophilum* (Hildebrandt *et al.*, 2010 ; Ogden *et al.*, 2008 ; Palomar *et al.*, 2012). Une corrélation entre la contribution des oiseaux à la dispersion de l'agent pathogène et l'augmentation du nombre de cas d'anaplasmoses granulocytaires humaines et animales au cours de la dernière décennie a d'ailleurs été décrite dans la littérature scientifique (Ioannou *et al.*, 2009). Cependant, seules quelques publications ont considéré que les oiseaux pourraient avoir un rôle direct effectif dans l'épidémiologie de la maladie en tant qu'hôtes réservoirs (Ioannou *et al.*, 2009 ; Jahfari *et al.*, 2014 ; Skoracki *et al.*, 2006). Les oiseaux sont plus ou moins réceptifs mais peu sensibles à la bactérie. Ils ne développent pas de signes cliniques et chez certains d'entre eux, des études n'ont pas mis en

évidence d'anticorps spécifiques après contact avec *A. phagocytophilum* (Johnston *et al.*, 2013). La transmission de l'agent pathogène des oiseaux aux tiques a cependant été observée dans d'autres études (Keesing *et al.*, 2012). Comme mentionné précédemment, des analyses menées en Europe ont montré que les génotypes d'*A. phagocytophilum* pouvaient être regroupés en au moins quatre écotypes. Chacun d'entre eux a des caractéristiques géographiques et d'hôte uniques et il est intéressant de noter que l'un des écotypes (écotype IV) est associé uniquement aux oiseaux (Jahfari *et al.*, 2014), ce qui suggère qu'ils pourraient constituer des hôtes réservoirs peu favorables à la transmission de variants d'*A. phagocytophilum* retrouvés chez d'autres espèces de vertébrés. Cependant, comme déjà précisé, cette technique de typage n'est basée que sur un segment du gène groEL.

B. Dynamique de l'infection à *A. phagocytophilum*

a. La contamination du vecteur lors du repas sanguin

- *Transmission d'*A. phagocytophilum* de l'hôte vertébré réceptif au vecteur*

La tique s'infecte au cours d'un repas sanguin sur un hôte vertébré infecté par *A. phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009). Expérimentalement, la transmission de la bactérie d'une souris à pattes blanches infectée par une tique *I. scapularis* intervient un à deux jours après le début du repas sanguin (Hodzic *et al.*, 1998). Cette contamination peut avoir lieu aux stades larvaire, nymphale ou adulte, et perdure d'un stade au suivant en raison de la transmission trans-stadiale (Rar *et al.*, 2021).

L'efficacité de la transmission d'*A. phagocytophilum* de l'hôte au vecteur dépend ainsi de plusieurs facteurs : du niveau de bactériémie de l'hôte, du stade de la tique et de la densité de tiques présentes sur l'hôte. En effet, les expériences d'Ogden *et al.* (2003) suggèrent que la probabilité de transmission d'*A. phagocytophilum* d'un mouton infecté à *I. ricinus* est optimale lors du pic de bactériémie. Le stade de la tique semble également important en termes de probabilité qu'elle se contamine. Des expérimentations ont montré que les larves auraient moins de chance de se contaminer que les nymphes lorsqu'elles font un repas sanguin sur un mouton infecté tandis que la prévalence d'infection des adultes est 2 à 4 fois plus élevée que celles des nymphes (Ogden *et al.*, 2003). Les adultes ont eu un repas supplémentaire de sang par rapport aux nymphes, et cela augmente logiquement les chances de contracter l'infection. D'ailleurs, les taux d'infection rapportés dans de nombreuses études étaient les plus élevés chez les tiques adultes probablement en raison de la possibilité de transmission trans-stadiale (Stuen *et al.*, 2013). Le nombre de tiques en gorgement présentes sur le mouton influence considérablement l'efficacité de la transmission. L'augmentation de leur nombre favoriserait une réponse de type humoral, dont l'effet anti-tique est moins efficace, donc plus permissive pour la transmission d'*A. phagocytophilum*. Enfin cette étude suggère l'existence de mécanismes facilitant la contamination des tiques par la bactérie lorsqu'elles se nourrissent sur un hôte infecté par l'augmentation de la quantité de neutrophiles infectés ingérés lors du repas (Ogden *et al.*, 2003). En effet, au cours du gorgement, les réponses inflammatoires en lien avec les neutrophiles sont modulées par divers stimuli associés aux composés salivaires de la tique. Le détournement des mécanismes de défense de l'animal hôte par le vecteur et la bactérie semble favoriser l'infection et la transmission plutôt que leur contrôle, ce qui entraîne

une augmentation de la disponibilité des cellules infectées dans le sang circulant à l'endroit de la piqûre.

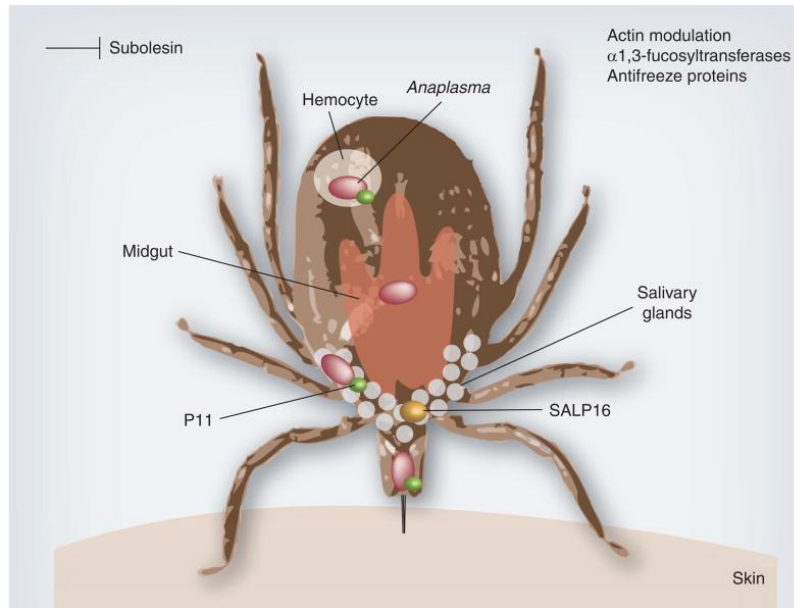
- *D'une tique à l'autre lors d'un co-repas sanguin*

Bien que la prise d'un repas sanguin sur un hôte infecté semble être le mode d'infection le plus fréquent, une autre modalité a été mise en évidence expérimentalement à savoir le « co-feeding » qui correspond à l'infection d'une tique localisée à proximité d'une tique infectée au cours d'un co-repas sanguin sur un animal, en l'absence de bactériémie (Ogden *et al.*, 2003). En effet, des études sur des souris suggèrent que les neutrophiles migrent facilement à l'intérieur de la peau à la suite des lésions causées par les tiques qui s'alimentent, ce qui en fait un mécanisme essentiel de la transmission d'*A. phagocytophilum* lors d'un co-repas sanguin (Labuda *et al.*, 1996). De plus, une diminution de la mobilité des granulocytes neutrophiles infectés et leur marginalisation à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, ont été constatées ce qui permet de maintenir localement la présence intravasculaire de l'agent pathogène, et de ce fait, sa disponibilité pour les tiques encore non infectées qui viennent se nourrir sur l'hôte (Carrade *et al.*, 2009). Ce mode de contamination semble toutefois être rare. Une fois infectée, la tique pourra transmettre (au stade de développement ultérieur) *A. phagocytophilum* à un autre mammifère lors de son prochain repas sanguin.

b. La migration de la bactérie au sein de la tique

Lorsque la tique se nourrit du sang d'un hôte infecté, dans la majorité des cas étudiés, les agents pathogènes pénètrent d'abord dans l'épithélium de l'intestin grêle de la tique, où un premier cycle de réplication a lieu. Ensuite, ils rejoignent les glandes salivaires de la tique au sein des hémocytes dans l'hémolymphe pour envahir les cellules épithéliales (Figure 3). Dans les cellules épithéliales salivaires, les bactéries subissent un deuxième cycle de réplication et sont transmises à l'hôte vertébré lors du repas sanguin suivant. Ces deux cycles de réplication constituent un élément favorisant la transmission d'*A. phagocytophilum* de la tique aux mammifères en augmentant la dose de bactéries injectées lors du repas (Karbowski *et al.*, 2016).

Figure 3 : *A. phagocytophilum* manipule le vecteur tique à son propre avantage (source : Severo et al., 2012)



***A. phagocytophilum* manipule le vecteur tique pour son propre bénéfice. La tique perce la peau (*skin*) à l'aide de son hypostome. Une fois ingérée par le biais d'un repas sanguin, *A. phagocytophilum* atteint l'intestin (*midgut*) et migre ensuite vers les glandes salivaires (*salivary glands*) via les hémocytes (*hemocyte*) permettant la transmission ultérieure à un nouveau vertébré et la continuité de son cycle de vie. Ceci n'est possible que grâce à un schéma orchestré d'expression génétique régulant le développement de l'agent pathogène et la physiologie du vecteur. Pour survivre et perpétuer ce cycle, *A. phagocytophilum* doit non seulement contrôler l'expression de ses propres gènes, mais aussi modifier l'expression des gènes de la tique.**

Par exemple, la protéine P11 des glandes salivaires facilite la colonisation des hémocytes par *A. phagocytophilum* et donc sa migration de l'intestin vers les glandes salivaires de la tique. La protéine salivaire subolésine (*subolesin*) est inhibée par *A. phagocytophilum* car elle régule la réponse immunitaire innée de la tique. *A. phagocytophilum* induit également une phosphorylation de l'actine (*actin modulation*) conduisant à la translocation de la G-actine phosphorylée vers le noyau, ceci régule sélectivement la transcription du gène *salp16*. L'expression de la protéine salivaire SALP16 est ainsi modulée afin de favoriser la migration et la survie de la bactérie dans les glandes salivaires de la tique. Par ailleurs, *A. phagocytophilum* semble réguler à la hausse la production de glycoprotéines antigèle IAFGP (*antifreeze proteins*) favorisant ainsi la survie des tiques à des températures froides.

c. Transmission d'*A. phagocytophilum* du vecteur à l'hôte vertébré réceptif

Les hôtes vertébrés sont infectés suite à la piqûre par une tique infectée. La durée de fixation de la tique nécessaire à l'infection est comprise entre un et deux jours. En effet Hodzic et al. (1998) ont mis en évidence que cette durée était nécessaire à la transmission d'*A. phagocytophilum* à une souris par *I. scapularis*.

La dose infectante pour un hôte vertébré n'est pas connue, et l'espèce hôte elle-même doit probablement jouer un rôle, cependant des études visant à éclaircir ce point ont été menées. En effet, il a été mis en évidence que pour qu'une souris soit infectée, une dose comprise entre 10^4 et 10^5 bactéries *A. phagocytophilum* était nécessaire pour générer des morulas dans

les granulocytes neutrophiles des souris (Hodzic *et al.*, 1998). Des études antérieures indiquent que l'amplitude des réactions cliniques et hématologiques est indépendante de la dose de l'inoculum d'*A. phagocytophilum*, cependant, la période d'incubation peut être plus longue avec une faible dose infectante. Il suffit toutefois d'une seule cellule infectée par *A. phagocytophilum* pour transmettre l'infection (Stuen et Artursson, 2000).

d. **Autres modes de transmission d'*A. phagocytophilum***

D'autres modes de transmission secondaires pourraient exister. Chez les humains, des cas de transmission périnatale ont été rapportés (Horowitz *et al.*, 1998). En Chine, neuf patients en contact direct avec des sécrétions sanguines ou respiratoires d'un humain décédé d'anaplasmose granulocytaire ont été diagnostiqués malades de l'HGA (par PCR et séroconversion) suggérant une probable transmission nosocomiale (Zhang *et al.*, 2008). Des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine ont été suspectés dans le cas de bouchers en contact avec des carcasses de daims (*Dama dama*). L'hypothèse d'une transmission par effraction cutanéomuqueuse avait été émise avant que des études récentes ne montrent que la souche affectant les daims aux EUA semble distincte de celle affectant les humains (Massung *et al.*, 2005). Cela suggère que ces personnes ont davantage été contaminées après piqûre de tiques (sans s'en rendre compte) qu'au cours de la manipulation des carcasses de daims. Enfin, la maladie serait transmissible par transfusion sanguine (Kemperman *et al.*, 2008).

Chez les bovins, la possibilité d'une transmission transplacentaire a été documentée (Henniger *et al.*, 2013). Après avoir ingéré du colostrum contaminé expérimentalement par *Anaplasma phagocytophilum*, des veaux ont également présenté des signes cliniques de la maladie (Pusterla *et al.*, 1998).

e. **La dissémination de l'infection au sein de populations d'hôtes**

Les bactéries intracellulaires obligatoires ont généralement une taille de population effective inférieure à celle de leurs homologues se multipliant de façon autonome, en raison des contraintes que représente l'espace cellulaire nécessaire à leur croissance, le nombre de cellules pouvant être infectées et la disponibilité d'hôtes compétents (Toft et Andersson, 2010). La densité des populations hôtes, les interactions entre elles et les réponses immunitaires peuvent également varier au sein des espèces qu'*A. phagocytophilum* est capable d'infecter (Stuen *et al.*, 2013). Cette variation de la gamme d'hôtes peut également influencer la taille effective des populations hôtes et les niveaux de diversité génétique observés entre les souches (Roche *et al.*, 2012).

Dans le cas d'*A. phagocytophilum*, les processus évolutifs qui se sont opérés sur les différents variants de la bactérie ont été influencés par la taille effective des populations de chaque variant, qui à son tour a probablement été affectée par l'écologie et les densités des populations d'hôtes compétents (Aardema et von Loewenich, 2015). La dissémination de cet agent pathogène au sein de ces populations d'hôtes dépend donc de la présence de la bactérie elle-même, de celle des hôtes réceptifs et sensibles, de celle des vecteurs compétents

pour la transmission et de conditions favorables à l'expression de cette compétence. Ainsi, l'augmentation de la taille de la population de vecteurs et d'hôtes, ainsi que l'accroissement de leurs zones de répartition, permet à la bactérie de coloniser de nouvelles aires géographiques.

f. ***Infections concomitantes***

Des travaux ont montré des co-infections fréquentes des hôtes vertébrés par *A. phagocytophilum* et d'autres agents pathogènes de maladies transmissibles par les tiques. A titre d'exemple, aux EUA, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, l'agent de la maladie de Lyme, est transmis par la même espèce de tique et présente les mêmes rongeurs réservoirs qu'*A. phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009). Des traces moléculaires de plusieurs agents pathogènes dont *A. phagocytophilum* chez les tiques et les oiseaux suggèrent fortement que la transmission simultanée de différentes espèces de bactéries peut avoir lieu et que les oiseaux sont permissifs à une infection par de multiples agents pathogènes (Heylen *et al.*, 2017).

3. Epidémiologie descriptive de l'infection par *A. phagocytophilum*

A. Chez les vecteurs

a. Infection par *A. phagocytophilum* de tiques collectées dans l'environnement ou sur des hôtes vertébrés réceptifs

Les principaux vecteurs d'*A. phagocytophilum* sont *Ixodes scapularis* (dans l'Est des EUA), *Ixodes pacificus* (dans l'Ouest des EUA), *Ixodes ricinus* (en Europe) et *Ixodes persulcatus* (en Asie). L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été trouvée avec des taux de prévalence de 1 % à 50 %, 1 % à 10 %, 1 % à 20 % et 1 % à 22 % chez *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus* et *I. persulcatus*, respectivement (Stuen *et al.*, 2013).

Les différences importantes relatives à ces taux de prévalence dépendent non seulement de l'emplacement géographique, mais peuvent également refléter des variations saisonnières ou annuelles, ainsi que des méthodes d'échantillonnage, de stockage et de détection différentes.

Rar *et al.* (2021) ont relevé la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez d'autres *Ixodes* spp., y compris *I. ventralloi* au Portugal, *I. pavlovskyi* en Russie, *I. nipponensis* en Corée et chez des tiques appartenant à d'autres genres : *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* ou encore *Hyalomma* (Dugat *et al.*, 2017). Cependant, leur rôle effectif dans la transmission d'*A. phagocytophilum* nécessite d'autres études approfondies.

Par ailleurs, *A. phagocytophilum* a été identifié dans des tiques nidicoles (vivant dans des habitats abrités (terriers, nids, grottes, etc.) et collectées sur des hôtes, dont *I. hexagonus* et *I. trianguliceps* en Eurasie ou encore *I. angustus*, *I. spinipalpis*, *I. ochotonae*, *I. woodi* et *I. dentatus* aux EUA (Rar *et al.*, 2021). Malgré tout, ces tiques sont peu susceptibles de jouer un rôle important dans la transmission de la bactérie à l'homme ou aux grands animaux, mais elles peuvent contribuer à son maintien dans le milieu naturel ou participer à des cycles de transmission communs avec d'autres tiques exophiles.

b. Infection par *A. phagocytophilum* de tiques collectées à partir de l'avi-faune

Certaines études ont été menées sur l'ADN d'*A. phagocytophilum* obtenu à partir de vecteurs prélevés sur des oiseaux : les résultats sont repris dans un tableau récapitulatif selon l'année de publication et le continent d'étude, disponible dans l'Annexe 1. Dans cette Annexe 1 figurent également les effectifs des oiseaux et des tiques, les méthodes d'échantillonnage, les techniques moléculaires employées pour détecter l'ADN de la bactérie dans les tissus du vecteur et les démarches réalisées pour confirmer ou infirmer les résultats.

Il en ressort que l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été identifiée dans des tiques nidicoles telles que *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. nipponensis*, et *I. frontalis*, collectées sur des hôtes aviaires en Europe, Amériques et Asie, avec des prévalences pouvant atteindre 6 % (Annexe 1). Ceci confirme que les oiseaux migrateurs peuvent être responsables de la dissémination des vecteurs potentiellement infectés par *A. phagocytophilum* (Hildebrandt *et al.*, 2010 ; Ogden *et al.*, 2008 ; Palomar *et al.*, 2012).

B. Chez les hôtes vertébrés sensibles

a. L'anaplasmose granulocytaire humaine

Selon la dernière revue de Rar *et al.* (2021) compilant les études des vingt dernières années sur *A. phagocytophilum*, 15 000 cas d'anaplasmose granulocytaire humaine (HGA) ont été identifiés entre 2001 et 2015 aux EUA.

En Europe, l'incidence des cas déclarés est plus faible et ne dépasse pas 300 cas au total entre 2004 et 2019. Cette différence ne peut pas être expliquée par la seule différence de prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les tiques aux EUA et en Europe mais est aussi notamment imputable à une prévalence différente des souches à potentiel zoonotique (Matei *et al.*, 2019).

Toujours selon Rar *et al.* (2021), plusieurs cas de HGA ont été signalés dans d'autres régions géographiques : au Canada, en Russie, en Chine, à Taiwan, en Corée du Sud et au Japon. Bien que le nombre de cas soit faible dans tous les pays, à l'exception des EUA, la séroprévalence est élevée chez les humains. Les anticorps dirigés contre *A. phagocytophilum* ont été trouvés chez 2 % à 28 % de la population testée dans les pays européens et chez 2 % à 18 % en Asie. Parallèlement, aux EUA, des anticorps contre *A. phagocytophilum* ont été

défectés chez 11 à 15 % des échantillons testés (Rar *et al.*, 2021). La différence constatée entre la séroprévalence et l'incidence de l'HGA peut s'expliquer par un diagnostic incomplet (alors que celui-ci doit être basé sur les signes cliniques, les antécédents du patient - comme par exemple une piqûre récente de tique, une exposition à des zones où les tiques sont susceptibles d'être trouvées, ou un antécédent de voyage récent dans des zones où *A. phagocytophilum* est endémique - et être étayé par des tests de confirmation en laboratoire), un taux élevé d'infections asymptomatiques et/ou une réactivité croisée entre *A. phagocytophilum* et d'autres bactéries (Matei *et al.*, 2019).

b. L'anaplasmose granulocytaire des animaux domestiques

Chez les animaux domestiques, *A. phagocytophilum* est également responsable de maladies appelées anaplasmose granulocytaire, appelée « *Tick borne fever* » (TBF) dans le cas des ruminants, dès sa découverte.

La TBF est la plus largement répandue en Europe, où elle représente une grave menace pour l'élevage. En outre, la TBF a été répertoriée en Afrique et en Asie (Rar *et al.*, 2021) mais n'a pas été décrite chez les bovins ou les petits ruminants aux EUA (Woldehiwet, 2010). En Europe, les ruminants domestiques sont infectés par *A. phagocytophilum* avec des taux de séroprévalence allant jusqu'à 20 % chez les bovins, 37 % chez les ovins, et 5,6 % chez les caprins (Rar *et al.*, 2021 ; Stuen *et al.*, 2013 ; Woldehiwet, 2010).

Contrairement à la TBF, l'anaplasmose granulocytaire équine (EGA) a été signalée dans le monde entier, notamment aux EUA, au Canada, en Amérique du Sud, en Europe, en Asie et en Afrique (Rar *et al.*, 2021). Chez les chevaux, la séroprévalence varie jusqu'à 80 % cependant les études ont porté sur des chevaux présentant des signes cliniques d'EGA. En l'absence de tout signe clinique, la séroprévalence chez les chevaux était inférieure à 6,7 % (Stuen *et al.*, 2013).

L'anaplasmose granulocytaire chez le chien est également largement répandue aux EUA, en Amérique du Sud, en Europe, en Asie et en Afrique tandis que chez le chat, elle est rapportée à ce jour aux EUA et en Eurasie (Rar *et al.*, 2021). En Europe, les chiens étaient positifs pour l'ADN d'*A. phagocytophilum* à une prévalence d'environ 1 à 6 %, qu'ils présentent ou non des signes cliniques. Par comparaison, ces taux sont beaucoup plus faibles chez les chats, inférieurs à 0,5 % (Stuen *et al.*, 2013).

C. Chez les hôtes vertébrés réceptifs

a. Infection par *A. phagocytophilum* dans la faune sauvage hors avifaune

Un large éventail d'animaux sauvages peuvent être infectés par *A. phagocytophilum* (Rar *et al.*, 2021). Cependant, à ce jour, la persistance d'*A. phagocytophilum* chez ces animaux sauvages est insuffisamment étudiée.

Aux EUA, le cerf de Virginie est positif à l'ADN d'*A. phagocytophilum* à une prévalence allant jusqu'à 46,6 % tandis que la détection d'*A. phagocytophilum* chez des ruminants sauvages est encore rare. En Europe, le cerf élaphe et le chevreuil présentent des prévalences pour l'ADN d'*A. phagocytophilum* atteignant 87,5 % et 98,9 % respectivement (Stuen *et al.*, 2013). Cette prévalence monte jusqu'à 72 % chez le daim européen (*Dama dama*) (Stuen *et al.*, 2013). La bactérie a également été identifiée chez des espèces de cervidés en Asie, à savoir le cerf sika et le cerf d'eau avec des taux de prévalence pour l'ADN d'*A. phagocytophilum* atteignant jusqu'à 50 % et 63,6 %, respectivement (Stuen *et al.*, 2013). Cependant, les études qui ont été menées en Asie sur les ruminants sauvages ne permettent pas de tirer des conclusions définitives sur la distribution d'*A. phagocytophilum* sur ce continent étant donné qu'elles ne concernent actuellement que quatre pays (Russie, Chine, Japon et Corée du Sud).

L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été trouvé chez différentes souris, campagnols et autres rongeurs aux EUA, en Europe et en Asie (Stuen *et al.*, 2013). Cependant, dans plusieurs études sur les rongeurs en Europe, les prévalences étaient si faibles que le rôle de réservoir pour ce taxon reste incertain sur ce continent. A titre d'exemple, l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été détecté chez moins de 1 à 15 % des mulots à collier (*Apodemus flavicollis*), chez moins de 1 à 11 % des souris des bois (*Apodemus sylvaticus*), chez 5 à 19,2 % des campagnols roussâtres (*Myodes glareolus*) (Stuen *et al.*, 2013). Plus récemment Matei *et al.* (2018) ont mis en évidence l'ADN d'*A. phagocytophilum* chez de nouvelles espèces de micromammifères en Roumanie, pour certaines à très faible fréquence tels que la musaraigne commune (*Sorex araneus*) à 9,1 %, le mulot pygmée (*Apodemus uralensis*) à 4,8 %, le souslik d'Europe (*Spermophilus cittalus*) à 7,1 %, le campagnol agreste (*Microtus agrestis*) à 3,9 %, la musaraigne pygmée (*Sorex minutus*) à 3,9 %, le muscardin (*Muscardinus avellanarius*) à 3,1 %, la musaraigne des jardins (*Crocidura suaveolens*) à 2,4 %, la souris glaneuse (*Mus spicilegus*) à 2% et le campagnol des champs (*Microtus arvalis*) à 1,8 %. A l'inverse, dans l'Est des EUA, la souris à pattes blanches est considérée comme l'un des principaux hôtes réservoirs pour le variant pathogène humain (Ap-ha) (Massung *et al.*, 2003). L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été retrouvé à une prévalence d'environ 11,4 à 46,8 % chez cette espèce. Elle est l'hôte prédominant dans les habitats forestiers de l'Est et du Centre des EUA et l'un des principaux hôtes des stades larvaires d'*I. scapularis* de la région. Outre la souris à pattes blanches, l'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* a été détecté chez plusieurs espèces de rongeurs comme les campagnols et les tamias dans l'Est des EUA, les souris et les rats de Floride et plusieurs espèces de souris, de tamias et d'écureuils, ainsi que le rat des bois à pieds sombres dans l'Ouest des EUA. Les prévalences variaient de 1,8 à 88,4 % (Stuen *et al.*, 2013). L'écureuil gris (*Sciurus carolinensis*), le tamia roux (*Tamias ochrogenys*) et les autres rongeurs sciuridés sont considérés comme des hôtes réservoirs importants pour *A. phagocytophilum* dans l'ouest des EUA (Stuen *et al.*, 2013). En Asie, les taux de prévalence relativement élevés chez les petits mammifères suggèrent également une fonction de réservoir pour ce groupe de mammifères. Par

exemple, en Chine, les souris des bois échantillonnées ont présenté des taux de prévalence pour l'ADN d'*A. phagocytophilum* allant jusqu'à 10 %, le mulot coréen (*Apodemus peninsulae*) jusqu'à 25 % et le mulot à rayures noires (*Apodemus agrarius*) jusqu'à 20,8 % (Stuen *et al.*, 2013) faisant de ces derniers l'un des principaux hôtes réservoirs dans les pays asiatiques. Tout récemment, Duan *et al.* (2022) ont également identifié pour la première fois l'ADN d'*A. phagocytophilum* chez des marmottes de l'Himalaya (*Marmota himalayana*) à des prévalences comprises entre 19,2 et 24,6 %. Ces dernières s'ajoutent à la liste des hôtes réservoirs possibles de la bactérie en Asie.

Il y a très peu d'études publiées sur le rôle des insectivores dans le cycle de vie d'*A. phagocytophilum*. Stuen *et al.* (2013) relèvent que la musaraigne commune a été évoquée comme hôte réservoir potentiel de la bactérie au Royaume-Uni après que l'ADN de cette dernière eût été retrouvé chez 18,7 % des individus testés. D'autres insectivores ont été étudiés en Europe : la grande musaraigne à dents blanches (*Crocidura russula*) et le hérisson européen (*Erinaceus europaeus*). L'ADN d'*A. phagocytophilum* a également été détecté chez des musaraignes à queue courte (*Blarina brevicauda*) avec une prévalence de 17,2 % aux EUA et chez des musaraignes asiatiques à dents blanches avec une prévalence de 63,6 %. La détection de l'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les insectivores était généralement fréquente, avec des taux de prévalence moyens se situant autour de 20 %, et pouvant atteindre plus de 80 % (Stuen *et al.*, 2013). Cependant, la détermination du rôle précis des insectivores dans le cycle de vie d'*A. phagocytophilum* nécessite des investigations plus poussées.

Il existe plusieurs autres espèces de vertébrés chez lesquelles l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été détecté. Parmi ces animaux se trouvent les mammifères tels que les sangliers, les renards, et les ours, mais aussi les reptiles. Cependant, les cycles épidémiologiques en cause ne sont pas clarifiés actuellement. Les prévalences chez ces espèces animales semblent similaires à celles observées chez les hôtes réservoirs potentiels décrits ci-dessus, mais les études ont été très peu nombreuses et une conclusion définitive n'est pas encore possible. Aux EUA, les rats laveurs et les écureuils gris se sont avérés être des hôtes compétents pour *A. phagocytophilum*, en étant infectés naturellement à partir des tiques *I. scapularis* et en étant capables de transmettre la bactérie à ces dernières lors de leur gorgement (Levin *et al.*, 2002), tandis que le sanglier a récemment été considéré comme un hôte pour les variants pathogènes humains d'*A. phagocytophilum* en Europe (Stuen *et al.*, 2013), sans que cette hypothèse n'ait été confirmée. Etant donné que les sangliers sont particulièrement abondants en Europe, ils pourraient être utilisés comme animaux sentinelles pour détecter les infections à *A. phagocytophilum*, notamment les souches connues pour être infectieuses pour l'homme, pour autant que la réalité d'une prévalence élevée d'infection soit attestée.

b. Infection de l'avifaune par *A. phagocytophilum*

Très peu d'études sont disponibles sur la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans l'avifaune : les résultats sont repris dans un tableau récapitulatif selon l'année de publication et le continent d'étude, disponible dans l'Annexe 2. Dans cette Annexe figurent également les effectifs des oiseaux, les méthodes d'échantillonnage pour construire l'échantillon, les techniques moléculaires employées pour détecter l'ADN de la bactérie dans les tissus des oiseaux et les démarches réalisées pour confirmer ou infirmer les résultats.

Il en ressort que l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été identifié chez les hôtes aviaires en Europe, en Amérique et en Asie, avec des taux de prévalence pouvant atteindre respectivement 4,6 %, 14 % et 4,4 % (Annexe 2). Ceci confirme que les oiseaux sont des hôtes réceptifs à la bactérie et qu'ils développent une bactériémie à la suite de l'infection par *A. phagocytophilum*. Leur implication en tant qu'hôtes réservoirs a déjà été avancée dans une étude antérieure (Keesing *et al.*, 2012) qui a montré une transmission de la bactérie de l'oiseau à la tique.

Au cours de l'expérience de Keesing *et al.* (2012), 81 oiseaux issus de quatre espèces différentes (grive fauve (*Catharus fuscescens*), moqueur chat (*Dumetella carolinensis*), grive des bois (*Hylocichla mustelina*) et merle d'Amérique (*Turdus migratorius*)) ont été capturés dans leur habitat naturel et placés trois jours en captivité afin de collecter un minimum de dix tiques par oiseau, tombées après la phase de gorgement. Les individus pour lesquels dix tiques n'ont pu être recueillies dans les 3 jours, ont été infestés avec des larves de tiques d'*I. scapularis* non nourries et en théorie exemptes d'*A. phagocytophilum* (puisque aucune preuve ne fait état d'une transmission transovarienne de la bactérie ou de l'infection des tiques au stade larvaire préalablement à leur gorgement). Ces hôtes qui avaient été infestés ont alors été maintenus en captivité pendant 4 jours supplémentaires et les tiques gorgées ont été collectées chaque jour. L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été recherché dans chacune des tiques et a été retrouvé chez celles préalablement attachées aux hôtes et celles mises en contact avec les oiseaux au cours de l'expérience, suggérant fortement une transmission de la bactérie de l'oiseau à la tique. Par ailleurs, la « compétence de réservoir » pour chaque espèce aviaire a été calculée comme étant le pourcentage moyen de tiques infectées par hôte de l'espèce en question. Les quatre espèces d'oiseaux présentaient des niveaux moyens de « compétence de réservoir » allant de 6 à 18 %. Les résultats sont repris détaillés dans le Tableau 2. Même si une inférence à la compétence de ces espèces semble difficile à accrédi-ter, cette étude reflète la capacité d'oiseaux appartenant à ces espèces à s'infecter et à re-transmettre *A. phagocytophilum* à des tiques dans des conditions mimant celles d'une transmission naturelle.

Tableau 2 : Hôtes aviaires testés et infectés par *A. phagocytophilum* pour évaluer leur capacité à s'infecter et transmettre la bactérie à des tiques, Sud-Est de l'Etat de New York, EUA, 2008-2010 (source : modifié d'après Keesing *et al.* (2012))

Hôtes aviaires testés pour <i>A. phagocytophilum</i> pour évaluer la compétence de réservoir			
Nom commun	Nombre d'hôtes testés	Nombre de tiques testées	Nombre moyen de tiques échantillonnées par hôte (intervalle)
Grive fauve	21	427	20,3 (10 - 25)
Moqueur chat	14	235	16,8 (9 - 24)
Grive des bois	28	496	17,7 (10 - 24)
Merle d'Amérique	18	321	17,8 (8 - 24)
Hôtes aviaires infectés par <i>A. phagocytophilum</i> pour évaluer la compétence de réservoir			
Nom commun	Nombre d'hôtes infectés/nombre testés (%)	Nombre de tiques infectées (%)	Nombre moyen de tiques infectées par hôte infecté (intervalle)
Grive fauve	9/21 (43)	19 (4)	10 (4 - 25)
Moqueur chat	7/14 (50)	20 (9)	18 (4 - 33)
Grive des bois	14/28 (50)	27 (5)	10 (4 - 25)
Merle d'Amérique	6/18 (33)	7 (2)	6 (4 - 11)

4. Etude clinique, paraclinique et lésionnelle de l'infection par *A. phagocytophilum* ...

Les signes cliniques et les modalités et la durée de persistance de la bactérie au sein d'un hôte sont très variables selon l'espèce, la sensibilité naturelle de l'individu et le variant d'*A. phagocytophilum* impliqué (Foggie, 1951 ; Granquist *et al.*, 2010b ; Stuen *et al.*, 2011). Des infections expérimentales menées sur des cerfs élaphe et des souris ont également révélé l'existence d'une variation de virulence entre les variants de la bactérie, probablement en raison d'une différence de sensibilité au sein des hôtes (Massung *et al.*, 2003 ; Stuen *et al.*, 2001). Par ailleurs, chez les espèces réceptives mais non sensibles des éléments paracliniques peuvent être présents justifiant leur présentation dans cette partie.

A. Au sein des espèces sensibles

a. *Manifestations cliniques, paracliniques et lésionnelles de l'anaplasrose granulocytaire humaine (HGA)*

Les manifestations cliniques de l'HGA varient d'une maladie fébrile (température corporelle supérieure à 38 °C) à une fièvre sévère (> 40 °C), deux à trois semaines après l'exposition à l'agent pathogène et comprennent des céphalées et des myalgies. Les anomalies de laboratoire les plus fréquemment associées sont la thrombocytopénie, la leucopénie, l'anémie et des taux sériques élevés d'enzymes hépatiques (aspartate transaminase et alanine aminotransférase). Dans de rares cas, une méningite, une encéphalite et un infarctus cérébral pouvant aller jusqu'à la mort ont été signalés. Les personnes décédées d'HGA présentaient des organomégalies (splénomégalie, hépatomégalie) et des lymphadénopathies (Matei *et al.*, 2019).

b. *Manifestations cliniques, paracliniques et lésionnelles chez les animaux domestiques (ruminants, ovins, chevaux, chiens et chats)*

- *Les ruminants*

Les signes les plus caractéristiques exprimés par les ruminants domestiques sont une fièvre élevée supérieure à 41°C - variable selon l'espèce hôte, l'âge, le statut immunologique et le type de variant d'*A. phagocytophilum* impliqué (Stuen *et al.*, 2013) – une anorexie et une baisse du rendement laitier.

La TBF peut se caractériser par une fièvre, une anorexie, un avortement, une baisse de la fertilité (chez les béliers), une baisse de la production laitière (chez les brebis) ou une réduction du gain de poids chez les agneaux infectés par *A. phagocytophilum* (Stuen *et al.*, 2013).

L'infection par *A. phagocytophilum* chez les bovins peut se manifester cliniquement par des signes majeurs (fièvre de quelques jours après une semaine d'incubation, chez tous les bovins quels que soient l'âge et le sexe ; une chute de production chez les laitières ; des avortements chez les femelles en fin de gestation) et des signes cliniques modérés ou inconsistants (œdème des membres et difficultés à se déplacer, troubles respiratoires) (Brun-Hansen *et al.*, 1998).

Les examens complémentaires peuvent révéler une anémie modérée, une leucopénie, une neutropénie marquée et une thrombocytopénie (Stuen *et al.*, 2013).

L'anaplasrose granulocytaire chez les ruminants domestiques se caractérise macroscopiquement par une splénomégalie et une adénomégalie généralisées. Les lésions histologiques consistent principalement en une infiltration neutrophilique de la rate, une inflammation interstitielle modérée du poumon, une infiltration lymphocytaire interstitielle périportale du foie, ainsi qu'une hyperplasie folliculaire et parafolliculaire des nœuds lymphatiques. Des lésions inflammatoires des reins et du cerveau peuvent être associées (Campbell *et al.*, 1994).

- *Chevaux*

L'EGA est une maladie fébrile aiguë avec une période d'incubation moyenne d'une à deux semaines. Un certain nombre de signes cliniques ont été répertoriés chez les chevaux, tels que fièvre, anorexie, dépression, apathie, présence d'un œdème distal, réticence à bouger et pétéchies (Rar *et al.*, 2021).

Les examens de laboratoire peuvent mettre en évidence une thrombocytopénie, une anémie et une leucopénie. Les lésions caractéristiques de l'anaplasmosse granulocytaire équine sont des pétéchies, des ecchymoses et des œdèmes dans les tissus sous-cutanés et les fascias, principalement dans les jambes. Une pneumopathie interstitielle a été signalée chez certains animaux (Center for Food Security and Public Health, 2013).

- *Carnivores domestiques*

L'anaplasmosse granulocytaire chez les chiens est caractérisée par une fièvre, une dépression, une boiterie, une anorexie, une léthargie, une hyperesthésie, une conjonctivite, une myalgie, une arthralgie, ou encore une incoordination (Stuen *et al.*, 2013). Une thrombocytopénie modérée, une lymphopénie, une anémie légère et une activité élevée de la phosphatase alcaline sérique sont également fréquentes (Woldehiwet, 2010). Les modifications histologiques sont légères et peuvent concerner les nœuds lymphatiques, la rate, du foie (infiltration lymphohistiocytaire, hyperplasie...), la moelle osseuse (plasmocytose et histiocytose) et des poumons (infiltration interstitielle) (Carrade *et al.*, 2009).

Chez les chats infectés, les signes cliniques sont souvent similaires à ceux des chiens et comprennent également : léthargie, anorexie, fièvre, conjonctivite et déshydratation. Les analyses de laboratoire font état d'une thrombocytopénie, d'une anémie, d'une leucopénie ou d'une leucocytose. Enfin, l'histologie révèle des lésions de lymphadénomégalie, d'hépatomégalie et de splénomégalie (Schäfer et Kohn, 2020).

B. Au sein des espèces réceptives mais considérées comme non sensibles

a. Faune sauvage hors avifaune

Les manifestations cliniques, paracliniques et lésionnelles chez la faune sauvage ont fait l'objet de peu de publications scientifiques d'autant que les espèces en question sont des espèces réceptives mais peu (clinique très faiblement marquée) ou pas sensibles. A titre d'exemple, l'infection expérimentale de trois cerfs élapes naïfs de 8 mois par du sang de mouton infecté par *A. phagocytophilum* a provoqué, après une semaine d'incubation, une fièvre modérée associée à une neutropénie chez deux d'entre eux pendant une journée. Aucune autre manifestation clinique ou paraclinique n'a été détecté (Stuen *et al.*, 2001).

b. Avifaune

Des études ont suggéré que les oiseaux pourraient représenter un réservoir compétent pour *A. phagocytophilum* (Keesing *et al.*, 2012) mais très peu se sont focalisées sur la sensibilité des hôtes aviaires infectées par cet agent pathogène.

Dans une étude contrôlée en laboratoire sur deux espèces aviaires (merle d'Amérique et moqueur chat) infectées par *A. phagocytophilum* suite à des contacts avec des nymphes d'*I. scapularis* infectées, Johnston *et al.* (2013) ont montré que les oiseaux ne développaient pas de signes manifestes de la maladie (hormis une fièvre non imputable spécifiquement à *A. phagocytophilum* durant les 3 à 5 jours d'exposition à des nymphes d'*I. scapularis* infectées par la bactérie – voir détails ci-dessous), ni de séroconversion dirigée contre la bactérie (voir détails ci-après) signifiant que les enquêtes sérologiques aviaires peuvent ne pas être forcément un indicateur fiable d'exposition à *A. phagocytophilum*.

D'après Johnston *et al.* (2013), la résistance des oiseaux à *A. phagocytophilum* pourrait être due à la réponse immunitaire innée de l'hôte qui fait intervenir la fièvre par voie de conséquence. L'expérience a révélé que sur les trois groupes d'oiseaux de l'étude (1 – oiseaux non exposés à des nymphes ; 2 - oiseaux exposés à des nymphes non infectées par *A. phagocytophilum* et 3 - oiseaux exposés à des nymphes infectées par *A. phagocytophilum*), seuls les groupes 2 et 3 de l'espèce moqueur chat ont présenté une augmentation significative (1,3°C) de leur température corporelle pendant la période d'exposition par rapport à ceux du groupe non exposés aux nymphes (groupe 1). Cependant, les températures corporelles des oiseaux du groupe 2 (nymphes non infectées) et du groupe 3 (nymphes infectées par *A. phagocytophilum*) n'étaient pas significativement différentes entre-elles, le temps de l'exposition. Concernant l'espèce merle d'Amérique, les trois groupes ne présentaient pas de différences significatives de température corporelle au cours de l'exposition aux nymphes. Cela suggère donc que la fièvre, qui n'est pas systématiquement présente, peut survenir chez les oiseaux dans le cadre de la réponse immunitaire innée sans infection systémique en étant simplement induite par la piquûre de tiques et les produits libérés par la salive (Adelman *et al.*, 2010).

Toujours selon Johnston *et al.* (2013), la résistance des oiseaux à *A. phagocytophilum* pourrait également être due à d'autres facteurs comme l'incapacité de l'agent pathogène à envahir les granulocytes de l'hôte du fait de la température corporelle élevée à l'état normal. En effet, la température optimale pour la croissance *in vitro* d'*A. phagocytophilum* est de 37°C (Borjesson, 2008), soit 4°C de moins que la température moyenne du corps des oiseaux (Møller, 2010). Cette différence de température pourrait inhiber ou empêcher la croissance d'*A. phagocytophilum* chez les oiseaux, un effet qui peut être exacerbé chez un hôte manifestant une hyperthermie fébrile.

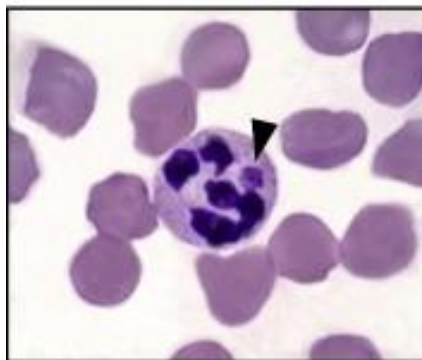
En revanche, comme évoqué précédemment, la résistance à l'agent pathogène ne semble pas être forcément le résultat d'une immunité adaptative, car aucun anticorps spécifique d'*A. phagocytophilum* n'a été détecté 2 à 4 semaines après l'exposition à des nymphes infectées (Johnston *et al.*, 2013). Or, en général, les anticorps IgM dirigés contre *A. phagocytophilum* sont détectables dans le sang 7 jours post-exposition et prédominent pendant les deux premiers mois sur les anticorps IgG détectables 2 à 3 semaines après l'exposition (Woldehiwet et Scott, 1982).

5. Méthode de diagnostic et de dépistage de laboratoire

A. Identification par des méthodes microscopiques avec ou sans coloration

La microscopie optique de frottis sanguins prélevés au cours de la période initiale de la phase fébrile est normalement suffisante pour établir le diagnostic. Colorées au May Grünwald Giemsa, les bactéries apparaissent comme des inclusions cytoplasmiques bleues au sein des monocytes et des granulocytes, en particulier des neutrophiles (Foggie, 1951) (Figure 4). Néanmoins, cette méthode demeure peu sensible et *A. phagocytophilum* peut être confondue avec d'autres *Rickettsiales* dans les granulocytes (comme par exemple *Ehrlichia ewingii*). La microscopie électronique peut aussi confirmer le diagnostic d'une infection aiguë à *Anaplasma* dans le sang ou les organes. L'immuno-histochimie sur des échantillons de tissus a également été réalisée par le passé pour confirmer le diagnostic (Lepidi *et al.*, 2000) mais à notre connaissance, les anticorps utilisés alors ne sont plus disponibles.

Figure 4 : Morula d'*A. phagocytophilum* dans une cellule d'hôte vertébré – souris (source : de la Fuente *et al.*, 2017)



B. Identification par culture, réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et typage moléculaire

A. phagocytophilum est une bactérie intracellulaire stricte dont la culture sur les milieux usuels est très difficile, d'une part car les substrats cellulaires permissifs sont très peu nombreux, particulièrement pour les variants de la bactérie issus d'animaux (notamment les ruminants) et d'autre part car son tropisme pour les neutrophiles à courte durée de vie rend la viabilité d'*A. phagocytophilum* dans les prélèvements très courte. La première mise en culture de la bactérie au laboratoire a été réalisée en 1996 sur cellules HL-60 (pour *Human promyelocytic leukemia cells*), qui sont des cellules de la lignée de promyélocytes leucémiques d'origine humaine non différenciés ou différenciés en granulocytes neutrophiles (Goodman *et al.*, 1996). Les auteurs ont mis en évidence la présence d'*A. phagocytophilum* dans les cellules au minimum 5 jours après inoculation par visualisation de « morula » ou de corps denses intracytoplasmiques sur un frottis de la culture coloré au Giemsa. Par la suite, *A. phagocytophilum* a

été cultivée dans différents types de lignées cellulaires de mammifères (notamment des cellules endothéliales humaines et bovines de la microvascularisation) et de tiques (Munderloh *et al.*, 2004 ; Woldehiwet *et al.*, 2002). Les possibilités de culture sur cellules de vertébrés restent cependant très limitées, particulièrement pour les isolats issus d'animaux.

Comme en témoignent les Annexes 2 et 3 précédemment citées, plusieurs techniques de PCR (conventionnelle, nichée et en temps réel) pour l'identification de l'infection par *A. phagocytophilum* dans le sang et les tissus ont été mises au point, principalement sur la base des séquences mono-locus ciblant les gènes de l'ARNr 16S, des protéines de surface majeures p44/MSP2 ou MSP4 ou l'opéron de choc thermique *groESL*.

En revanche, l'analyse du polymorphisme d'un seul locus, par exemple l'ARNr 16S, ne permet pas de représenter la diversité génétique des variants d'*A. phagocytophilum*. Le typage de séquences multilocus, à travers les techniques MLVA (pour *Multi Locus Variable-number tandem-repeat Analysis*) et MLST (pour *MultiLocus Sequence Typing*) sont utilisés pour discriminer les variants de la bactérie (Chastagner *et al.*, 2014 ; Dugat *et al.*, 2015). Cette dernière technique fournit les résultats les plus fiables en matière de classification et est maintenant plus facile à utiliser pour la phylogénie (Dugat *et al.*, 2015).

La biologie moléculaire, au-delà de son utilité diagnostique, est employée comme outil de dépistage épidémiologique/et ou de surveillance. Plusieurs variants d'*A. phagocytophilum* ont ainsi été caractérisés génétiquement et regroupés dans des sous-familles phylogénétiques sur la base de résultats de culture cellulaire, d'infections expérimentales, de PCR et de techniques de séquençage (Dumler *et al.*, 2007).

C. Sérologie

La présence d'anticorps spécifiques peut aider au diagnostic. Les tests de fixation du complément, les techniques ELISA et les épreuves d'immunofluorescence indirecte (IFA) peuvent être utilisés pour la recherche d'une séroconversion chez les vertébrés sensibles. Plusieurs tests ELISA ont également été mis au point dont le SNAP®4Dx®ELISA test commercialisé pour la mise en évidence rapide des anticorps d'*A. phagocytophilum* dans le sérum, le plasma ou le sang total des chiens. Ce test a également été utilisé avec succès chez les espèces équine et ovine (Stuen *et al.*, 2013). Toutefois, la validité de ces résultats n'est pas confirmée par le fabricant. Ce dernier mentionne un usage réservé uniquement à l'espèce canine dans le mode d'emploi de son test.

6. Traitement et prévention de l'anaplasmose granulocytaire

A. Traitement de l'anaplasmose granulocytaire

Les tétracyclines constituent la famille thérapeutique de choix contre l'infection par *A. phagocytophilum*. L'hydrate de doxycycline, administré par voie orale ou intraveineuse, s'est avéré efficace dans le traitement des cas cliniques d'anaplasmose granulocytaire humaine et a induit une amélioration clinique en 24-48 heures. Chez les patients humains traités par la doxycycline pendant 7 à 10 jours à la dose de 100 mg deux fois par jour, les infections se sont complètement résolues et aucune rechute n'a jamais été rapportée (Goodman *et al.*, 1996). L'oxytétracycline à action prolongée s'est avérée efficace pour le traitement et l'élimination d'*A. phagocytophilum* chez les agneaux à la dose de 20 mg/kg de poids corporel par voie intramusculaire tandis que l'oxytétracycline à action rapide requiert une dose de 10 mg/kg de poids corporel par voie intraveineuse sur cinq jours (Stuen et Bergström, 2001). De même, cet antibiotique est également efficace chez les autres ruminants comme chez les chevaux. La doxycycline a montré son efficacité contre l'anaplasmose canine et féline (Center for Food Security and Public Health, 2013).

B. Prévention de l'anaplasmose granulocytaire

La lutte contre les tiques est la pierre angulaire de la prévention de l'anaplasmose. La lutte biologique et la modification de l'habitat (par exemple, l'élimination des broussailles) peuvent diminuer les populations de tiques. Les acaricides, y compris certains produits topiques mensuels utilisés pour la lutte contre les puces et des tiques, peuvent diminuer le risque d'infections chez les animaux domestiques. Cependant, aucun acaricide ne peut éliminer totalement les tiques ou le risque de maladie (Center for Food Security and Public Health, 2013). Idéalement, les animaux domestiques qui pénètrent dans des environnements infestés de tiques doivent donc être inspectés fréquemment et les éventuelles tiques retirées rapidement pour éviter une transmission au cours du gorgement.

Des tétracyclines ont été utilisés de manière prophylactique chez les chiens mais certains auteurs considèrent qu'il s'agit d'une méthode de prévention non pertinente car elle augmente le risque d'apparition de résistance chez toutes les bactéries (y compris les organismes non ciblés) (Center for Food Security and Public Health, 2013).

Chez les ruminants domestiques, la TBF est généralement contrôlée par un traitement périodique avec des acaricides. En plus de l'impact écologique évident, l'un des autres inconvénients d'une exposition fréquente à ces substances est que les tiques peuvent devenir résistantes à ces agents. Le risque de maladie peut également être réduit en faisant paître les animaux sur des pâturages relativement exempts de tiques (Center for Food Security and Public Health, 2013).

Aucun vaccin contre *A. phagocytophilum* n'est pas encore disponibles. L'un des défis consiste à choisir des antigènes qui soient conservés chez tous les variants d'*A. phagocytophilum*. Les vaccins contre les tiques représentent a priori une alternative pour permettre de

lutter contre les infections transmissibles par les tiques par l'immunisation de la population humaine et animale à risque ou par l'immunisation des mammifères réservoirs afin de réduire au minimum la transmission des agents pathogènes. Les vaccins contre les tiques constitueraient des méthodes de lutte, rentables et respectueuses de l'environnement en comparaison à la lutte chimique (de la Fuente et Kocan, 2006). Néanmoins, à ce jour, les travaux déjà entrepris ne permettent d'entrevoir aucune perspective quant à la faisabilité de cette approche vis-à-vis d'*I. ricinus* (Almazán *et al.*, 2020).

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Les zones urbaines et périurbaines abritent de nombreuses espèces d'oiseaux sauvages. Cette proximité avec l'espèce humaine n'est pas sans risque. En effet, ces animaux sont connus comme réservoirs potentiels ou avérés de virus, de bactéries, de champignons et de protozoaires zoonotiques (Malik *et al.*, 2021). Ils peuvent également être porteurs d'ectoparasites, en particulier les tiques dures dont le genre le plus courant associé aux oiseaux en Europe est *Ixodes* spp. Les tiques de ce genre constituent des vecteurs compétents pour un certain nombre d'agents pathogènes d'importance médicale et vétérinaire (Center for Food Security and Public Health, 2013) notamment *A. phagocytophilum* qui fait l'objet de cette étude. Cette bactérie intracellulaire obligatoire dont les cycles épidémiologiques sont mal connus et semblent complexes n'a toujours pas de réservoir sauvage formellement identifié en Europe. Plusieurs études prospectives ont mis en évidence la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans des prélèvements de sang et/ou d'organes de passereaux dont des corvidés, ainsi que chez plusieurs espèces de tiques du genre *Ixodes* collectées sur des oiseaux en Europe. Ainsi, en France, les oiseaux pourraient participer au cycle épidémiologique de certaines souches d'*A. phagocytophilum*, soit en tant que réservoirs, soit en tant que disséminateurs de la bactérie sur de longues distances.

Les objectifs de cette étude sont, dans un premier temps, de documenter la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les oiseaux d'Ile-de-France et possiblement de confirmer leur compétence d'hôte réservoir sauvage de la bactérie en France et dans un second temps de comparer la détection de l'ADN de la bactérie selon le type de prélèvements effectués (biopsie de rate, biopsie de foie et biopsie cutanée) pour à terme connaître le(s) prélèvement(s) les plus appropriés afin d'étudier les infections par *A. phagocytophilum*, du moins chez les oiseaux.

2. Matériels et méthodes

A. Les animaux : de la sélection aux prélèvements des échantillons

a. Corvidés et passereaux

L'étude préliminaire de la prévalence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les oiseaux a été autorisée par le Comité d'Ethique dont dépend l'École nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA) sous le numéro 2021-01-06. Elle a été réalisée sur des passereaux dont des corvidés, auxquels nous avons eu la chance d'avoir accès par le Centre hospitalier universitaire vétérinaire de la Faune Sauvage (ChuvFs) d'Alfort. Les espèces de passereaux les plus répandues dans

ce centre d'accueil de la faune sauvage sont le merle noir (*Turdus merula*), le moineau domestique (*Passer domesticus*) et la mésange charbonnière (*Parus major*) et parmi les corvidés, la pie bavarde (*Pica pica*) et la corneille noire (*Corvus corone*).

b. Aire et période d'étude des oiseaux

Les oiseaux recueillis par le ChuvFs sont acheminés dans l'écrasante majorité des cas par des particuliers qui les trouvent dans un milieu naturel et les considèrent comme étant « en état de détresse » justifiant ainsi leur capture. Il s'agit majoritairement d'espèces urbaines et péri-urbaines (appartenant essentiellement à la famille des passereaux), provenant de la région Ile-de-France (IdF) (correspondant aux départements de Paris (75), de la Seine-et-Marne (77), des Yvelines (78), de l'Essonne (91), des Hauts-de-Seine (92), de la Seine-Saint-Denis (93), du Val-de-Marne (94) et du Val-d'Oise (95)) et des départements limitrophes (correspondant aux départements de l'Aisne (02), de l'Aube (10), de l'Eure (27), de l'Eure-et-Loir (28), du Loiret (45), de la Marne (50), de l'Oise (60) et de l'Yonne (89)). Plus marginalement, certains oiseaux de l'étude étaient originaires des départements non limitrophes à l'IdF tels que le Calvados (14), la Loire-Atlantique (44) et la Nièvre (58). Ils ont été essentiellement admis sur la période de mars à octobre 2021, laquelle correspond à la fois à la saison de reproduction des oiseaux (espèces potentiellement hôtes), au pic d'activité des nymphes d'*Ixodes ricinus* mais aussi au mois où l'activité du ChuvFs est la plus intense en lien avec un afflux important de juvéniles qui constituent, potentiellement, des sujets plus sensibles aux infections transmissibles par les tiques et notamment aux bactéries transmises par ces dernières.

c. Taille des échantillons : objectifs initiaux

Les données de la littérature scientifique sur la prévalence d'*A. phagocytophilum* imposent d'inclure dans cette étude plus d'une centaine d'individus par espèce pour espérer documenter la présence de la bactérie chez les oiseaux en France. Le nombre maximum d'individus recruté a été fixé à 200 pour certaines espèces de passereaux. Ce nombre tient compte des capacités d'accueil du ChuvFs. D'autres espèces de passereaux moins nombreuses (par exemple l'étourneau sansonnet, le geai des chênes, ou le rouge-gorge familier) étaient susceptibles d'être recueillies au ChuvFs et pouvaient être incluses dans cette étude. Nous estimions disposer de moins de 100 individus pour ces espèces-ci.

Le Tableau 3 récapitule les objectifs initiaux en matière d'espèces de passereaux (dont les corvidés) ciblées associés aux effectifs théoriques souhaités pour cette étude.

Tableau 3 : Objectifs initiaux des tailles d'échantillon pour l'étude préliminaire de la prévalence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les oiseaux d'Ile-de-France

Espèces		Nombre maximum d'animaux
Autres passe-reaux	<i>Turdus merula</i> - Merle noir	200
	<i>Passer domesticus</i> - Moineau domestique	200
	<i>Parus major</i> - Mésange charbonnière	200
Corvidés	<i>Pica pica</i> - Pie bavarde	200
	<i>Corvus corone</i> - Corneille noire	200
Autres passe-reaux ou corvidés	<i>Sturnus vulgaris</i> - Etourneau sansonnet	100/espèce
	<i>Garrulus glandarius</i> - Geai des chênes	
	<i>Erithacus rubecula</i> - Rouge-gorge familier	
	<i>Corvus frugilegus</i> - Corbeau freux	

d. Critères d'inclusion et d'exclusion des oiseaux

Pour cette étude, ont été finalement inclus :

- les cadavres de passereaux inclus dans le Tableau 3, admis durant la saison de reproduction (qui s'étend plus ou moins de mars/avril à septembre/octobre), quelles que soient leurs localisations d'origine, sans distinction d'âge et arrivés morts au ChuvFs ou ayant dû être euthanasiés pour des raisons médicales ou en lien avec l'impossibilité de relâcher l'animal dans le milieu naturel avec une probabilité de survie considérée comme acceptable (conformément à la réglementation qui régit le fonctionnement des centres de soins aux animaux de la faune sauvage).
- les cadavres de passereaux non inclus dans le Tableau 3 mais dont l'effectif final dépassait les 10 individus

En ce qui concerne les critères d'exclusion, n'ont pas été inclus dans l'étude :

- les passereaux dont la période d'admission au ChuvFs intervenait en dehors de la saison de reproduction, c'est-à-dire tous ceux admis entre novembre 2021 et février 2022. Cette période est en effet moins propice à l'infestation par des tiques du genre *Ixodes* spp. et donc à l'infection potentielle par *A. phagocytophilum*
- les cadavres de passereaux non inclus dans le Tableau 3 et dont l'effectif final ne dépassait pas les 10 individus

e. *Examen clinique et signalement*

Chaque oiseau vivant a fait l'objet d'un examen clinique à distance (détermination de l'espèce, de l'état de vigilance, de la posture), d'un examen général en main (évaluation de l'embonpoint, de l'état d'hydratation, examen de l'ensemble du corps, pesée, mesure de la température corporelle, évaluation des fréquences cardiaque et respiratoire).

Les données bibliographiques disponibles sur la prévalence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les oiseaux ne font pas mention d'une quelconque différence selon le sexe ou l'âge de l'animal. Cependant, pour chacun des individus inclus dans cette étude, nous avons décidé de recueillir dans le signalement l'âge de l'animal distinguant les catégories « juvénile » et « adulte » (selon des critères objectifs tels que l'état de développement du plumage, la présence de duvet ou de plumes en fourreaux en cours de croissance, la présence de commissures visibles à la base du bec, la couleur de l'iris, le comportement), le lieu de découverte et le motif d'admission dans les cas où les signes cliniques éventuels (une hyperthermie fébrile par exemple) pourraient être expliqués par une infection à *A. phagocytophilum*.

f. *Euthanasie des oiseaux au ChuvFs*

Les passereaux euthanasiés par le personnel habilité (vétérinaire diplômé) au ChuvFs l'ont été par une injection de pentobarbital par voie intraveineuse au niveau du sinus veineux occipital à la dose de 0,1 mL de solution pour 100 g de poids vif.

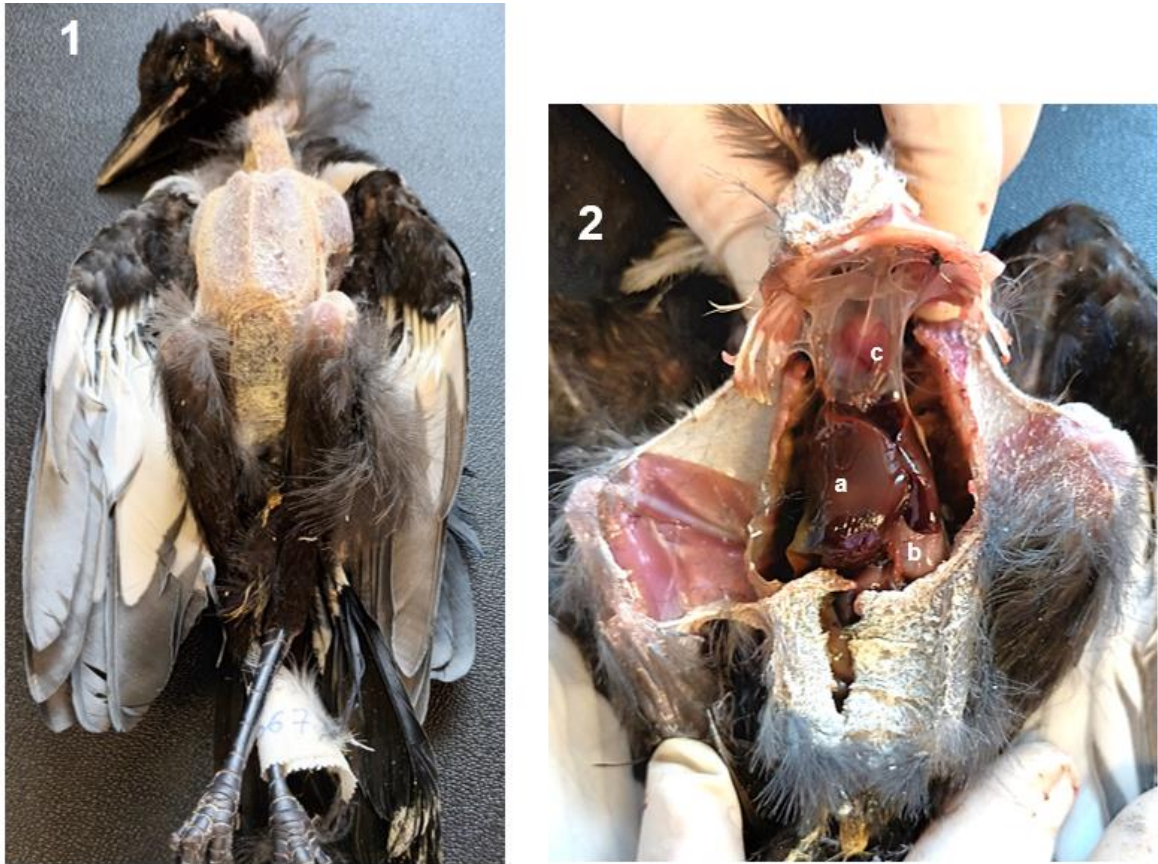
g. *Conditions de conservation des cadavres et de prélèvements des organes*

Les cadavres des animaux euthanasiés, morts avant admission ou spontanément en cours d'hospitalisation au ChuvFs ont été stockés à -20°C jusqu'au jour du prélèvement. En règle générale, une décongélation à 4°C durant une nuit entière a été respectée pour les corvidés (corneille noire, corbeau freux et pie bavarde notamment) et une demi-journée pour les autres passereaux. Les biopsies d'organe ont toutes été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique.

Sur chaque oiseau ont été prélevées :

- Une partie de la peau (environ 0,5 cm²) dans une des zones suivantes : au niveau du cou, d'un conduit auditif externe ou du pourtour des yeux et du bec car elles constituent les zones préférentielles de fixation des tiques du fait d'une densité de plumes plus faible.
- Une partie du foie (non pesée) après incision des muscles pectoraux et du bréchet aux ciseaux (Figure 5).

Figure 5 : Visualisation du foie après ouverture du bréchet chez une Pie bavarde (*Pica pica*)



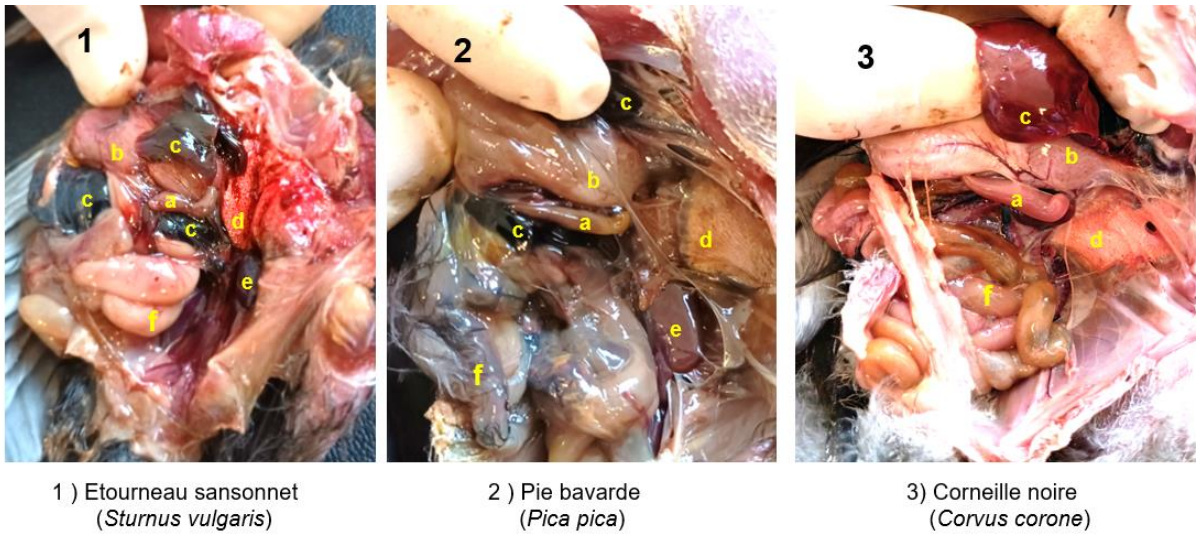
1 – Pie bavarde (*Pica pica*) déplumée du cou jusqu'à la base de l'abdomen

2 - Pie bavarde (*Pica pica*) après incision et ouverture du bréchet

- a) foie
- b) gésier
- c) cœur

- Une partie de la rate (non pesée), dont la nature précise a été confirmée par analyse histologique au Biopôle. En effet, bien que cet organe repose théoriquement contre la surface dorsale du lobe gauche du foie, au niveau de la jonction entre le proventricule et le ventricule, légèrement à droite de la ligne médiane (Figure 6), son prélèvement demandait une certaine technicité, d'autant plus qu'elle pouvait s'être autolysée rapidement après la décongélation, rendant plus complexe sa visualisation dans la cavité abdominale. Il nous a donc paru justifié de contrôler par un examen histologique les premières rates prélevées.

Figure 6 : Visualisation de la rate chez trois espèces d'oiseaux



- a – rate
b – gésier
c – foie (visible sur plusieurs zones au vu de sa taille)
d – poumon
e – rein gauche (visible que sur les oiseaux 1 et 2)
f – intestin

Ces trois prélèvements ont été placés individuellement dans des tubes Eppendorf identifiés et stockés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

B. Extraction d'ADN

a. Sur prélèvements tissulaires spléniques, hépatiques et cutanés

L'extraction d'ADN pour l'ensemble des prélèvements de rate et de foie a été réalisée avec le kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Bethlehem, USA) en suivant scrupuleusement les consignes du fabricant si ce n'est qu'aucun échantillon n'avait été pesé avant l'extraction d'ADN. C'est pourquoi, pour ne pas être gêné par les particules de tissus insolubles en suspension du fait d'une quantité initiale d'organe trop importante, une étape de centrifugation pendant 5 minutes à haute vitesse (11 000 g) a été réalisée à la fin des deux étapes de lyse pour n'en récupérer que le surnageant selon les conseils du fabricant. En revanche, seuls les échantillons cutanés des oiseaux ayant donné des résultats probants à la qPCR (c'est-à-dire avec un seuil du cycle (Ct) inférieur à 32,6 correspondant au seuil de positivité fixé par Courtney *et al.* (2004)) à la fois pour la rate et le foie, ont été extraits. Les éluats d'extraction contenus dans un volume final de 100 µL ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation en qPCR.

b. Evaluation de la concentration et de la pureté des éluats d'extraction d'ADN

Chaque éluat d'extraction a été dosé à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pour en déterminer la concentration en ADN (ng/μL) et évaluer l'état de pureté à l'aide des ratios d'absorbance A260/280 et A260/230 (valeurs attendues comprises entre 1,8 et 2,2).

c. Contrôle de la conformité de l'extraction d'ADN

- *PCR avec pour cible le gène ARNr 12S*

Pour s'assurer de la conformité de l'extraction d'ADN, 10 % des éluats de chaque espèce d'oiseaux a été soumis à une PCR ciblant la séquence de l'*ARNr 12S*. En effet, l'*ARNr 12S* code pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal mitochondrial et constitue une des séquences les plus conservées du génome mitochondrial. Cette séquence est présente en grand nombre de copies dans les tissus des vertébrés avec une très faible variabilité génétique intraspécifique (Humair *et al.*, 2007). L'*ARNr 12S* peut donc être utilisé comme marqueur moléculaire de choix pour l'analyse de la conformité du matériel génétique extrait à partir des oiseaux de l'étude.

- *Protocole de la PCR ARNr 12S*

La présence d'ADN d'oiseau dans l'éluat d'extraction a été vérifiée par PCR *ARNr 12S* de la manière suivante : dans un volume final de 50 μL ont été ajoutés 10 μL de GoTaq Flexi 5X, 0,5 μL de polymérase GoTaq Hot start (Promega), 1 μL de dNTP à 10 mM, 5 μL de MgCl₂ à 25 mM, 2,5 μL de chacune des amorces ARNr 12S (12S-6F 5'-CAA ACT GGG ATT AGA TAC C-3' B-12S-9R 5'-AGA ACA GGC TCC TCT AG-3') à 10 μM, 23,5 μL d'eau pure et 5 μL d'échantillon d'ADN à 20 ng/μL. Chaque échantillon a été testé en un exemplaire unique et des contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant l'ADN par de l'eau ultrapure. Un extrait d'ADN issu de cellules promyéloblastes (HL-60 CCL-240™) infectées par une souche humaine américaine d'*A. phagocytophilum* (NY-18) a été utilisé comme témoin positif de la PCR.

La réaction de PCR a été effectuée avec un thermocycleur (MasterCycler Nexus Gradient, Eppendorf) selon le programme de Humair et al. (2007) à savoir : une dénaturation initiale à 92°C pendant 2 min, puis un premier cycle d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 60°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 30 s) suivi d'une première série de 9 cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation démarrante à 52°C - et gagnant 1°C par cycle pour finir à 60°C - pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 30 s), puis une nouvelle série de 20 cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 52°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 30 s) et une élongation à 72°C pendant 7 min .

- *Migration sur gel d'agarose et révélation*

La présence d'ADN d'oiseau dans l'éluat d'extraction a été évaluée de manière semi-quantitative après dépôt de 2 µL d'échantillon amplifié par PCR sur un gel à 2% d'agarose standard (contenant du BET dilué à 50 ng/mL de gel d'agarose). Le marqueur TrackIt™ 100 bp DNA Ladder a été utilisé comme marqueur de taille des bandes d'ADN amplifiées par PCR. Une tension électrique de 120 V a été appliquée au gel d'électrophorèse au moins pendant une heure. La fluorescence a ensuite été révélée sous UV au Gel Doc™ et comparée à celle d'un dépôt témoin composé d'eau pure.

C. Détection de l'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* par qPCR

a. qPCR ciblant le gène *msp2*

Le gène *msp2* (major surface protein 2) d'*A. phagocytophilum* est un gène polymorphe de 77 pb (Courtney *et al.*, 2004) qui code pour des protéines de 42 à 49 kDa de la membrane externe propre aux espèces d'*Anaplasma* (Sarkar *et al.*, 2008). Des études ont montré que le génome d'*A. phagocytophilum* peut contenir jusqu'à 80 copies du gène *msp2* (Barbet *et al.*, 2003). Ce gène *msp2* dispose d'une région centrale hautement variable flanquée par des régions amino- et carboxy-terminales conservées (Zhi *et al.*, 1999).

b. Protocole de la qPCR *msp2*

La PCR quantitative *msp2* TaqMan utilisant le kit LightCycler 480® Probe Master 2X (Roche) a été réalisée afin de détecter la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans les échantillons testés (rate et foie de passereaux). La réaction d'amplification a été réalisée de la manière suivante d'après le protocole de Courtney *et al.* (2004) : un mix composé de 6 µL de master 2X (incluant les dNTP, ADN polymérase, MgCl₂), 0,12 µL d'amorces du gène *msp2* (forward 5'-ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT-3' et reverse 5'-TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA-3') concentrées à 20 µM, 0,12 µL de sonde TaqMan (5'-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-3') concentrée à 20 µM, auquel ont été ajoutés 2 µL d'échantillon concentré à 250 ng/µL. Chaque puit de qPCR a été réalisé en dupliquât et des contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant l'ADN par de l'eau ultrapure. Un extrait d'ADN provenant de cellules HL-60 infectées par la souche NY-18 a été utilisé comme témoin positif de la qPCR.

La qPCR a été réalisée grâce au thermocycler LightCycler 480 (Roche), qui permet une mesure en temps réel de l'émission de fluorescence, selon le protocole de PCR suivant : dénaturation à 95 °C pendant 5 min, suivie par 45 cycles comportant une étape de dénaturation à 95 °C pendant 10 s et une étape d'hybridation à 60 °C pendant 15 s. Le programme se termine par un refroidissement de 40°C pendant 10 s. L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel LightCycler® 480 Software Version 1.5.1.62.

c. *Sensibilité analytique de la qPCR msp2*

Dans le cadre de ce projet, la limite de détection de l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été fixée pour une valeur de Ct égale à 32,6 correspondant à l'infection par un huitième d'*A. phagocytophilum* de cellules HL-60 (Courtney *et al.*, 2004). Ce résultat a été obtenu après une série de quatre dilutions au dixième de cellules mères HL-60 infectées par 125 bactéries. La valeur d'un huitième correspondait à la dernière des dilutions au dixième (soit 0,125 bactérie) pour laquelle l'intensité de fluorescence atteignait le niveau seuil.

Ainsi, dans ce projet, tout éluat d'extraction qui donnait une valeur de Ct inférieure à 32,6 était considéré comme potentiellement positif à *A. phagocytophilum* et faisait l'objet d'un séquençage.

d. *Séquençage des échantillons*

Les trois isolats (rate, foie et peau) de chaque oiseau positif à la qPCR ont fait l'objet d'un séquençage par la société Eurofins. Les séquences ont été analysées par le logiciel Mega7 puis alignées sur NCBI avec Blast (Altschul *et al.*, 1990) pour confirmer la présence d'*A. phagocytophilum*.

D. **Confirmation de la positivité des échantillons et premières études phylogéniques**

a. *PCR nichée ciblant la séquence codant l'ARNr 16S*

- *Le gène de l'ARNr 16S*

Pour confirmer la présence d'*A. phagocytophilum* dans les échantillons positifs avec la qPCR, une PCR nichée a été entreprise. Cette dernière permet d'augmenter la spécificité et le taux d'amplification de la séquence d'intérêt par l'intermédiaire de deux PCR successives en utilisant deux couples d'amorces différentes. Dans le cas présent, la séquence de l'ARN ribosomique 16S, constituant la petite sous-unité des ribosomes bactériens, a été recherchée suivant le protocole de Massung *et al.* (1998). Ce locus très conservé est traditionnellement utilisé pour la détection de variants génétiques chez *A. phagocytophilum*.

- *Protocole de la PCR nichée ciblant la séquence de l'ARNr 16S*

La présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* a été confirmée par une PCR nichée ciblant la séquence de l'*ARNr 16S* conformément au protocole suivant :

Pour la PCR n°1 Ge3a-Ge10R donnant un amplicon de 932 pb : dans un volume final de 50 µL ont été ajoutés 10 µL de tampon HF 5X, 1,0 µL de polymérase Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific), 1,0 µL de dNTP à 10 mM, 2,5 µL de chacune des amorces Ge3a-Ge10R (Ge3a 5'- CAC ATG CAA GTC GAA CGG ATT ATT C-3' Ge10R 5'- TTC CGT TAA GAA GAA TCT AAT CTC C -3') à 10 µM, 28,5 µL d'eau pure et 5 µL d'échantillon d'ADN à 40 ng/µL. Chaque puits de PCR est réalisé en essai unique et des contrôles négatifs sont effectués en remplaçant l'ADN par de l'eau ultrapure. Un extrait d'ADN issu de cellules HL-60 infectées par la souche NY-18 a été utilisé comme témoin positif de la PCR 1 Ge3a-Ge10R.

La réaction de PCR a été effectuée avec un thermocycleur (MasterCycler Nexus Gradient, Eppendorf) selon le programme suivant : dénaturation initiale à 98°C pendant 2 min, puis 40 cycles d'amplification (dénaturation à 98°C pendant 30 s, hybridation à 55°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 60 s) suivi d'une élongation à 72°C pendant 10 min.

Pour la PCR n°2 Ge9F-Ge2R donnant un amplicon de 546 pb : des volumes identiques à ceux de la PCR n°1 ont été utilisés pour le tampon HF, la polymérase Phusion™, les dNTP, les amorces (Ge9F 5' - AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T – 3' et Ge2R 5' - GGC AGT ATT AAA AGC AGC TCC AGG – 3'), l'eau pure et l'ADN (qui correspond à ce qui a été amplifié lors de la PCR n°1 Ge3a-Ge10R). Le programme d'amplification a été réalisé avec le même thermocycleur et selon les mêmes conditions à l'exception du nombre de cycles d'amplification restreint à 30 cycles.

- *Migration sur gel d'agarose et révélation*

La présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* a été évaluée de manière semi-quantitative pour chacun des produits de la PCR 1 et 2 après dépôt de 10 µL d'échantillon amplifié sur un gel à 2 % d'agarose standard (contenant du BET dilué à 50 ng/mL de gel d'agarose). Le marqueur TrackIt™ 100 bp DNA Ladder a été utilisé comme marqueur de taille des bandes d'ADN amplifiées. Une tension électrique de 120 V a été appliquée au gel d'électrophorèse au moins pendant une heure. La fluorescence a ensuite été révélée sous UV au Gel Doc™ et comparée à celle d'un dépôt témoin composé d'eau pure.

- *Séquençage des échantillons*

Après une étape de purification à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), les isolats (rate, foie et peau) ayant fourni un résultat positif à la PCR nichée ont fait l'objet d'un séquençage à bas débit de type Sanger par la société Eurofins. Les séquences ont été analysées par le logiciel Mega7 puis alignées sur NCBI avec Blast (Altschul *et al.*, 1990) pour confirmer la présence d'*A. phagocytophilum*.

b. **PCR nichée ciblant un gène codant une protéine de liaison GTP (GTP-binding protein)**

- *Le gène typA codant pour une GTP-binding protein*

Les protéines G sont une famille de protéines qui agissent comme des commutateurs moléculaires à l'intérieur des cellules, et sont impliquées dans la transmission de signaux provenant d'une variété de stimuli extérieurs. Parmi eux, le gène *typA* qui existe chez de nombreuses bactéries (y compris d'autres que celles du genre *Anaplasma*), est connu comme marqueur génétique partagé par les différentes souches d'*Anaplasma* (Chastagner *et al.*, 2014)

- *Protocole de la PCR nichée ciblant le gène codant pour la protéine de liaison GTP*

La présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* a été confirmée par une PCR nichée ciblant le gène *typA* selon le protocole suivant :

Pour la PCR n°1 *typA* Ext donnant un amplicon de 1455 pb : dans un volume final de 50 µL ont été ajoutés 10 µL de tampon HF 5X, 0,5 µL de polymérase Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, 1,0 µL de dNTP à 10 mM, 2,5 µL de chacune des amorces *typA* Ext (E2_ *typA*_F A 5'-CCT GGA CAT GCT GAC TAT TTC GG -3' et E2_ *typA*_R 5'-CGG CGG AAC TAA CCT CAC AG-3') à 10 µM, 28,5 µL d'eau pure et 5 µL d'échantillon d'ADN à 40 ng/µL. Chaque PCR a été réalisée en unique essai et des contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant l'ADN par de l'eau ultrapure. Un extrait d'ADN de cellules HL-60 infectées par la souche NY-18 a été utilisé comme témoin positif de la PCR 1 *typA* Ext.

La réaction de PCR a été effectuée avec un thermocycleur (MasterCycler Nexus Gradient, Eppendorf) selon le programme suivant : dénaturation initiale à 98°C pendant 1 min, puis 3 cycles de démarrage (dénaturation à 95°C pendant 1 min, hybridation à 66°C pendant 2 min et élongation à 72°C pendant 90 s) suivis de 40 cycles d'amplification (dénaturation à 88°C pendant 1 min, hybridation à 66°C pendant 2 min et élongation à 72°C pendant 90 s) suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Pour la PCR n°2 *typA* Int donnant un amplicon de 546 pb : les mêmes volumes que lors de la PCR n°1 ont été utilisés pour le tampon HF, la polymérase Phusion™, les dNTP, les amorces (F *typA* 5' - TGC CTC TTC TGA CCC TAT GCC- 3' et R *typA* 5' - AGC CCT TTC CAG CCC TGC AAC - 3'), l'eau pure et l'ADN (qui correspond à ce qui a été amplifié lors de la PCR n°1 *typA* Ext). Le programme d'amplification a été réalisé avec le même thermocycleur et selon les mêmes conditions excepté les étapes d'hybridation qui se sont déroulées lieu à 69°C.

c. Migration sur gel d'agarose et révélation

La présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* a été évaluée de manière semi-quantitative pour chacun des produits de la PCR 1 et 2 après dépôt de 10 µL d'échantillon amplifié sur un gel à 2 % d'agarose standard (contenant du BET dilué à 50 ng/mL de gel d'agarose). Le marqueur TrackIt™ 100 bp DNA Ladder a été utilisé comme marqueur de taille des bandes d'ADN amplifié. Une tension électrique de 120 V a été appliquée au gel d'électrophorèse au moins pendant une heure. La fluorescence a ensuite été révélée sous UV au Gel Doc™ et comparée à celle d'un dépôt témoin composé d'eau pure.

d. Séquençage des échantillons

Après une étape de purification à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, les isolats (rate, foie et peau) positifs à la PCR nichée ont fait l'objet d'un séquençage à bas débit de type Sanger par la société Eurofins. Les séquences ont été analysées par le logiciel Mega7 puis alignées sur NCBI avec Blast (Altschul *et al.*, 1990) pour confirmer la présence d'*A. phagocytophilum*.

E. Éléments d'épidémiologie

Il s'agit d'une étude observationnelle transversale : les oiseaux ont été trouvés dans une zone géographique limitée (Ile-de-France et départements limitrophes) qui correspond au rayon de recrutement du ChuvFs. La population cible, à savoir la population à laquelle cette étude souhaite étendre les résultats, est constituée par les passereaux des zones urbaines et péri-urbaines d'Ile-de-France. La population source, qui pour rappel correspond aux individus d'où sont extraits ceux faisant partie de l'échantillon, s'étend aux passereaux, susceptibles d'être admis morts au ChuvFs ou ayant été euthanasiés, originaire des zones urbaines et péri-urbaines d'Ile-de-France durant la période d'étude (saison de reproduction s'étendant de mars à octobre 2021). Enfin, notre échantillon regroupe uniquement ces passereaux admis de mars à octobre 2021 et/ou présents dans le Tableau 3 et/ou dont l'effectif excédait dix individus. Il n'a donc pas la prétention d'être représentatif de la population de passereaux des zones urbaines et péri-urbaines d'Ile-de-France et des départements limitrophes.

Compte tenu de la non représentativité de l'échantillon, les résultats n'ont donné lieu à aucune analyse statistique.

3. Résultats de l'étude

A. Résultats de la collecte menée par le ChuvFs

Sur la période de recrutement s'étendant de mars à octobre 2021, 759 oiseaux dont 738 passereaux ont fait l'objet des trois biopsies (rate, foie et peau). Ces espèces sont représentatives

des espèces urbaines et péri-urbaines d'Ile-de-France (Tableau 4 pour la famille des passereaux et Annexe 3 pour les autres familles).

Tableau 4 : Bilan brut de la collecte des passereaux de mars à octobre 2021 (par ordre d'effectif décroissant selon l'espèce) et tentative d'estimation de la proportion de chacune d'elle en IdF (modifiée d'après (Centre Ornithologique Ile-de-France *et al.*, 2010; Malher, 2020))

* : l'estimation du % relatif en IdF de chacune des espèces de passereaux de l'étude est détaillée en Annexes 4 et 5.

Famille	Espèce : <i>nom latin</i> (nom usuel)	Effectif	Effectif programmé	% selon la famille	% relatif en IdF *
Passereaux dont corvidés n = 738	<i>Corvus corone</i> (Corneille noire)	192	200	26,02	4,1
	<i>Pica pica</i> (Pie bavarde)	143	200	19,38	2,3
	<i>Turdus merula</i> (Merle noir)	91	200	12,33	14,1
	<i>Passer domesticus</i> (Moineau domestique)	84	200	11,38	27,0
	<i>Parus major</i> (Mésange charbonnière)	68	200	9,21	10,4
	<i>Sturnus vulgaris</i> (Etourneau sansonnet)	37	100	5,01	8,3
	<i>Cyanistes caeruleus</i> (Mésange bleue)	25	100	3,39	6,0
	<i>Garrulus glandarius</i> (Geai des chênes)	20	100	2,71	0,9
	<i>Erithacus rubecula</i> (Rougegorge familier)	17	100	0,02	1,8
	<i>Prunella modularis</i> (Accenteur mouchet)	9	100	0,01	3,3
	<i>Sylvia atricapilla</i> (Fauvette à tête noire)	9	100	0,01	2,3
	<i>Phoenicurus ochruros</i> (Rougequeue noir)	8	100	< 0,01	1,7
	<i>Fringilla coelebs</i> (Pinson des arbres)	6	100	< 0,01	1,9
	<i>Carduelis carduelis</i> (Chardonneret élégant)	5	100	< 0,01	0,1
	<i>Chloris chloris</i> (Verdier d'Europe)	3	100	< 0,01	1,2
	<i>Corvus frugilegus</i> (Corbeau freux)	3	100	< 0,01	1,5
	<i>Serinus serinus</i> (Serin cini)	3	100	< 0,01	0,1
	<i>Delichon urbicum</i> (Hirondelle de fenêtre)	2	100	< 0,01	0,8
	<i>Phylloscopus trochilus</i> (Pouillot fitis)	2	100	< 0,01	0,4
	<i>Turdus philomelos</i> (Grive musicienne)	2	100	< 0,01	0,7
<i>Aegithalos caudatus</i> (Orite à longue queue)	1	100	< 0,01	0,7	
<i>Sitta europaea</i> (Sittelle torchepot)	1	100	< 0,01	0,1	
<i>Linaria cannabina</i> (Linotte mélodieuse)	1	100	< 0,01	0	
<i>Troglodytes troglodytes</i>	1	100	< 0,01	3,9	

(Troglodyte mignon)				
<i>Motacilla alba</i>	1	100	< 0,01	0,1
(Bergeronnette grise)				

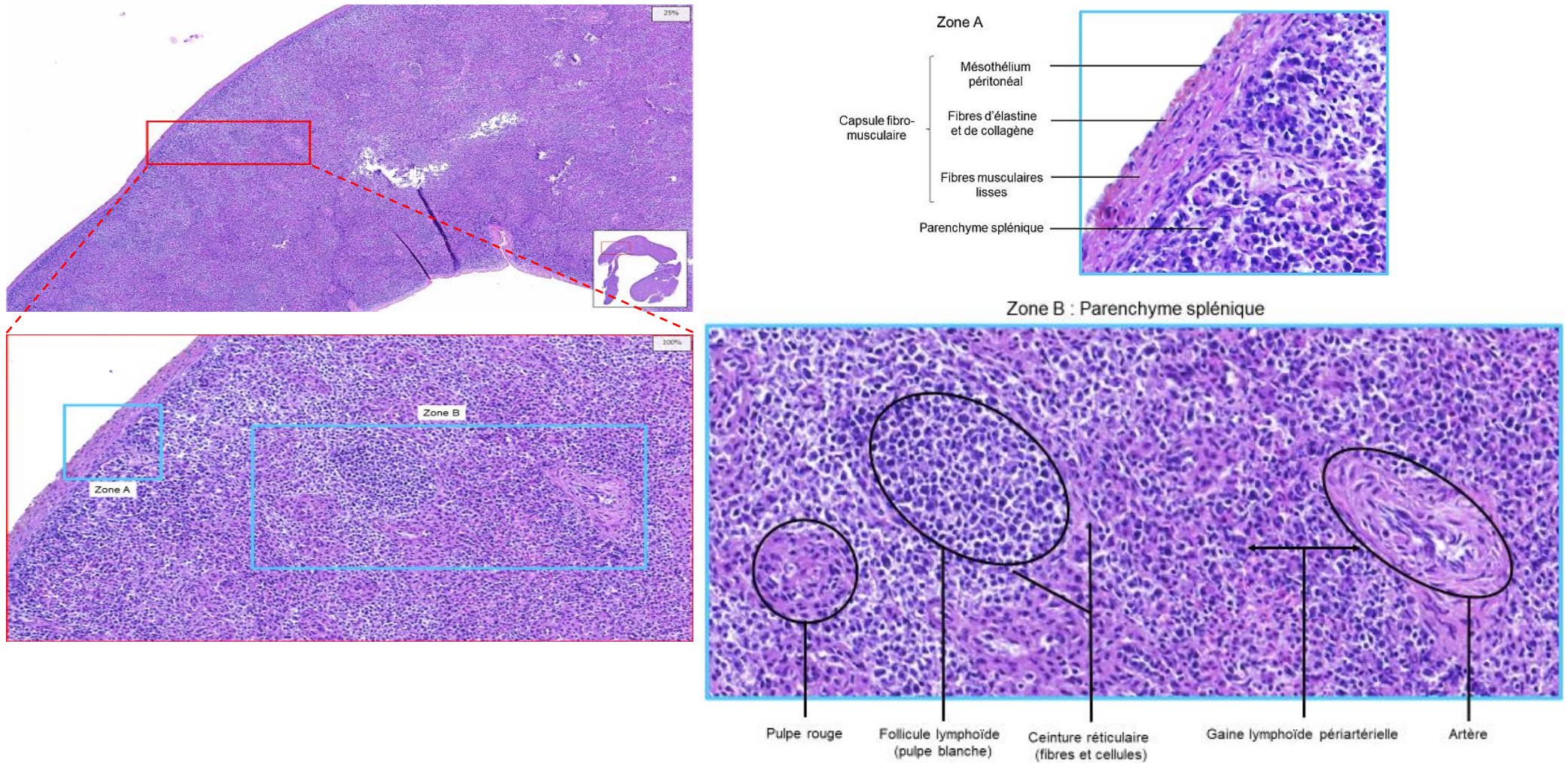
Dans la suite de ce manuscrit, les espèces seront mentionnées en employant leur dénomination vernaculaire.

L'extraction de l'ADN a concerné les espèces figurant dans le Tableau 3 (à savoir les corneilles noires, les pies bavardes, les geais des chênes, les corbeaux freux, les merles noirs, les moineaux domestiques, les mésanges charbonnières, les étourneaux sansonnets et les rouges-gorges familiers) et l'ensemble des passereaux dont l'effectif excédait les dix individus (notamment les mésanges bleues).

B. Résultat de l'histologie de la rate

L'examen histologique de l'organe prélevé en tant que rate supposée a permis de confirmer qu'il s'agissait bien de la rate. La capsule qui entoure la rate des oiseaux comporte une partie externe conjonctive (fibres de collagène et élastine) et une partie interne épaisse, riche en faisceaux de cellules musculaires lisses (Figure 7 – zone A). Dans le parenchyme splénique, il existe une ébauche de pulpe rouge et de pulpe blanche. Cette dernière s'observe au niveau de gaines entourant certains vaisseaux sanguins et au niveau de follicules lymphoïdes. Ces derniers sont cernés par une armature réticulinique bien apparente (Figure 7 – zone B).

Figure 7 : Histologie de la rate d'une Corneille noire en coupe transversale colorée à l'HES (grossissement x 20) et zoomé à 25 % - 100 % - 150 % (légendé selon Cordonnier (2018)).



C. Caractéristiques épidémiologiques descriptives relatives aux oiseaux

a. Origine des oiseaux

Notre étude concerne des passereaux originaires quasiment exclusivement de zones urbaines et péri-urbaines de la région Ile-de-France (Figure 8, Figure 9, Figure 10, Figure 11, Figure 12, Figure 13, Figure 14, Figure 15 et Figure 16)

Figure 8 : Répartition des *Corvus corone* (Corneille noire) selon le département de découverte

Pour cette figure et les huit suivantes, les nombres mentionnés sous les noms des départements correspondent aux effectifs d'oiseaux (de l'espèce considérée) originaires du dit département. L'intensité de couleur bleue des départements est directement corrélée à ce nombre.

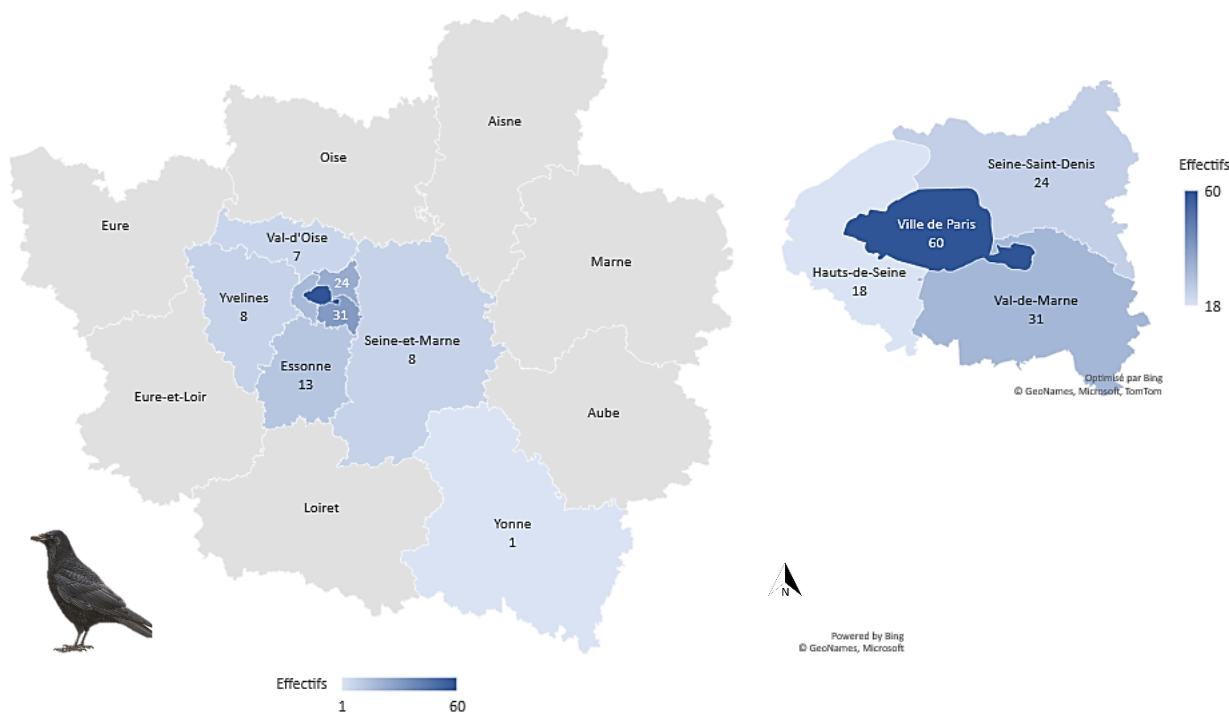


Figure 9 : Répartition des *Pica pica* (Pie bavarde) selon le département de découverte

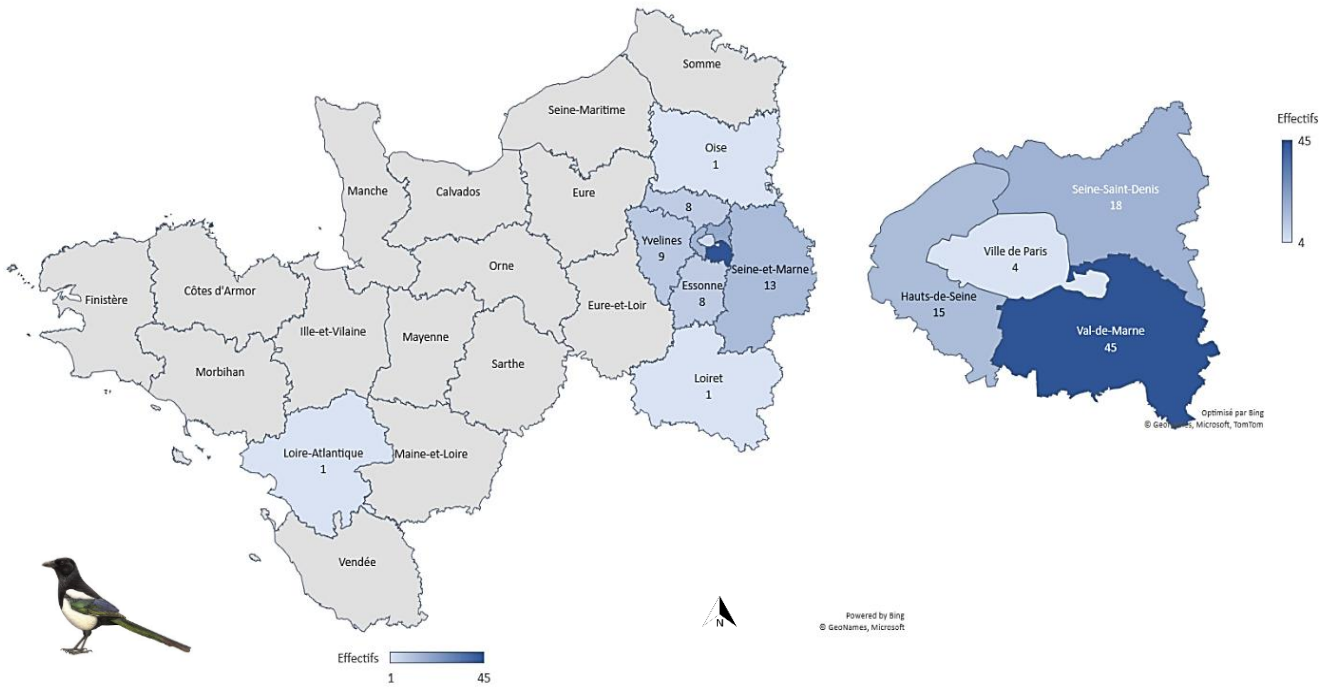


Figure 10 : Répartition des *Garrulus glandarius* (Geai des chênes) selon le département de découverte

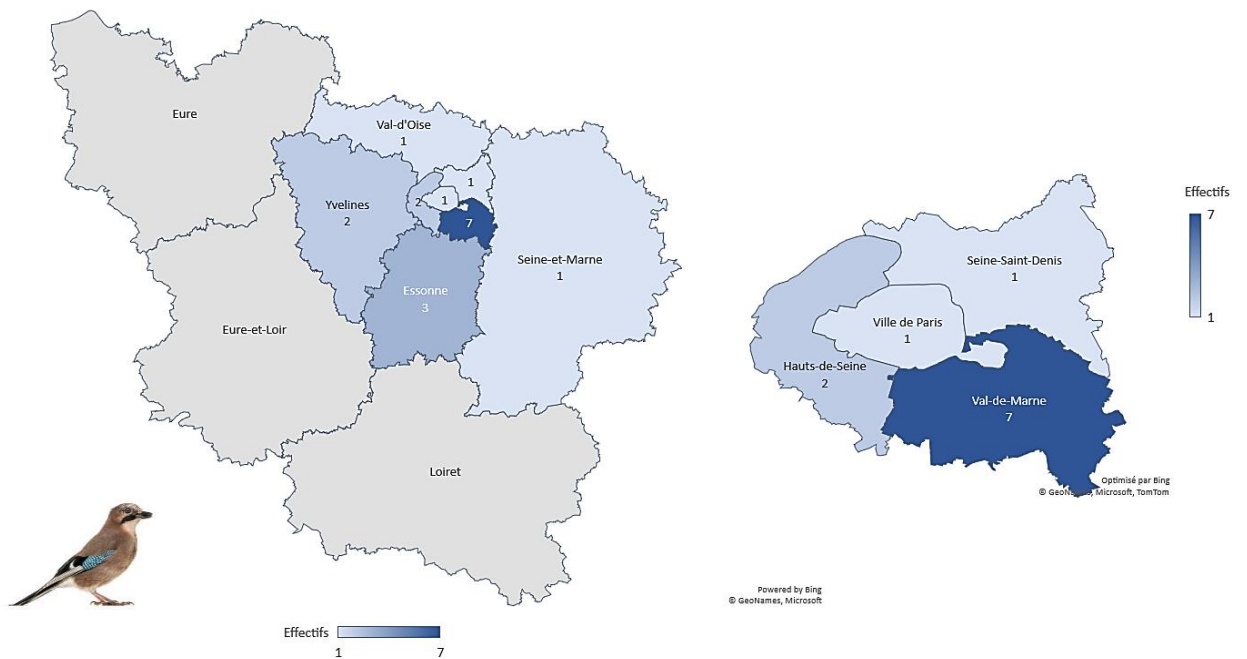
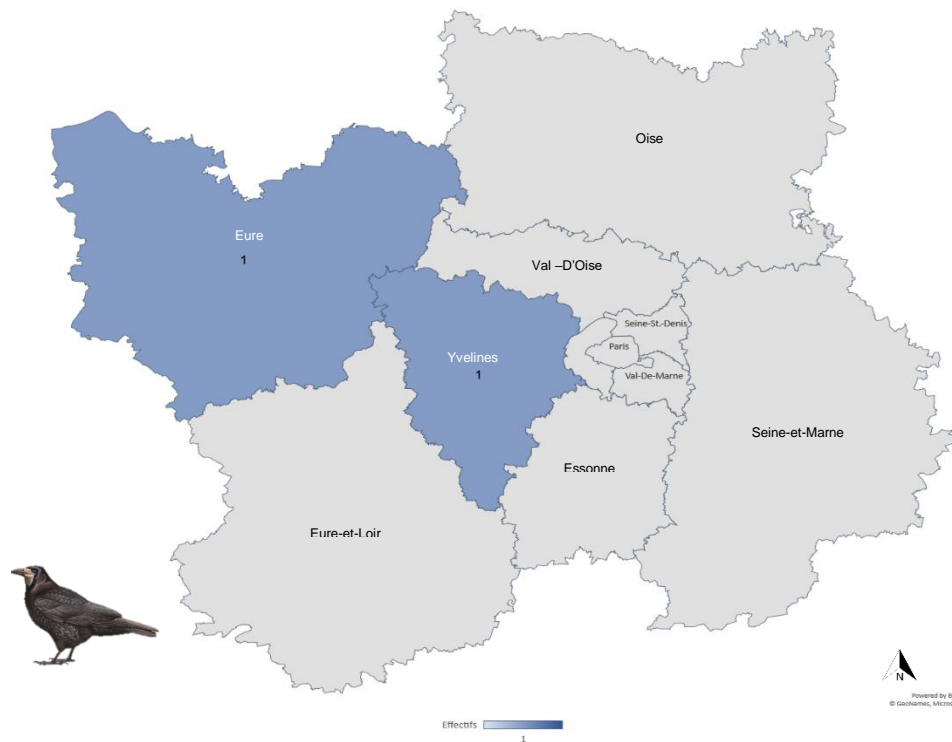


Figure 11 : Répartition des *Corvus frugilegus* (Corbeau freux) selon le département de découverte



Ainsi, dans cette étude, 86,4 % des corvidés proviennent de la région Ile-de-France, 1,1 % de départements limitrophes à cette région et 0,3 % au-delà tandis que 12,2 % ont une origine géographique inconnue (Tableau 5).

Tableau 5 : Répartition géographique des corvidés selon le département de découverte et effectifs associés

		Corvidés			
Département		Corneille noire n = 192	Pie bavarde n = 143	Geai des chênes n = 20	Corbeau freux n = 3
Région Ile-de-France (IdF)	Paris	31,2 % (60/192)	2,8 % (4/143)	5,0 % (1/20)	/
	Seine-et-Marne	4,2 % (8/192)	9,1 % (13/143)	5,0 % (1/20)	/
	Yvelines	4,2 % (8/192)	6,3 % (9/143)	10,0 % (2/20)	1/3
	Essonne	6,8 % (13/192)	5,6 % (8/143)	15,0 % (3/20)	/
	Hauts-de-Seine	9,4 % (18/192)	10,5 % (15/143)	10,0 % (2/20)	/
	Seine-Saint-Denis	12,5 % (24/192)	12,6 % (18/143)	5,0 % (1/20)	/
	Val-de-Marne	16,1 % (31/192)	31,5 % (45/143)	35,0 % (7/20)	/
	Val-d'Oise	3,6 % (7/192)	5,6 % (8/143)	5,0 % (1/20)	/
Départements limitrophes à l'IdF	Aines, Aube, Eure, Eure-et-Loir, Loiret, Marne, Oise, Yonne	0,5 % (1/192)	1,4 % (2/143)	/	1/3
Hors des départements limitrophes à l'IdF		/	0,7 % (1/143)	/	/
Absence d'information		11,5 % (22/192)	14,0 % (20/143)	5,0 % (1/20)	1/3

Figure 12 : Répartition des *Parus major* (Mésange charbonnière) et *Cyanistes caeruleus* (Mésange bleue) selon le département de découverte

Les effectifs des Mésanges charbonnières et des Mésanges bleues sont regroupés dans cette figure.

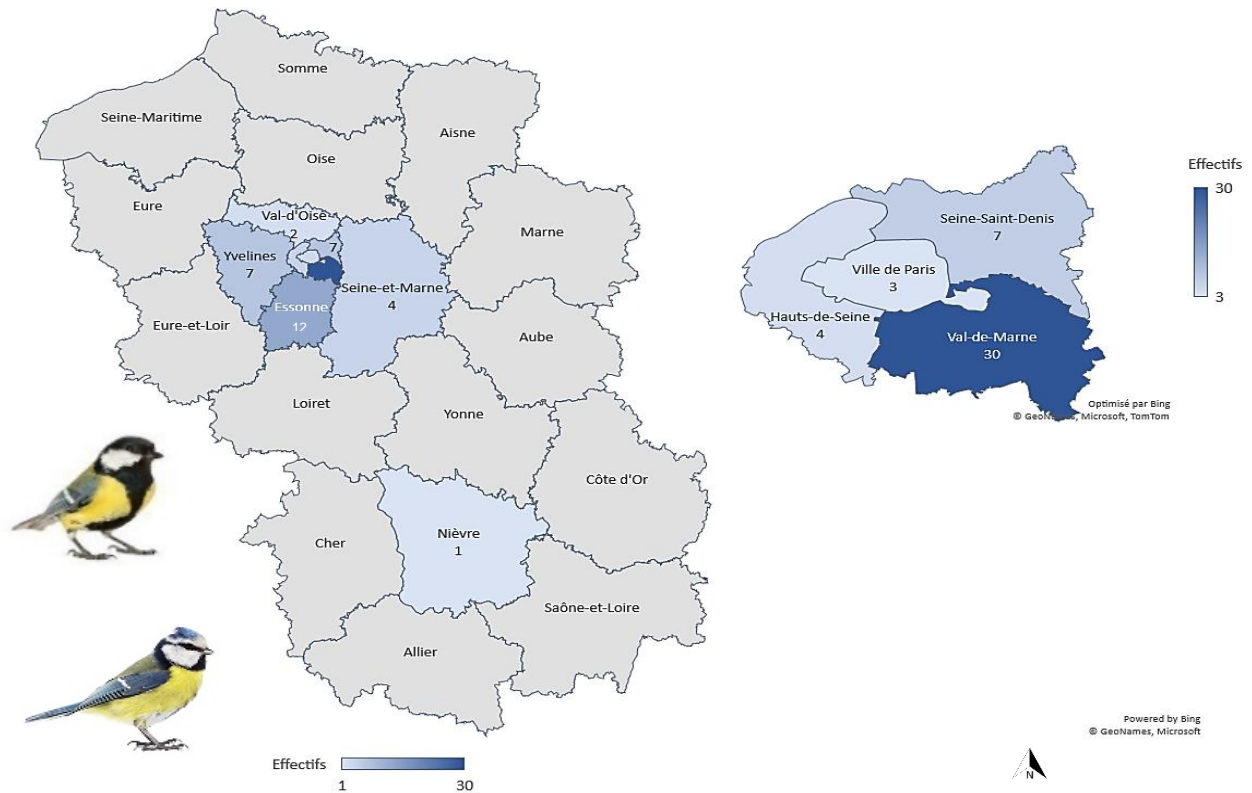


Figure 13 : Répartition des *Turdus merula* (Merle noir) selon le département de découverte

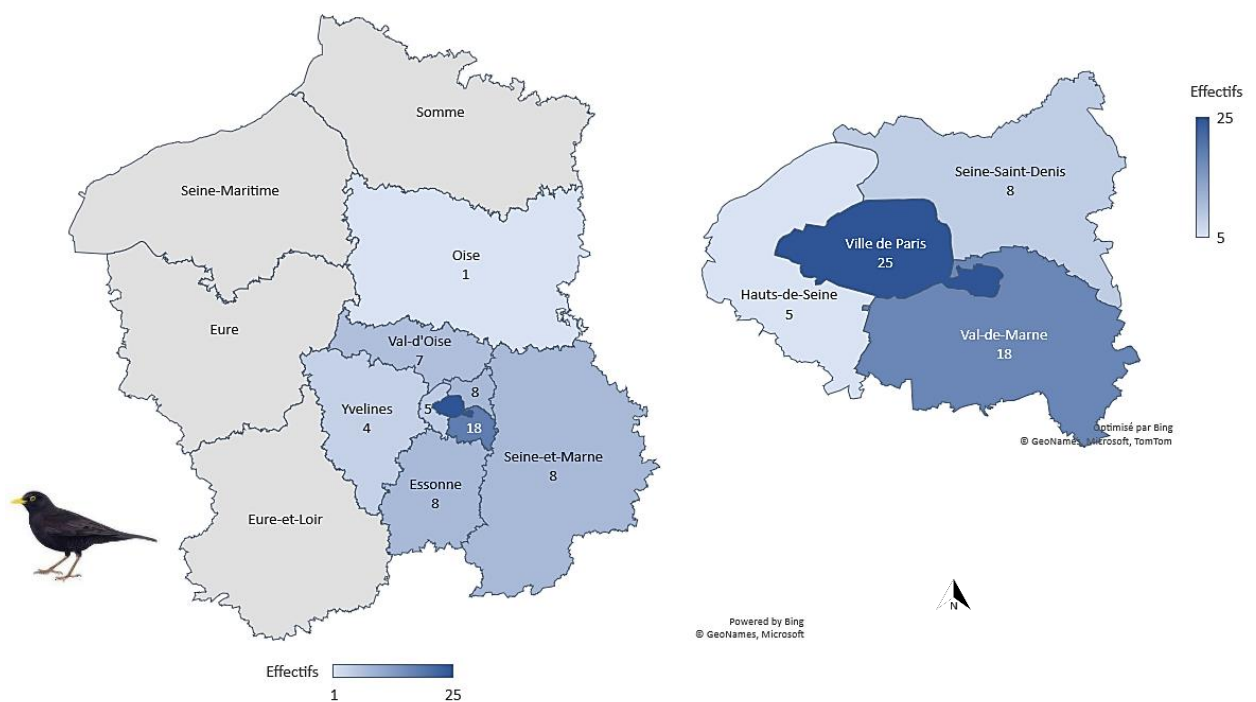


Figure 14 : Répartition des *Passer domesticus* (Moineau domestique) selon le département de découverte

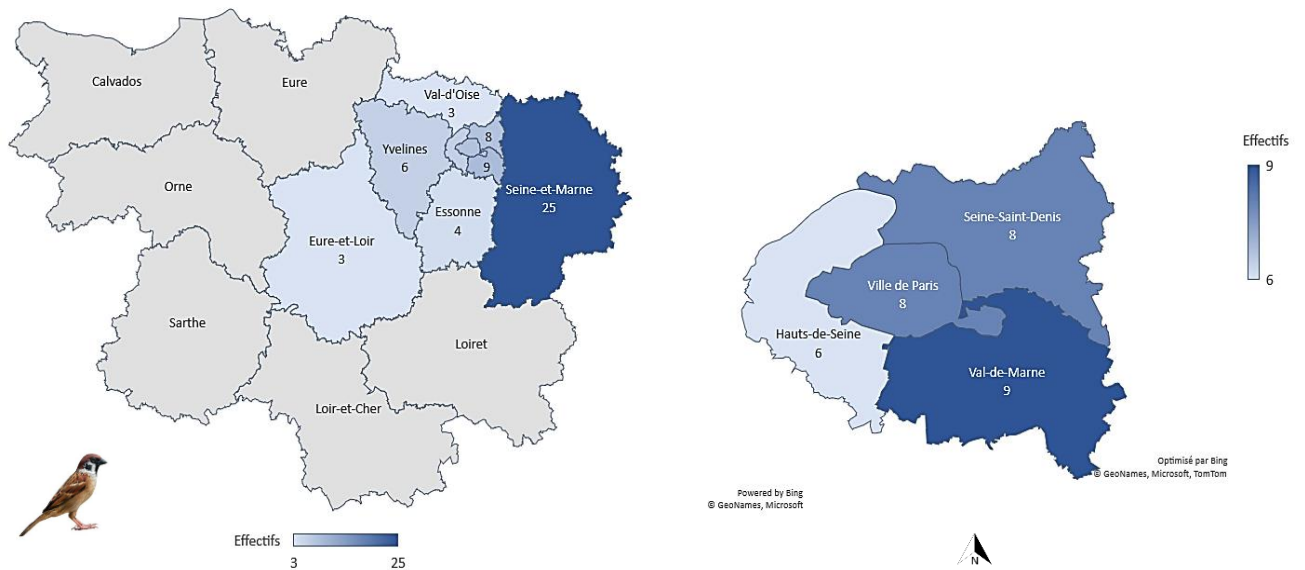


Figure 15 : Répartition des *Sturnus vulgaris* (Etourneau sansonnet) selon le département de découverte

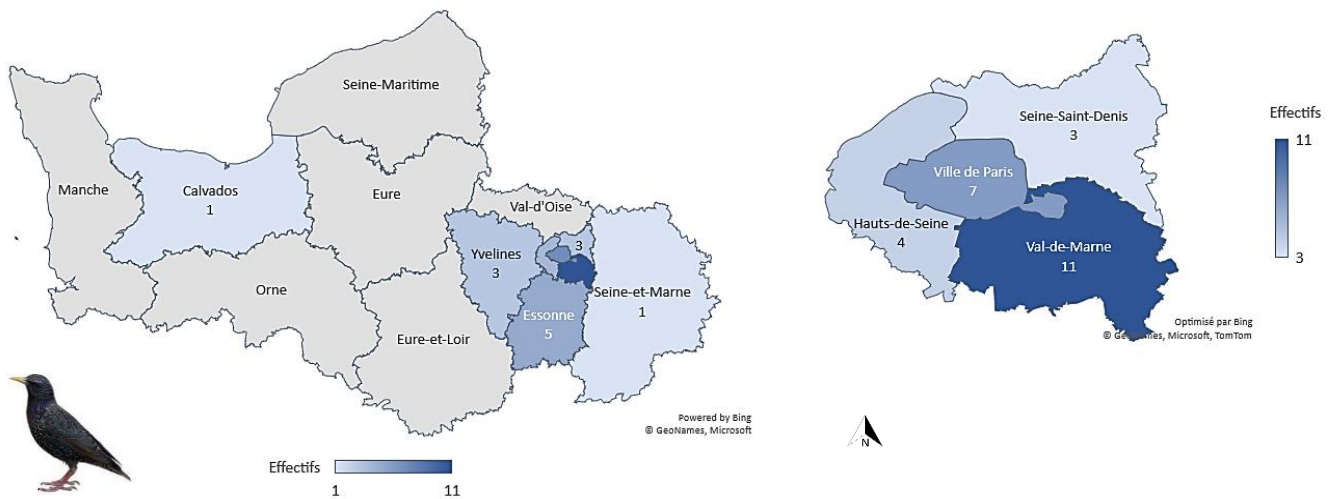
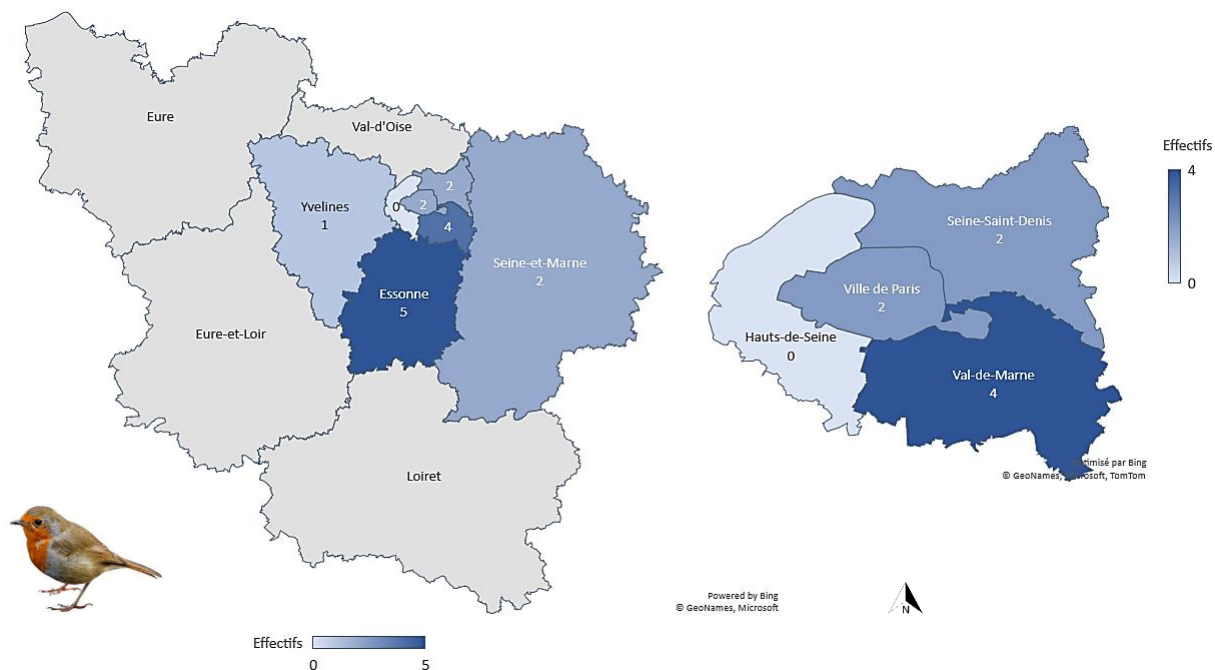


Figure 16 : Répartition des *Erithacus rubecula* (Rouge-gorge familier) selon le département de découverte



Le constat est le même au sein des autres passereaux dont 90,1 % proviennent de la région Ile-de-France, 1,2 % d'un département limitrophe à l'Ile-de-France, 0,6 % d'un département qui n'est pas limitrophe à l'Ile-de-France et dont 8,1 % ont une origine inconnue (Tableau 6).

Tableau 6 : Répartition géographique des autres passereaux selon le département de découverte et effectifs associés

Autres passereaux						
Département	Mésanges ¹ n = 93	Merle noir n = 91	Moineau domestique n = 84	Etourneau sansonnet n = 37	Rouge- gorge familier n = 17	
Région Ile-de- France (IdF)	Paris	3,2 % (3/93)	27,4 % (25/91)	9,5 % (8/84)	18,9 % (7/37)	11,8 % (2/17)
	Seine-et-Marne	4,3 % (4/93)	8,8 % (8/91)	29,8 % (25/84)	2,7 % (1/37)	11,8 % (2/17)
	Yvelines	7,5 % (7/93)	4,4 % (4/91)	7,1 % (6/84)	8,1 % (3/37)	5,9 % (1/17)
	Essonne	12,9 % (12/93)	8,8 % (8/91)	4,8 % (4/84)	13,5 % (5/37)	29,4 % (5/17)
	Hauts-de-Seine	4,3 % (4/93)	5,5 % (5/91)	7,1 % (6/84)	10,8 % (4/37)	/
	Seine-Saint-Denis	7,5 % (7/93)	8,8 % (8/91)	9,5 % (8/84)	8,1 % (3/37)	11,8 % (2/17)
	Val-de-Marne	32,3 % (30/93)	19,8 % (18/91)	10,7 % (9/84)	29,7 % (11/37)	23,5 % (4/17)
	Val d'Oise	2,2 % (2/93)	8,8 % (7/91)	3,6 % (3/84)	/	/
Départements limitrophes à l'IdF	Aines, Aube, Eure, Eure-et-Loir, Loiret, Marne, Oise, Yonne	/	1,1 % (1/91)	3,5 % (3/84)	/	/
Hors des départements limitrophes à l'IdF		1,1 % (1/93)	/	/	2,7 % (1/37)	/
Absence d'in- formation		3,2 % (3/93)	7,7 % (7/91)	14,3 % (12/84)	5,4 % (2/37)	5,9 % (2/17)

1 : La catégorie « mésanges » regroupe les mésanges charbonnières et les mésanges bleues pour un effectif final de 93 individus.

b. *Age des oiseaux*

La période d'étude de mars à octobre 2021 a été marquée par une forte saisonnalité avec l'afflux de juvéniles (Tableau 7 et Tableau 8), potentiellement plus sensibles aux infections par les tiques.

Tableau 7 : Répartition des corvidés en fonction de l'âge à l'admission au ChuvFs

		Corvidés				Total
		Corneille noire n = 192	Pie bavarde n = 143	Geai des chênes n = 20	Corbeau freux n = 3	n = 358
Age	Adulte	21,9 % (42/192)	30,0 % (34/143)	30,0 % (6/20)	3/3	23,7 % (85/358)
	Juvenile	78,1 % (150/192)	70,0 % (109/143)	70,0 % (14/20)	/	76,3 % (273/358)

Tableau 8 : Répartition des autres passereaux en fonction de l'âge à l'admission au ChuvFs

		Autres passereaux					Total
		Mé- sanges n = 93	Merle noir n = 91	Moineau do- mestique n = 84	Etourneau sansonnet n = 37	Rouge-gorge familier n = 17	n = 322
Age	Adulte	8,6 % (8/93)	22,0 % (20/91)	10,7 % (9/84)	21,6 % (8/37)	5,9 % (1/17)	14,3 % (46/322)
	Juvenile	91,4 % (85/93)	78% (71/91)	89,3 % (75/84)	78,4 % (29/37)	94,1 % (16/17)	85,7 % (276/322)

Les trois-quarts des corvidés admis sont des juvéniles (76,3 %) et cette proportion s'accroît encore chez les autres passereaux avec 85,7 % de l'effectif total.

c. Motif d'admission des oiseaux

A partir de l'examen des dossiers médicaux des oiseaux, deux grands motifs d'admission se dégagent : 1- Les individus apportés au ChuvFs en état de choc ou après un traumatisme (fracture ouverte, fermée, suspicion d'attaque d'un prédateur) et 2 - ceux dont l'examen clinique n'a pas révélé d'anomalie. Pour certains oiseaux morts ou euthanasiés, le motif d'admission n'était pas renseigné.

Tableau 9 : Répartition des corvidés en fonction du motif d'admission au ChuvFs et de l'âge

		Corvidés				Total
		Corneille noire n = 192	Pie bavarde n = 143	Geai des chênes n = 20	Corbeau freux n = 3	n = 358
Etat de choc ou contexte traumatique	Adulte	8,85 % (17/192)	9,8 % (14/143)	20,0 % (4/20)	2/3	37
	Juvenile	25,5 % (49/192)	23,1 % (33/143)	25,0 % (5/20)	/	87
Ramassage sans traumatisme visible	Adulte	2,1 % (4/192)	2,1 % (3/143)	5,0 % (1/20)	/	8
	Juvenile	41,7 % (80/192)	35,0 % (50/143)	35,0 % (7/20)	1/3	138
Absence d'information	Adulte	10,9 % (21/192)	11,9 % (17/143)	5,0 % (1/20)	/	39
	Juvenile	10,9 % (21/192)	18,2 % (26/143)	10,0 % (2/20)	/	49

Parmi les jeunes corvidés (n = 273), un jeune sur deux est ramassé sans traumatisme (50,4 %) et quasiment un tiers (31,8 %) l'est en état de choc. En ce qui concerne la catégorie des adultes (n = 84), 44,0 % sont en état de choc au moment de l'admission et moins d'un sur dix (9,5 %) est ramassé sans traumatisme (Tableau 9).

Tableau 10 : Répartition des autres passereaux en fonction du motif d'admission au ChuvFs et de l'âge

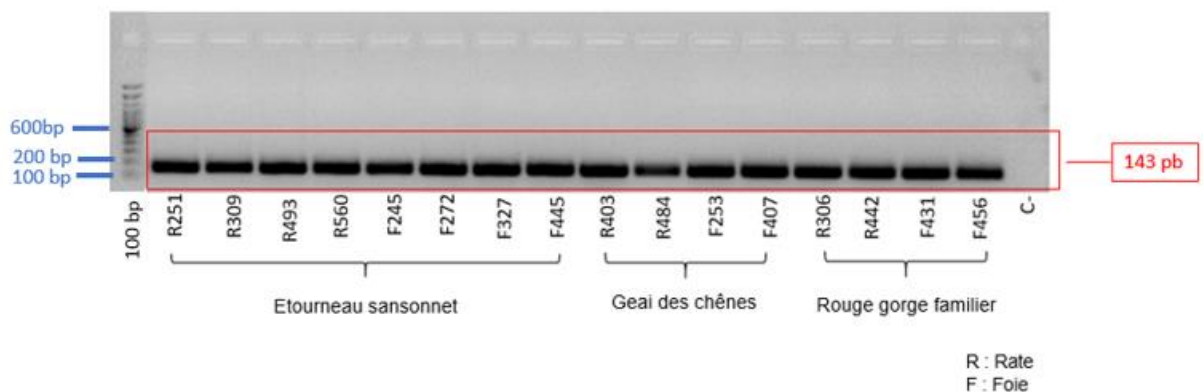
		Autres passereaux					Total
		Mé- sanges n = 93	Merle noir n = 91	Moineau domes- tique n = 84	Etourneau sansonne n = 37	Rougegorge familier n = 17	n = 322
Etat de choc ou contexte traumatique	Adulte	7,5 % (7/93)	9,9 % (9/91)	7,1 % (6/84)	13,5 % (5/37)	/	27
	Juvenile	29,0 % (27/93)	28,6 % (26/91)	29,8 % (25/84)	43,3 % (16/37)	52,3 % (9/17)	103
Ramassage sans traumatisme visible	Adulte	/	3,3 % (3/91)	/	2,7 % (1/37)	/	4
	Juvenile	55,9 % (52/93)	17,6 % (16/91)	40,5 % (34/84)	32,4 % (12/37)	35,3 % (6/17)	120
Absence d'information	Adulte	2,2 % (2/93)	8,8 % (8/91)	3,6 % (3/84)	5,4 % (2/37)	5,9 % (1/17)	16
	Juvenile	5,4 % (5/93)	31,9 % (29/91)	19,0 % (16/84)	2,7 % (1/37)	5,9 % (1/17)	52

Parmi les jeunes oiseaux des autres passereaux (n = 276), moins d'un individu sur deux est ramassé sans traumatisme (43,6 %) et plus d'un tiers (37,5 %) l'est en état de choc. En ce qui concerne la catégorie des adultes (n = 47), 57,7 % sont en état de choc au moment de l'admission et moins d'un sur dix (8,4 %) est ramassé sans traumatisme (Tableau 10).

D. Résultats de la PCR *ARNr 12S*

Le contrôle de la conformité de l'extraction d'ADN s'est révélé concluant. En effet, l'amplification du gène *ARNr 12S* a révélé la présence d'un amplicon de 143 pb pour tous les prélèvements testés (10 % de l'effectif total de chaque espèce de passereaux) et aucun amplicon n'a été obtenu pour les contrôles négatifs (Figure 16). Ainsi chaque résultat négatif à la qPCR *msp2* sera bien spécifique d'une absence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans l'éluat d'extraction et ne sera pas imputable à un quelconque défaut de mise en œuvre du protocole au moment de l'étape d'extraction de l'ADN.

Figure 17 : Résultats d'électrophorèse après révélation sous UV de l'amplification par PCR *ARNr 12S* (échantillons de rate et de foie) pour les effectifs d'Etourneaux sansonnets, Geais des chênes et Rouges-gorges familiaux



E. Résultats de la qPCR *msp2*

Les témoins positifs réalisés lors des qPCR *msp2* ont donné des résultats conformes avec des valeurs de Ct éloignées de moins d'un point d'écart-type pour chacun des dupliquats indiquant de bonnes pratiques de manipulation. De même, les témoins négatifs ont tous fourni des résultats négatifs.

Concernant les échantillons de rate et de foie des passereaux de l'étude, deux oiseaux (n°739 et 759) ont fourni des résultats positifs en dupliquât pour la rate ($\overline{Cp(739)} = 32,22$; $\sigma = 0,02$ et $\overline{Cp(759)} = 28,34$; $\sigma = 0,02$ respectivement) et/ou le foie ($\overline{Cp(739)} = 35,55$; $\sigma = 0,09$ et $\overline{Cp(759)} = 29,57$; $\sigma = 0,10$ respectivement) à la qPCR indiquant la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans les éluats d'extraction. La peau de ces individus a donc également

été testée par qPCR et a également fourni un résultat positif en duplicat ($\overline{Cp(739)} = 26,59$; $\sigma = 0,04$ et $\overline{Cp(759)} = 29,64$; $\sigma = 0,10$ respectivement). Les peaux des échantillons associées à des résultats négatifs pour la rate et pour le foie n'ont en revanche pas été testées en qPCR.

Les échantillons positifs étaient issus tous deux de jeunes merles noirs. Certaines données sont manquantes pour le n°739, à savoir son département de découverte et son motif d'admission. En revanche, le n°759 provient du département de l'Essonne (91), plus précisément de la forêt départementale du rocher dans la commune de Saulx-les-Chartreux (91 160) et a été admis en état de choc au ChuvFs.

Globalement, il en ressort que la proportion de passereaux de l'étude hébergeant la bactérie (ou tout du moins son ADN) est très faible.

F. Résultats du séquençage des produits de qPCR par la société Eurofins

Les produits de séquençage de la qPCR (77 pb) ont été comparés à la base de données BLAST NCBI mais ils n'ont pas permis de confirmer la présence d'*A. phagocytophilum*.

G. Résultats des PCR nichées

a. PCR nichée ciblant la séquence de l'ARNr 16S

Aucun amplicon n'a été obtenu pour les témoins négatifs tandis que les contrôles positifs ont donné des amplicons de tailles conformes à celles attendues. L'amplification de la séquence de l'ARNr 16S a révélé la présence de deux amplicons de 932 et 546 pb identiques à ceux du témoin positif pour la rate, le foie et la peau du n°759 et uniquement pour la peau pour le n°739 (Figure 18 et Figure 19). Ces résultats semblent compatibles avec la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans ces échantillons.

Figure 18 : Résultats d'électrophorèse de la PCR 1 Ge3a-G10R (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR *msp2*

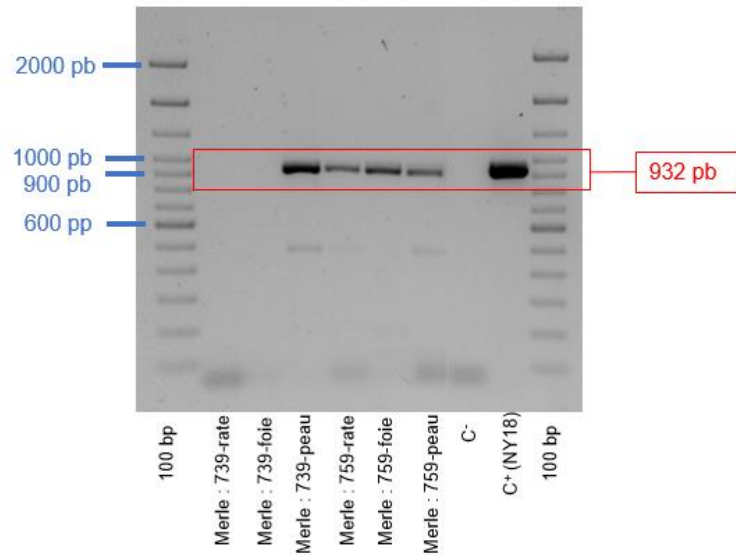
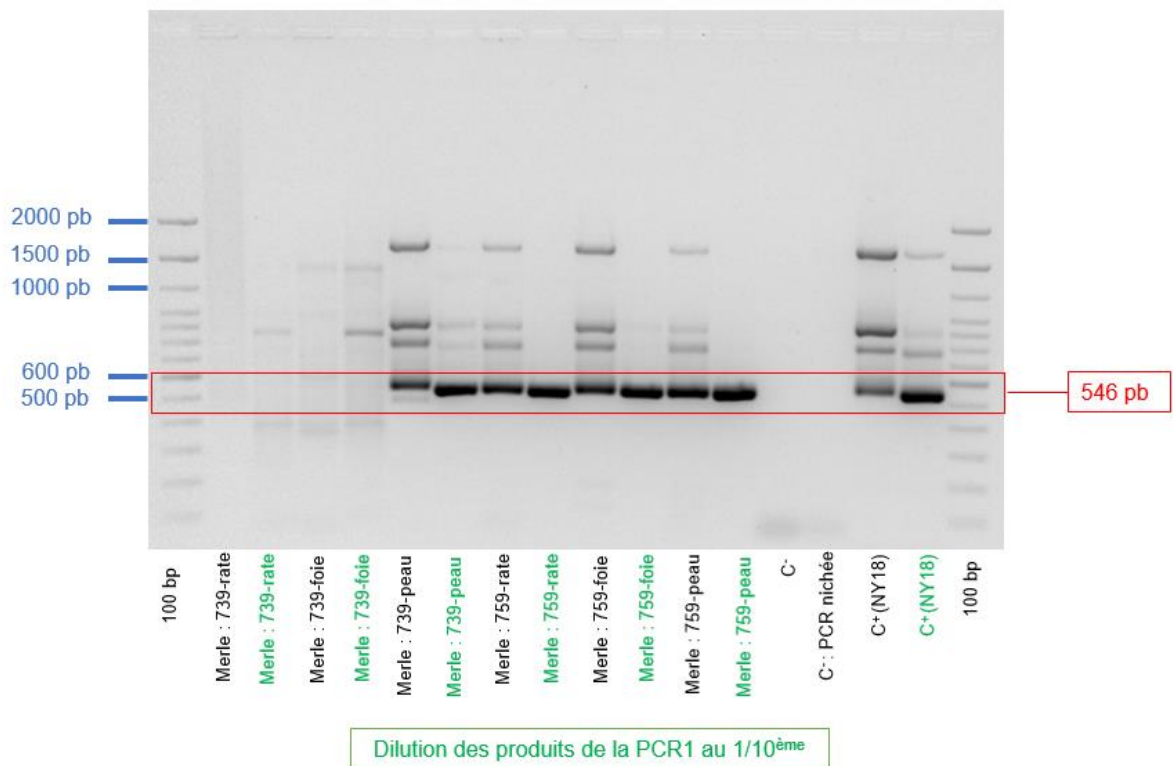


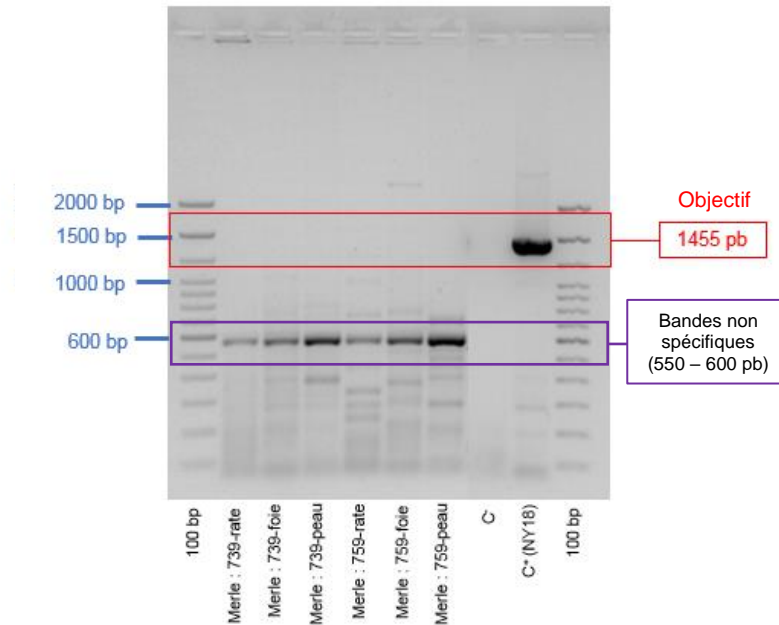
Figure 19 : Résultats d'électrophorèse de la PCR 2 Ge9F-Ge2R (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR *msp2*



b. *PCR nichée ciblant le gène typA*

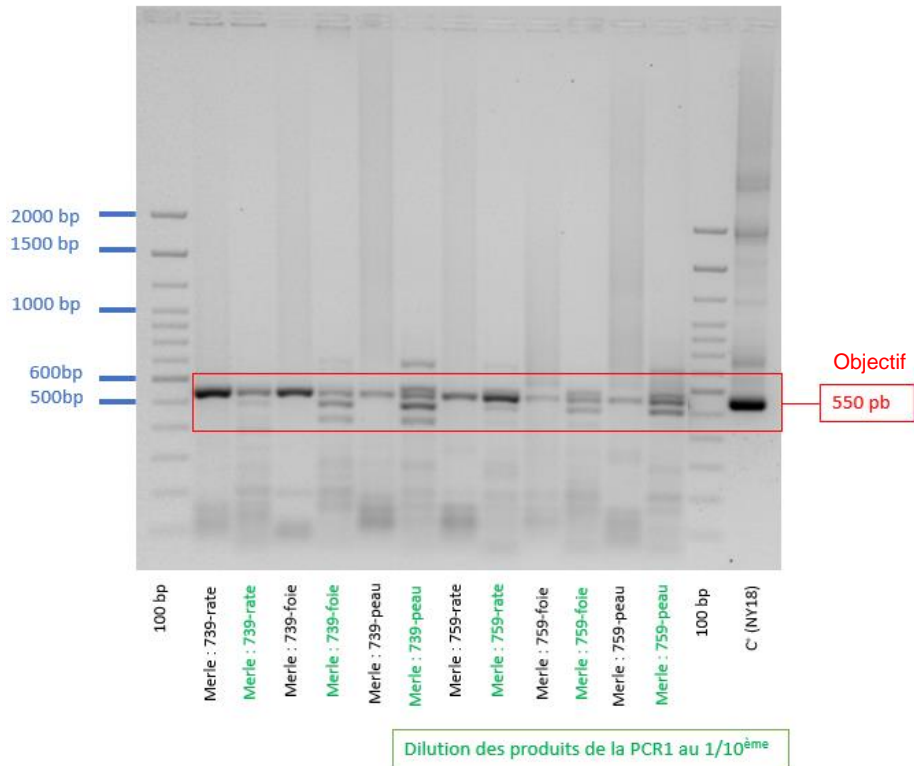
Aucun amplicon n'a été obtenu pour les témoins négatifs tandis que les témoins positifs ont donné des amplicons de tailles conformant à celles attendues (1455 pb lors de la typA Ext et 550 pb lors de la typA Int).

Figure 20 : Résultats d'électrophorèse de la PCR typA Ext (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR *msp2*



Contrairement à ce qui était attendu, l'amplification de la séquence typA Ext a révélé la présence d'un amplicon de 550 à 600 pb pour l'ensemble des échantillons (Figure 20).

Figure 21 : Résultats d'électrophorèse de la PCR typA Int (échantillons de rate, foie, peau) chez les oiseaux ayant donné des résultats positifs à la qPCR *msp2*



Comme attendu, l'amplification de la séquence typA Int a révélé la présence d'un amplicon de 550 pb pour l'ensemble des échantillons (Figure 21) ainsi que des bandes non spécifiques de tailles supérieures et inférieures à 550 pb.

Ces résultats semblent compatibles avec la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans ces échantillons.

H. Résultats des séquençages par la société Eurofins

Les produits de séquençage des PCR nichées *ARNr 16S* et *typA* ont été comparés à la base de données BLAST NCBI et sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Résultats du séquençage des produits des PCR nichées

ARNr 16S						
Echantillon		739			759	
Organe	Rate	Foie	Peau	Rate	Foie	Peau
Résultats	PCR 1 : Ge3a- G10R	Absence de sé- quençage (pas d'amplicon à la PCR)	ID du genre <i>Anaplasma</i>		ID du genre <i>Anaplasma</i>	
	PCR 2 : Ge9F- Ge2R		ID <i>Aph</i>			
typA						
Echantillon		739			759	
Organe	Rate	Foie	Peau	Rate	Foie	Peau
Résultats	PCR 1 : typA Ext	Séquences spécifiques d'oiseaux mais non spécifiques du genre <i>Anaplasma</i>				
	PCR 2 : typA Int	ID <i>Aph</i>				

ID : Identification ; Aph : *A. phagocytophilum*

Pour les trois échantillons de l'oiseau 759, le séquençage des produits de la PCR *ARNr 16S* a permis de confirmer la présence d'ADN du genre *Anaplasma* tandis que celui de la PCR *typA Int* est parvenu à mettre en évidence la présence de l'espèce *A. phagocytophilum*.

Pour l'oiseau 739, le séquençage des produits de la PCR *ARNr 16S* de l'échantillon de peau a permis de confirmer la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum*. Ce résultat a pu être étendu au foie et à la rate après le séquençage des produits de la PCR *typA Int*.

4. Discussion

A. Flux migratoires des oiseaux en France et risques de dissémination des maladies transmissibles par les tiques

La grande majorité des passereaux de notre étude ont un mode de vie sédentaire (voir en détail les Tableau 12 et Tableau 13 dans la suite de la discussion) et peuvent donc être infestés par des tiques (susceptibles d'être infectées par *A. phagocytophilum*) présentes dans leur environnement ou sur un individu sédentaire de la colonie, mais aussi par proximité avec des espèces aviaires potentiellement migratrices présentes sur le territoire français et possiblement porteuses de tiques vectrices (et elles-mêmes susceptibles d'être infectées par cet agent pathogène) telles que *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. trianguliceps*, *I. persulcatus* ou encore *I. frontalis*. En effet, la France métropolitaine voit passer chaque année, à l'automne et au printemps, plusieurs millions d'oiseaux migrateurs. Généralement la majorité de ces oiseaux se déplacent du nord (Scandinavie, îles britanniques, Europe du Nord) vers le sud (bassin méditerranéen, Afrique) à l'automne en raison du manque de ressources alimentaires lié aux changements de saison. Puis, ils migrent en sens inverse, avant la saison de reproduction pour trouver un habitat favorable en matière de ressources nutritives indispensables à leur survie et à celle de leur progéniture (Mission Migration, 2007). Durant ces semaines ou ces mois de trajet, les oiseaux doivent traverser diverses barrières naturelles (mers, montagnes, déserts), subir des conditions météorologiques parfois difficiles, s'accommoder des vents et trouver des sites de halte leur permettant de reconstituer leurs réserves.

Les ornithologues observent ce phénomène de migration sur des sites d'observations qui ont la particularité de voir converger les oiseaux migrateurs, en raison de leur topographie et de leurs emplacements sur les routes migratoires. Aujourd'hui, le site *Migraction.net* (<https://www.migraction.net/>) recense une cinquantaine de ces sites de comptages dont une quinzaine se trouve sur le littoral atlantique et une trentaine se situe à l'est d'une ligne reliant les Ardennes aux Pyrénées-Atlantiques (Figure 22 [1]) (Mission Migration, 2007).

Les flux migratoires sont peu perceptibles en-dehors de quelques points offrant une singularité géographique : col de montagne, falaise, détroit ou promontoire côtier. Sur le territoire français, deux principaux couloirs migratoires sont identifiés : l'un occidental longeant la Manche et la côte Atlantique, l'autre oriental suivant un axe Rhin-Rhône. Ils sont complétés par deux autres couloirs importants démarrant des pays frontaliers du Nord et du Nord-Est de la France : l'un relie la Loire en passant par les régions Hauts-de-France, Ile-de-France et Centre-Val-de-Loire ; l'autre longe le parcours fluvial de la Meuse à travers la région du Grand-Est (Figure 22 [2]) (ANSES, 2021 ; Ligue pour la Protection des Oiseaux *et al.*, 2007).

La mobilité des oiseaux migrateurs, ainsi que leur rôle dans les cycles de transmission de divers agents pathogènes ont un impact sur l'émergence et la propagation de diverses zoonoses sur le territoire. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo en est une illustration récente. Cette maladie virale, présente en Afrique, en Asie et depuis 2016 en Espagne, est transmissible aux humains via des vecteurs tiques du genre *Hyalomma* (notamment *H. marginatum*) qui sont théoriquement absentes en Europe du Nord (du fait d'un climat local ne permettant pas l'installation pérenne de ces espèces de tiques). Actuellement, aucun cas humain n'a été détecté en France et seules des sérologies positives dans le cheptel corse

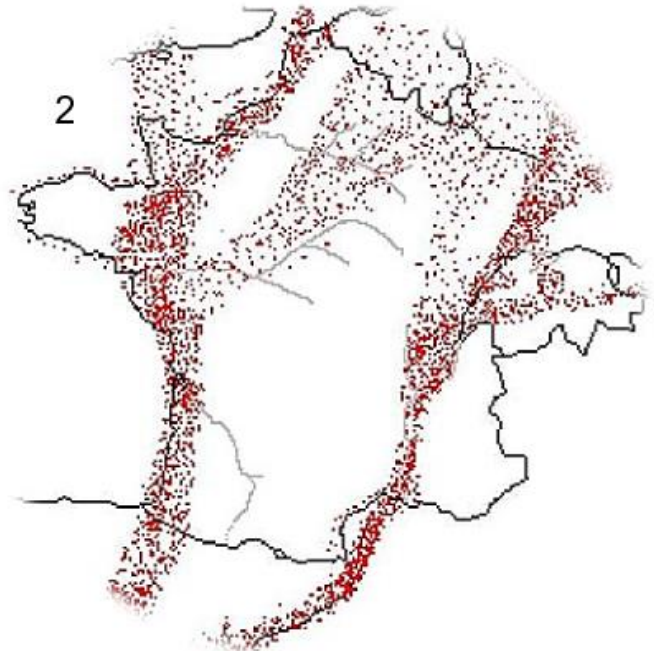
(avec 9 % de l'ensemble des animaux testés) ont été recensées (Reynard *et al.*, 2021). Néanmoins, des études récentes ont montré la présence de *H. marginatum* en Allemagne et en France (notamment dans le pourtour méditerranéen français) suggérant que ces espèces pourraient à l'avenir s'implanter à des latitudes plus élevées (Vial *et al.*, 2016b) (Figure 22 [3]). Cette augmentation de l'aire de répartition de ces tiques sur le territoire français, localisée préférentiellement sur le trajet du couloir de migration oriental Rhin-Rhône, pourrait résulter des migrations aviaires en provenance entre autres d'Afrique (Stachurski et Vial, 2018) mais aussi de la distribution des oiseaux migrateurs partiels et sédentaires (tels que le rouge-gorge familier, l'accenteur mouchet ou encore la fauvette à tête noire) sur lesquels la présence de ces tiques a déjà été observée (Vial *et al.*, 2016a). Récemment encore, la direction générale de l'alimentation a identifié le long de ces couloirs de migration, des zones humides à « risque particulier » pour le virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (Figure 22 [4]) (ANSES, 2021). En 2022, le démarrage de la 1^{ère} flambée d'IAHP (Sud-Ouest) est imputable à des migrations descendantes alors que celui de la 2^{ème} flambée (Pays-de-Loire) est attribué à des migrations ascendantes.

Dans le contexte de l'anaplasmose granulocytaire, la migration aviaire permet donc potentiellement le transport transcontinental rapide de l'agent pathogène et de vecteurs susceptibles de créer de nouveaux foyers de la maladie dans des environnements réceptifs. De plus, il est légitime de penser que ces zones à « risque particulier » qui constituent finalement des territoires de rassemblement à forte densité d'oiseaux migrants et sédentaires, puissent aussi être propices à des contacts et des échanges de tiques potentiellement infectées par *Anaplasma phagocytophilum*.

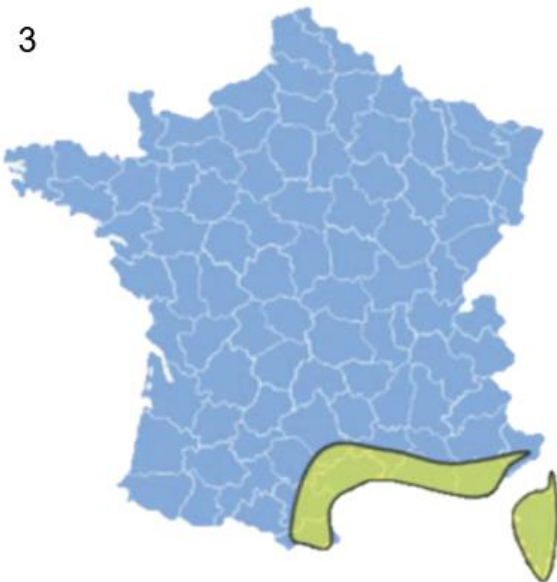
Figure 22 : Les flux migratoires et les zones à risques pour la transmission d'agent pathogène en France (modifié d'après (Reynard *et al.*, 2021 ; ANSES, 2021 ; Ligue pour la Protection des Oiseaux *et al.*, 2007)).



○ Sites de comptage des oiseaux (toutes espèces) d'après « Migration.net »



Flux migratoires identifiés en France métropolitaine



Présence de *Hyalomma marginatum*



Zone à risque particulier pour l'influenza de type A hautement pathogène

B. Géographie de l'Ile-de-France

En plus d'être dans un couloir de migration aviaire, la région Ile-de-France n'est pas majoritairement urbaine selon l'Inventaire forestier national. Les zones agricoles couvrent plus de la moitié de la surface totale (51 %), viennent ensuite les espaces forestiers et boisés qui occupent 23 % du territoire (soit une proportion à peine inférieure à la moyenne nationale de 29 %) puis les zones urbaines avec 21 % de la superficie totale de la région (Inventaire forestier national, 2020). La surface boisée régionale est assez stable depuis plusieurs décennies et certains massifs forestiers de la région (Fontainebleau et Rambouillet par exemple) sont reconnus de longue date comme étant de remarquables réservoirs de biodiversité à l'échelle nationale. Les 5 % de territoire restant se répartissent entre les zones humides (2 %) et les autres espaces ruraux (3 %) de type friches, pelouses, prairies ou encore landes (Inventaire forestier national, 2020). Ces milieux abritent généralement une grande variété d'espèces de vertébrés, en particulier d'espèces d'oiseaux.

C. Effet de l'urbanisation sur la population des tiques et des hôtes

L'urbanisation, en tant que facteur sociodémographique, s'est accentuée dans le monde entier au cours des dernières décennies. Actuellement, plus de la moitié de la population mondiale vit dans des zones urbaines, et il est prévu que ce pourcentage atteigne 70 % d'ici 2050 (United Nations. Department of Economic and Social Affairs, 2019).

Les concentrations urbaines, avec leurs parcs publics, leurs jardins ou leurs zones de loisirs périphériques peuvent cependant favoriser la transmission des agents pathogènes en augmentant les interfaces et les probabilités de contacts avec les hôtes et constituent des microclimats plus accueillants et propices aux micro-organismes et à leurs vecteurs (Bradley et Altizer, 2007). De plus, la majorité des espèces sauvages que l'on trouve couramment dans les zones urbaines et les sites périurbains peut également servir d'hôtes de liaison des tiques voire possiblement de réservoirs d'agents pathogènes transmis par les tiques. En outre, la majorité de ces espèces sont capables de s'adapter à l'environnement urbain et périurbain et d'atteindre des densités de populations plus élevées que dans les habitats naturels (Rizzoli *et al.*, 2014). De plus, l'adaptation des animaux sauvages à l'environnement urbain et péri-urbain peut également conduire à une augmentation de leur proximité avec les humains et accentuer le risque d'exposition aux agents zoonotiques (Niemelä *et al.*, 2011), ces espèces pouvant jouer le rôle d'hôtes de liaison (voire de réservoirs) et/ou d'hôtes nourriciers des tiques infectées.

Ainsi, l'urbanisation peut modifier la biologie et la densité des populations de tiques comme de leurs hôtes et conduire à une transmission accrue d'agents pathogènes entre vecteurs et hôtes adaptés à l'environnement urbain. De plus, l'urbanisation s'accompagne d'une mobilité accrue des humains, d'un commerce intensif sur de longues distances et de nouvelles interfaces entre humains et animaux de compagnie d'une part et environnements naturels ou semi-naturels d'autre part, ce qui peut contribuer à modifier les cycles épidémiologiques dans ces zones fortement anthropisées (Uspensky, 2014)

D. L'avifaune, bien présente en ville

Les passereaux affectionnent les milieux agricoles, mais également les zones urbaines et périurbaines où les effectifs d'un certain nombre d'espèces ne cessent de croître ces dernières années. Ils se sont bien adaptés à ces environnements transformés par l'Homme, où ils trouvent des abris et de la nourriture en quantité pour assurer leur fonction de reproduction. En effet, ces oiseaux omnivores et opportunistes s'accommodent parfaitement des déchets alimentaires d'origine anthropique (Tableau 12 et Tableau 13).

Tableau 12 : Territoires de nidifications, mode de vie et alimentation des corvidés de l'étude (source : d'après (Brichetti et Dicapi, 2000))

Corvidés	Corneille noire	Pie bavarde	Geai des chênes	Corbeau freux
Territoires de nidifications	Milieux urbains et ruraux	Tous les milieux boisés et humides y compris à proximité des zones urbaines	Tous les milieux boisés et humides y compris à proximité des zones urbaines	Milieux urbains (incluant parcs, jardins potagers et d'agrément) et plaines
Mode de vie	Sédentaire à erratique l'hiver			
Alimentation	Omnivore et nécrophage, s'alimentant préférentiellement au sol	Omnivore s'alimentant préférentiellement au sol	Omnivore	Omnivore et nécrophage, s'alimentant préférentiellement au sol

Tableau 13 : Territoires de nidifications, mode de vie et alimentation des autres passe-reaux de l'étude (source : d'après (Brichetti et Dicapi, 2000))

Passereaux	Mésange charbon- nière/bleue	Merle noir	Moineau do- mestique	Etourneau sansonnet	Rouge-gorge familier
Territoires de nidifica- tions	Tous les mi- lieux boi- sées (dont les haies) et humides y compris à proximité des zones urbaines	Milieus ur- bains, plans à vallonnées parsemés d'arbres et de zones humides (maré- cages, rives des fleuves)	Tous les mi- lieux (ville, plaine et montagne) à condition d'être à proximité des zones ur- baines	Milieus ur- bains (in- cluant parcs, jar- dins pota- gers et d'agrément) ou régions planes et vallonnées	Tous les milieux boisées et hu- mides y compris à proximité des zones urbaines
Mode de vie	Sédentaire à erratique l'hiver				Migrateur noc- turne (hiverne en hiver - pourtour médi- terranéen et abords du golfe Persique)
Alimenta- tion	Omnivore, s'alimentant préférentielle- ment au sol			Omnivore	Omnivore s'ali- mentant préfé- rentiellement au sol

Les espaces verts dans les villes (dont les surfaces se développent) pouvant servir d'habitats pour ces espèces porteuses de tiques et la réduction de la pollution atmosphérique et sonore, s'ils améliorent le bien-être des citoyens, peuvent favoriser la nidification des oiseaux et contribuer à leur prolifération et également permettre l'installation de populations de tiques. Ainsi, le contact direct et indirect peut se faire en diverses occasions et lieux : les jardins publics, les parcs, les marchés, les gares etc. d'autant que leurs habitudes comportementales consistant à se rassembler et à se reposer sur les toits, les balcons ou les rebords de fenêtres, les rapprochent d'autant plus des humains qu'ils ont tendance à perdre leur traditionnelle méfiance vis-à-vis de l'espèce humaine ne faisant pas l'objet d'actes de prédation de la part de cette dernière.

Un autre facteur de l'essor des oiseaux en agglomération reste la proximité des terri-
toires ruraux, autorisant des flux d'oiseaux entre zones citadines et rurales : ils peuvent trouver

à l'extérieur des villes des ressources alimentaires notamment, et venir se réfugier, dormir ou se reproduire en zone urbaine.

E. Méthode analytique et résultats de la collecte

a. Une étude préliminaire de la prévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez les oiseaux d'Ile-De-France

Cette étude préliminaire est une étude épidémiologique descriptive, plus précisément une étude transversale (Toma *et al.*, 2018). En effet, les oiseaux ont été collectés sur une période courte et dans une zone géographique déterminée afin d'obtenir une image instantanée de la présence d'*A. phagocytophilum* chez ces derniers. Notre enquête par sondage avait un objectif essentiellement semi-quantitatif : évaluer la présence d'*A. phagocytophilum* au sein des oiseaux d'Ile-de-France ainsi que dans les départements limitrophes et si possible en estimer la prévalence au niveau de notre échantillon.

Dans notre étude, l'échantillon était empirique dans le sens où il n'avait pas été déterminé par un tirage au sort. Il était fondé sur une opportunité de capture rendue possible car il s'agissait d'oiseaux chétifs, en détresse ou traumatisés. Ce type d'échantillon présente cependant l'inconvénient de ne pas être représentatif de la population et de comporter un biais notable de recrutement (Toma *et al.*, 2018). Or le facteur conditionnant l'exactitude d'un résultat en enquête descriptive est la représentativité de l'échantillon, obtenue par le tirage au sort. Nous devons donc nous attendre à ce que les résultats de cette étude ne soient pas totalement exacts, c'est-à-dire, éloigné de la valeur réelle de la prévalence d'*A. phagocytophilum* dans la population cible.

Aussi, pour un échantillon empirique, il n'est pas pertinent de définir un intervalle de confiance d'un pourcentage de prévalence inexact (Toma *et al.*, 2018). Les pourcentages de prévalence ont été calculés uniquement à titre indicatif, pour refléter la rareté de la présence de l'ADN d'*A. phagocytophilum* dans l'échantillon et uniquement dans ce but. Nous devons donc rester prudents dans l'interprétation des résultats de prévalence que nous avons obtenus lors de notre étude préliminaire portant sur l'infection par *A. phagocytophilum* chez les oiseaux d'Ile-de-France.

b. Les effectifs d'oiseaux

Les données de la littérature scientifique sur la prévalence d'*A. phagocytophilum* imposaient d'inclure dans cette étude plus d'une centaine d'individus par espèce : seuls les effectifs des corneilles noires et des pies bavardes ont répondu à cet objectif (Tableau 4 : Bilan brut de la collecte des passereaux de mars à octobre 2021 (par ordre d'effectif décroissant selon l'espèce) et tentative d'estimation de la proportion de chacune d'elle en IdF (modifiée d'après (Centre Ornithologique Ile-de-France *et al.*, 2010; Malher, 2020))). Ce résultat était prévisible. Au cours des dernières années, les bilans d'activité du ChuvFs, disponibles sur leur base de données, font état d'une importante admission de pies bavardes et de corneilles noires au sein des corvidés, tandis que parmi les espèces d'autres passereaux, les plus fréquemment reçues

sont le merle noir, le moineau domestique, les mésanges bleues et charbonnières et les étourneaux sansonnets. Cette tendance se retrouve à l'identique au sein de notre échantillon. Notre échantillon est donc le reflet de cette fréquence d'accueil mais ce reflet est finalement assez éloigné de la fréquence calculée des espèces d'oiseaux sauvages en IdF, notamment pour trois des espèces de passereaux fréquemment rencontrés dans notre étude, à savoir la corneille noire, la pie bavarde et le moineau domestique (Tableau 14, Annexes 4 et 5). Des biais sont identifiables au niveau des calculs de cette fréquence (qui peut ne pas refléter la réalité biologique comme souligné par Malher (2020)) et dans le protocole de la collecte. Premièrement, au niveau du profil des oiseaux, s'agissant d'oiseaux amenés dans un centre de soins et non de la population tout-venant des espèces concernées, il n'est pas surprenant d'avoir des différences. De plus, pour l'exemple des moineaux domestiques, s'agissant de passereaux de petit format, il est possible d'envisager qu'ils soient moins souvent ramassés par des passants car moins visibles. Par analogie, le format des corneilles noires et des pies bavardes (adultes comme juvéniles), les rendent davantage visibles et donc propices à un ramassage, susceptibles d'expliquer les pourcentages plus importants obtenus dans notre étude. Par ailleurs, les effectifs de passereaux de petit format (moineau domestique ou rouge-gorge familier notamment) sont inférieurs à ceux réellement obtenus au cours de la collecte car certains des cadavres de ces oiseaux n'ont pas supporté le processus de décongélation (autolyse très marquée) rendant les prélèvements impossibles sur eux. Leurs proportions respectives sont donc forcément minorées par rapport à la population d'IdF. Enfin, il nous faut aussi garder à l'esprit que même si 86,4 % des corvidés et 90,1 % des autres passereaux proviennent d'IdF, une partie des oiseaux de notre échantillon (13,6 % des corvidés et 9,9 % des autres passereaux) ont une origine différente ou inconnue, ce qui peut en partie expliquer les différences obtenues entre les fréquences obtenues pour notre échantillon et celles calculées pour les espèces d'oiseaux sauvages en IdF.

Tableau 14 : Bilan brut de la collecte des espèces de passereaux retenues pour l'étude (par ordre de proportions décroissantes) et tentative d'estimation de la proportion de chacune d'elle en IdF (modifiée d'après (Centre Ornithologique Ile-de-France *et al.*, 2010 ; Malher, 2020))

Espèce : nom usuel	% selon la famille	% relatif en IdF *
Corneille noire	26,0	4,1
Pie bavarde	19,4	2,3
Merle noir	12,3	14,1
Moineau domestique	11,4	27,0
Mésange charbonnière	9,2	10,4
Etourneau sansonnet	5,0	8,3
Mésange bleue	3,4	6,0
Geai des chênes	2,7	0,9
Rouge-gorge familier	0,02	1,8

c. **Le profil des oiseaux : origine, âge et motif d'admission**

Comme attendu, du fait de son implantation au cœur du Val-de-Marne, le ChuvFs accueille des oiseaux provenant majoritairement des zones urbaines et péri-urbaines de la région d'Ile-de-France (Tableau 5 et Tableau 6).

La période d'étude de mars à octobre 2021 a été marquée par une forte saisonnalité avec l'afflux de nombreux juvéniles (Tableau 7 et Tableau 8) potentiellement davantage sensibles aux infections transmissibles par les tiques. Ce résultat était à nouveau prévisible car la période ciblée correspondait à la fois à la saison de reproduction des hôtes oiseaux et au pic d'activité annuel du ChuvFs consécutif à l'afflux important de juvéniles.

Certaines causes d'admission identifiables sont d'origine anthropique (chocs avec un véhicule, pollutions diverses, etc ...) ou impliquent des prédateurs. Néanmoins, une tendance semble se dégager concernant le motif d'admission des oiseaux au ChuvFs. En effet, les juvéniles sont, la plupart du temps, admis sans traumatisme physique observé. Il s'agit d'oisillons tombés du nid sur lesquels un défaut de développement est constaté ou de juvéniles, ayant quitté le nid mais dépendant encore du nourrissage par les parents et non encore émancipés (Tableau 9 et Tableau 10). Les oiseaux adultes capturés souffrent plus souvent d'un traumatisme incapacitant (fractures ouvertes/fermées, saignements, suspicion de traumatisme avec un objet ou rencontre avec un prédateur).

d. **Le choix des prélèvements**

Aucun prélèvement n'a été réalisé sur des oiseaux restés vivants au ChuvFs (potentiellement les plus valides) pour des raisons éthiques, ce qui a constitué une source de biais. Cela représente environ 51 % des oiseaux accueillis au ChuvFs (soit environ 2 850 individus par an, toutes familles confondues). En effet, d'après le bilan d'activité 2021 du ChuvFs, sur 7 021 animaux admis, 80 % étaient des oiseaux (soit environ 5 600 individus) et le taux de relâché corrigé était de 49 % (Courreau, 2021). Ce taux correspond au rapport entre « animaux relâchés » et « animaux ayant passé le cap des 24 premières heures » (période critique du fait des affections parfois très invalidantes dont souffrent les animaux).

A. phagocytophilum est retrouvée dans le cytoplasme des granulocytes neutrophiles, et plus rarement dans les granulocytes éosinophiles. La rate, de par sa fonction d'organe lymphoïde secondaire capable de stocker des cellules de l'immunité et du sang, constitue un organe approprié pour la détection d'*A. phagocytophilum*. Elle constitue également une alternative à la récupération du sang chez les oiseaux, qui a été jugée trop contraignante dans notre étude. En effet, il aurait fallu que les prélèvements sanguins sont réalisés au niveau de la veine jugulaire droite ou de la veine ulnaire sur des oiseaux fraîchement morts (ou dont le pronostic de survie était suffisamment sombre pour justifier une euthanasie rapide de l'animal), le tout par du personnel habilité (vétérinaire diplômé), complexifiant fortement leur réalisation.

De même, le foie a été prélevé pour plusieurs raisons : l'organe, du fait de sa taille importante, est relativement simple à prélever. Il est richement vascularisé et séquestre un

important volume sanguin. De plus, des études expérimentales ont déjà montré qu'*A. phagocytophilum* circule dans cet organe (Lepidi *et al.*, 2000).

Enfin, chez les oiseaux, les sites d'attachement privilégiés des tiques sont le cou, les zones péri-orbitaires ou proches du bec et du conduit auditif externe présentant une plus faible densité de plumes. Des prélèvements cutanés au niveau de ces zones ont été réalisés pour la recherche de l'ADN d'*A. phagocytophilum*.

A la lumière de nos connaissances, aucune référence bibliographique ne fait état d'une tentative de détection d'*A. phagocytophilum* à partir de prélèvements cutanés chez les oiseaux contrairement aux prélèvements hépatiques (Yang *et al.*, 2015) ou spléniques (Ebani *et al.*, 2016 ; Jahfari *et al.*, 2014 ; Naranjo *et al.*, 2006) qui restent cependant moins utilisés que les prélèvements sanguins (De La Fuente *et al.*, 2005 ; Dingler *et al.*, 2014 ; Hornok *et al.*, 2014 ; Johnston *et al.*, 2013 ; Machado *et al.*, 2012 ; Mongruel *et al.*, 2017 ; Naranjo *et al.*, 2006 ; Sacchi *et al.*, 2021 ; Skoracki *et al.*, 2006 ; Skotarczak *et al.*, 2006). Néanmoins, plusieurs études menées sur des tissus cutanés de rongeurs ont déjà été entreprises et ont permis de mettre en évidence la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* (Svitálková *et al.*, 2015 ; Szekeres *et al.*, 2019, 2015).

e. **Qualité et validité des résultats**

Le choix a été fait d'analyser uniquement les prélèvements de peau issus d'oiseaux ayant permis d'obtenir des résultats en dupliquât positifs (selon le seuil de positivité Ct < 32,6 fixé par Courtney *et al.* (2004)) à la qPCR *msp2* pour le foie et/ou la rate.

Le séquençage des produits de qPCR (77 pb) n'a pas été concluant pour ces échantillons positifs essentiellement pour deux raisons d'après Eurofins (communication personnelle). La première est que la technique de séquençage Sanger est incompatible avec des amplicons d'ADN purifiés contenant des sondes pour la qPCR car leur fluorescence interfère avec les colorants incorporés pour la lecture des bases. L'autre raison est relative à la taille des produits amplifiés qui était trop petite : la taq polymérase utilisée pour la technique Sanger ne lit qu'à partir d'une trentaine de bases après le primer. Il faut estimer qu'en dessous de 50 pb, le séquençage est impossible pour un fragment isolé et qu'en dessous de 100 pb, il reste très aléatoire.

Pour pallier ce problème, des PCR nichées ciblant le gène de l'*ARNr 16S* (932 pb/546 pb) et *typA* (1455 pb/550 pb) ont été entreprises et suivies d'un séquençage des amplicons purifiés conformément à une étude précédente (Capligina *et al.*, 2014).

f. *Résultats de l'épidémiologie moléculaire*

- *Notre étude par rapport à la situation mondiale de la présence d'A. phagocytophilum chez les oiseaux.*

Globalement, il ressort de cette étude que très peu de passereaux échantillonnés ont donné un résultat positif pour l'ADN d'*A. phagocytophilum*. Seuls deux jeunes merles ont été concernés, ce qui correspond à une prévalence totale de 0,27 % (2/739) au sein de notre échantillon. Cette valeur est dans la partie basse des données de prévalences [0 % - 4.6 %] émanant des études européennes portant sur la détection d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les oiseaux (Tableau 15). Ce résultat s'élève à 2,2 % (2/91) s'il est ramené à l'effectif des merles noirs de l'étude.

- *Des oiseaux porteurs d'ectoparasites*

Lors des biopsies, les sacs servant au stockage à -20°C des cadavres d'oiseaux ont révélés la présence de tiques, sans qu'il ne soit possible de savoir à quel(s) oiseau(x) les attribuer. Nous aurions apprécié pouvoir renseigner cette mention à l'aide des dossiers médicaux des animaux. Cette information n'y figurait toutefois pas du fait qu'il n'est pas toujours aisé de mettre en évidence les ectoparasites sur les volatiles. Néanmoins, ces observations *a posteriori* confirment que notre échantillon d'étude était bien porteur de tiques.

Ces acariens n'ont en revanche pas été étudiées contrairement à d'autres études où l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été recherché dans les tiques récoltés sur les oiseaux (Annexe 1). Avec du recul, il aurait été intéressant d'ensacher individuellement les cadavres de chaque oiseau avant la congélation à -20°C afin de pouvoir identifier l'éventuelle présence de tiques. Par la suite, des extractions d'ADN à partir des tissus des tiques auraient pu être entreprises pour rechercher la présence d'*A. phagocytophilum* comme cela a été fait dans d'autres études (Tableau 15 – études surlignées en gris clair).

Tableau 15 : Classement par ordre croissant des prévalences d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les oiseaux et chez les tiques récoltées sur les oiseaux sur les différents continents (Europe de l'Est, de l'Ouest, Amériques du Nord et du Sud et Asie)

Aph : *A. phagocytophilum*

BIPAR : biologie moléculaire et immunologie parasitaires

/ : Aucune étude, sur les oiseaux ou les tiques récoltées sur les oiseaux, référencée sur PubMed® dans le pays en question

N.A.

* : L'intervalle ne comprend pas les pourcentages de prévalences des études ayant eu des résultats positifs à Aph avec des effectifs de tiques inférieurs à n = 10 tiques

** : Cette thèse

Continent	Pays	Prévalence d'ADN d'Aph (%) chez les oiseaux	Prévalence d'ADN d'Aph (%) chez les tiques récoltées sur les oiseaux
Europe de l'Ouest (définie selon l'UNESCO)	Espagne	[2,2 - 4,6] (De La Fuente <i>et al.</i> , 2005 ; Naranjo <i>et al.</i> , 2006)	[0,5 - 5,9] * (De La Fuente <i>et al.</i> , 2005 ; Palomar <i>et al.</i> , 2012 ; Palomar <i>et al.</i> , 2015) <i>(l'unique tique prélevée sur l'oiseau était porteuse d'ADN d'Aph dans l'étude de De La Fuente et al. (2005))</i>
	Italie	[0 - 2,2] (Ebani <i>et al.</i> , 2016 ; Naranjo <i>et al.</i> , 2006)	[0,2 - 3,1] * (Baráková <i>et al.</i> , 2018 ; Chisu <i>et al.</i> , 2018 ; Hoffman <i>et al.</i> , 2020) <i>(une tique sur les quatre prélevées sur les oiseaux était porteuse d'ADN d'Aph dans l'étude de Chisu et al. (2018))</i>
	Pays-Bas	2,9 (Jahfari <i>et al.</i> , 2014)	[5,1 - 12,1] (Jahfari <i>et al.</i> , 2014 ; Heylen <i>et al.</i> , 2017)
	Belgique	2,9 (Jahfari <i>et al.</i> , 2014)	0 (Jahfari <i>et al.</i> , 2014)
	France	0,27 (2,2 % chez les merles noirs) (Thèse vétérinaire - ANSES BIPAR 2021)	**
	Allemagne	/	[1,6 - 3,2] (Franke <i>et al.</i> , 2010 ; Hildebrandt <i>et al.</i> , 2011, 2010)
	Suisse	/	2 (Lommano <i>et al.</i> , 2014)
	Norvège	/	1,2 (Pedersen <i>et al.</i> , 2020)
	Grèce	/	0,2 (Hoffman <i>et al.</i> , 2020)
	Portugal	/	0 (Santos-Silva <i>et al.</i> , 2006)

Continent	Pays	Prévalence d'ADN d'Aph (%) chez les oiseaux	Prévalence d'ADN d'Aph (%) chez les tiques récoltées sur les oiseaux
Europe de l'Est (définie selon l'UNESCO)	Hongrie	0,08 (Hornok <i>et al.</i> , 2014)	[0,5 - 0,7] (Hornok <i>et al.</i> , 2013 ; Hornok <i>et al.</i> , 2014)
	Roumanie	0 (Sándor <i>et al.</i> , 2017)	5,9 (Sándor <i>et al.</i> , 2017)
	Lettonie	/	2 (Capligina <i>et al.</i> , 2014)
	République-Tchèque	/	[0 - 1,6] (Dubska <i>et al.</i> , 2012 ; Honig <i>et al.</i> , 2017 ; Literak <i>et al.</i> , 2008 ; Spitalská <i>et al.</i> , 2011)
	Estonie	/	0,4 (Geller <i>et al.</i> , 2013)
	Pologne	0 (Skoracki <i>et al.</i> , 2006 ; Skotarczak <i>et al.</i> , 2006)	0 (Skoracki <i>et al.</i> , 2006 ; Skotarczak <i>et al.</i> , 2006)

Continent	Pays	Prévalence d'ADN d'Aph (%) chez les oiseaux	Prévalence d'ADN d'Aph (%) chez les tiques récoltées sur les oiseaux
Amérique du Nord et du Sud	Brésil	[6,6 – 14] (Machado <i>et al.</i> , 2012 ; Mongruel <i>et al.</i> , 2017 ; Sacchi <i>et al.</i> , 2021)	0 (Mongruel <i>et al.</i> , 2017)
	EUA	[0 - 0,5] (Dingler <i>et al.</i> , 2014 ; Johnston <i>et al.</i> , 2013)	[0 – 5] (Daniels <i>et al.</i> , 2002 ; Keesing <i>et al.</i> , 2012 ; Hamer <i>et al.</i> , 2012 ; Johnston <i>et al.</i> , 2013 ; Dingler <i>et al.</i> , 2014)
	Canada	/	[0,6 - 1,4] (Milnes <i>et al.</i> , 2019 ; Ogden <i>et al.</i> , 2008)
Asie	Chine	4,4 (Yang <i>et al.</i> , 2015)	/
	Corée du Sud	/	[0,1 - 0,5] (Kang <i>et al.</i> , 2013 ; Seo <i>et al.</i> , 2021)

- *A. phagocytophilum* présente chez deux jeunes oiseaux

Deux jeunes merles noirs ont fourni un résultat positif pour l'ADN d'*A. phagocytophilum* au sein de l'échantillon de l'étude. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude ayant montré une fréquence plus importante de détection de l'ADN de cette bactérie chez des oiseaux juvéniles.

Néanmoins, l'exposition aux tiques semble accrue chez les jeunes oiseaux aux contacts des parents, de la fratrie ou encore du nid. D'après Heylen *et al.* (2014), les oisillons et les juvéniles de mésanges charbonnières et bleues sont susceptibles d'être des hôtes plus « rentables » pour les tiques adultes d'*I. arboricola* que les oiseaux adultes, car ils constituent une bonne ressource alimentaire (renforcée par le nourrissage des adultes), tout en présentant une plus faible résistance immunitaire. De plus, au sein même des oisillons, l'état de développement du plumage peut conditionner la présence de tiques qui s'y abritent. En effet, Heylen *et al.* (2012) ont montré que les tiques adultes d'*I. arboricola* étaient moins susceptibles d'être trouvées attachées aux oisillons récemment éclos de mésange charbonnière (et donc dépourvus de plumage) alors qu'elles étaient présentes sur des oisillons plus âgés présentant un début de plumage. Selon eux, cette différence peut suggérer une stratégie d'infestation par les tiques adaptée à la physiologie et au développement de l'hôte. Enfin, la faible prévalence de tiques adultes chez l'oiseau adulte pourrait être le résultat de compétences de toilettage mieux développées, entraînant une mortalité plus élevée des tiques induite par l'hôte lui-même (Heylen et Matthysen, 2010).

De plus, il est possible d'envisager que nos jeunes merles soient plus sensibles aux maladies infectieuses comme cela a déjà été constaté pour une maladie telle que la borréliose de Lyme, maladie qui partage des vecteurs et des hôtes communs avec l'anaplasmoïose granulocytaire. En effet, l'étude de Dubska *et al.* (2009) révèle une proportion significativement plus élevée de spirochètes appartenant au genre *Borrelia* chez les tiques se nourrissant sur de jeunes grives chanteuses (*Turdus philomelos*) et de jeunes merles eurasiens (*Troglodytes troglodytes*) que chez celles se nourrissant sur des oiseaux adultes, suggérant ainsi que les oiseaux juvéniles sont plus sujets à la spirochémie. Pourtant, chez les oiseaux, nous savons peu de choses concernant les variations intra ou interspécifiques des compétences immunitaires. Néanmoins, il a été démontré sur de jeunes grives mauvis (*Turdus iliacus*), que le stress de la migration pouvait réactiver une infection latente par *Borrelia* spp. après augmentation des glucocorticoïdes endogènes pendant le vol (Gylfe *et al.*, 2000). Ces derniers affectent négativement le système immunitaire et conduisent à une diminution de la réponse anti-bactérienne (Matson *et al.*, 2006). Aussi, les oiseaux juvéniles pourraient subir des changements hormonaux importants liés à la migration ou avoir des réponses immunitaires moins efficaces (Lee *et al.*, 2008) qui augmenteraient leur susceptibilité aux maladies infectieuses. Toutefois dans notre étude, le merle restant une espèce migratrice partielle, c'est-à-dire regroupant des individus sédentaires et des « vrais migrants » (Tableau 13) et s'agissant de jeunes de première année (n'ayant pas encore migré s'ils appartiennent à la seconde catégorie), il n'est pas illogique de penser que la contamination par *A. phagocytophilum* se soit faite localement en France.

- *A. phagocytophilum* présente chez des oiseaux ayant un mode de vie et un régime alimentaire à risque

La présence et la diversité des espèces de tiques sur les oiseaux dépendent du mode de vie (comportement migratoire ou sédentaire), du territoire de nidification et du mode d'alimentation de ces hôtes ainsi que des espèces d'acariens présentes dans les habitats où les oiseaux se reproduisent, de la période d'hivernage et/ou leurs lieux de passage pendant les vols saisonniers (Buczek *et al.*, 2020).

Dans l'étude de Klaus *et al.* (2016), il a été démontré que la distance de migration influence de manière significative les charges de tiques des oiseaux, tant en ce qui concerne la prévalence que la diversité des espèces de tiques présentes sur l'hôte. Une prévalence significativement plus élevée d'infestation par les tiques a été enregistrée chez les oiseaux sédentaires et chez ceux migrant sur de courtes distances (qui hivernent en Europe occidentale et en Afrique du Nord), très probablement en raison de leur présence ou arrivée pendant la saison principale d'activité des tiques. Nos résultats vont dans ce sens étant donné que seuls deux merles noirs présentaient de l'ADN d'*A. phagocytophilum* dans leurs tissus et qu'ils ont un mode de vie propice à l'infestation par les tiques (Tableau 13 : Territoires de nidifications, mode de vie et alimentation des autres passereaux de l'étude (source : d'après (Brichetti et Dicapi, 2000))).

Les endroits riches en végétation des zones urbaines et péri-urbaines constituent des environnements particulièrement propices aux tiques. Dans la phase non parasitaire de leur cycle de vie, les tiques résident à la surface du sol et dans les parties inférieures des plantes, où elles trouvent des conditions d'humidité favorables tout en optimisant leur probabilité de trouver un hôte (Buczek *et al.*, 2020). Par conséquent, les oiseaux qui se nourrissent au sol, qu'ils soient migrateurs ou sédentaires, passent une partie importante de leur existence dans des habitats favorables aux tiques et risquent davantage d'être infestés par ces dernières que les individus se nourrissant en hauteur dans les arbres (Klaus *et al.*, 2016). En Europe, parmi les passereaux, le merle noir semble être prédisposé à héberger des tiques de par son régime omnivore au sol (Hasle, 2013 ; Spitalská *et al.*, 2007) et peut donc possiblement être infecté par les agents pathogènes transmis par les tiques tels qu'*A. phagocytophilum*. Les résultats de notre étude vont à nouveau dans ce sens.

Cependant, nos résultats n'expliquent pas totalement l'absence de positivité à l'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les autres espèces de passereaux partageant des similarités avec le merle noir en terme de territoires de nidification, de mode de vie et de régime alimentaire au sol, que sont les corvidés, le groupe des mésanges et les moineaux domestiques (Tableau 12) et cela alors même que nous disposons pour tous d'une grande majorité de juvéniles (> 70 % des effectifs de chaque espèce) à l'instar du merle noir (78 %) (Tableau 7 et Tableau 8). Cela peut être imputable au manque de représentativité de notre échantillon et/ou tout simplement à une plus faible fréquence d'infection à *A. phagocytophilum* au sein de ces espèces.

- *La nature du prélèvement influence-t-elle le résultat ?*

Les résultats de la qPCR ont révélé des quantités d'ADN d'*A. phagocytophilum* apparemment plus élevées dans les prélèvements cutanés que dans les prélèvements spléniques ou hépatiques.

Dans notre étude, la quantité d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans les prélèvements de foie est inférieure à celles observées dans la rate et la peau. Deux raisons principales pourraient expliquer ce résultat. Tout d'abord, même si seule une partie du foie a été prélevé, ces biopsies étaient généralement plus volumineuses que celles des rates et de la peau, et contenaient potentiellement davantage d'inhibiteurs de la réaction de qPCR dont l'ADN de l'hôte présent dans l'éluat d'extraction. Cette grande quantité d'ADN peut en effet inhiber la réaction de qPCR, réduisant la sensibilité de la réaction d'amplification. De plus, cette biopsie du foie n'était peut-être pas totalement représentative de l'organe. En effet, des études histologiques ont déjà rapporté que les morula contenant *A. phagocytophilum* pouvaient être distribuées de manière inégale dans un prélèvement (Franzén *et al.*, 2009) et ainsi passer inaperçues lors de l'échantillonnage des tissus pour l'analyse. Cela reste toutefois peu probable étant donné la forte sensibilité de la technique de qPCR. Par ailleurs, un passage systémique de la bactérie a lieu au cours de l'infection, assurant la diffusion de l'agent pathogène dans l'organisme et donc dans les organes tels que le foie. En effet, dans leur étude Lepidi *et al.* (2000) ont signalé qu'environ 90 % des neutrophiles infectés dans les tissus profonds de moutons, d'humains et de chevaux étaient observés dans la lumière des vaisseaux sanguins suggérant un passage dans la circulation générale.

Nous nous attendions à ce que la rate (organe lymphoïde et capable de stocker des granulocytes neutrophiles) héberge davantage d'ADN de l'agent pathogène que le foie et que par ailleurs, les zones de peau prélevées soient les plus susceptibles d'héberger la bactérie (étant donné qu'elles constituent les sites d'attache privilégiés des tiques sur les oiseaux). Le fait que la peau soit le prélèvement avec la plus faible valeur de Ct porte à réflexion : d'une part, parce que nous ne connaissions pas la capacité de diffusion ou de rétention de l'agent pathogène dans cet organe chez les oiseaux (quand bien même elle est décrite comme un tissu de « réserve » chez les moutons depuis les travaux de Granquist *et al.* (Granquist *et al.*, 2010a) comme détaillé plus bas dans la discussion) dont les caractéristiques diffèrent de celle des mammifères en termes d'épaisseur ou encore d'élasticité ; d'autre part, la surface prélevée était minime par rapport à la superficie totale de peau disponible sur l'oiseau contrairement à la rate qui a parfois été prélevée en totalité sur les petits sujets. Un manque de représentativité de la peau au moment du prélèvement pouvait être attendu. Enfin, les travaux actuels du group VAMP (vecteurs et agents microbiens pathogène) de l'unité BIPAR sur des hérissons d'Europe semblaient indiquer que les tests sur de la peau fournissaient des valeurs de Ct plus élevées que celles sur de la rate, suggérant pour cette espèce une faible circulation de la bactérie dans ces tissus quand bien même elle est présente dans la rate. Néanmoins, ce résultat pour la peau dans notre étude peut être expliqué par la pathogénicité de la bactérie. En effet, il est possible de supposer que sur ces jeunes merles, des tiques porteuses d'*A. phagocytophilum* aient été accrochées lors de leurs repas sanguins au niveau de ces sites de prélèvements. Sachant qu'ont déjà été décrits une diminution de la mobilité des granulocytes neutrophiles infectés ainsi que leur marginalisation à la surface des cellules endothéliales des

vaisseaux sanguins, permettant un maintien intravasculaire local de l'agent pathogène (Carade *et al.*, 2009), cela pourrait expliquer la présence d'*A. phagocytophilum* dans nos échantillons de peau sans qu'il s'agisse d'un phénomène aléatoire.




Il n'en reste pas moins difficile de déterminer quel est le prélèvement le plus adapté pour les études de prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les hôtes vertébré, chacun des trois tissus testés présentant des avantages et des inconvénients (Tableau 16). La rate des oiseaux est davantage étudiée dans la littérature scientifique (trois études : (Ebani *et al.*, 2016 ; Jahfari *et al.*, 2014 ; Naranjo *et al.*, 2006) mais sa collecte requiert une certaine technicité du préleveur, car sa taille et sa localisation anatomique la rendent moins facile à identifier et à prélever que le foie. De plus, elle s'autolyse et se « liquéfie » très rapidement après décongélation du cadavre de l'oiseau compliquant sa récupération. Par contre en cas de liquéfaction, l'extraction d'ADN s'est révélée plus rapide du fait d'un temps de lyse réduit.

Tableau 16 : Intérêt de chacune des biopsies pour étudier la prévalence d'*A. phagocytophilum*

Aph : *A. phagocytophilum*

* : En prenant comme critère la valeur des Ct (qPCR), les quantités d'ADN d'*A. phagocytophilum* étaient moins importantes dans le foie que dans la rate.

** : Seules les biopsies cutanées des oiseaux ayant fourni des résultats positifs (Ct < 32,6) en duplicat à la qPCR pour la rate et/ou le foie ont été testées soit un effectif de deux peaux, rendant difficile la conclusion sur l'intérêt d'un tel prélèvement chez les oiseaux. Néanmoins, les valeurs des Ct_(peau) étaient inférieures à celles des Ct_(rate) ou Ct_(foie) ce qui semble indiquer que cette biopsie est pertinente pour détecter la présence de la bactérie.

Organe	Taille	Facilité à localiser en vue d'un prélèvement	Etat de conservation (après décongélation de l'oiseau)	Rapidité de la procédure d'extraction ADN	Propice à la détection d'Aph
Rate	Petite	Complicé	Mauvaise	Rapide (1/2 journée)	Oui
Foie				Lente (1 nuit)	± *
Peau	Grande	Peu compliqué	Bonne	Très rapide (1-2 heures)	? **

Avec des délais plus longs, il aurait été intéressant de tester la peau des 759 oiseaux en qPCR *msp2*, indépendamment des résultats de la rate et du foie puisque sur les deux oiseaux chez lesquels l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été détecté, la peau est le tissu qui contenait, en apparence au moins, la plus grande quantité d'ADN bactérien. De plus, la vitesse de digestion de la peau rend envisageable l'extraction d'ADN pour un grand nombre d'échan-

tillon sur une journée (jusqu'à 150) contrairement à la rate et au foie (48 au maximum). Néanmoins, la qPCR est une technique très sensible et même si la bactérie a tendance à demeurer marginalement dans les vaisseaux situés à proximité de la zone de fixation de la tique (Carrade *et al.*, 2009), il semble difficile d'envisager une absence totale de passage systémique de l'agent pathogène au cours de l'infection (Lepidi *et al.*, 2000). Toutefois, une positivité des peaux sans positivité des rates voire des foies semble envisageable. En effet, dans leur étude sur des moutons infectés, Granquist *et al.* (2010) ont émis l'hypothèse que la peau pouvait être un site de persistance d'*A. phagocytophilum*. L'infection locale par la bactérie, au niveau des sites d'attachement des tiques chez les moutons, était caractérisée par des dermatites hyperplasiques associées à des infiltrats inflammatoires riches en leucocytes, similaires à ce qui est décrit pour les réactions aux piqûres de tiques. Ces infiltrats, induits par les composants salivaires des tiques et les chimiokines produites par les neutrophiles infectés, étaient d'autant plus importants à l'examen histologique que le nombre d'*A. phagocytophilum* détecté dans les neutrophiles du derme et du tissu sous-cutané, était important. De plus, ces neutrophiles attirés vers la zone réactionnelle de fixation de la tique offrent une possibilité de survie supplémentaire à la bactérie dans la peau, laquelle pourrait alors fonctionner comme un tissu niche lors d'une infection persistante et constituer une source de transmission à d'autres tiques qui se gorgent même en l'absence de bactériémie (Granquist *et al.*, 2010a). Une autre étude a rapporté que la présence d'*A. phagocytophilum* dans le sang périphérique des petits mammifères (souris des bois, souris à cou jaune, campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareolus*), campagnol terrestre (*Pitymys subterraneus*) et musaraigne commune), pouvait être de courte durée et que les prélèvements de tissus de la rate et de la peau d'oreille semblaient être plus souvent infectés que le sang (Liz *et al.*, 2000) renforçant l'hypothèse que la peau serait un site de persistance pour la bactérie et donc un tissu pertinent pour sa détection.

- *Les oiseaux et le cycle épidémiologique d'A. phagocytophilum : bilan de l'étude et perspectives*

Nos résultats ne permettent pas de tirer de conclusion sur le rôle potentiel des oiseaux dans le cycle épidémiologique de la bactérie (hôte réservoir, hôte de liaison, hôte cul de sac etc.), mais les espèces aviaires pourraient constituer *a minima* des hôtes nourriciers pour la tique (qui pourraient s'infecter accidentellement) et jouer un rôle non négligeable dans leur persistance dans les milieux urbains et périurbains.

Ce travail va dans le sens d'une présence faible mais réelle d'*A. phagocytophilum* en IdF. A notre connaissance, il s'agit de la première étude en France métropolitaine s'intéressant à la détection d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans l'avifaune et la première étude planétaire à rechercher et à mettre en évidence l'ADN de la bactérie dans la peau d'oiseau.

De futures études doivent aussi aborder la caractérisation de l'ADN d'*A. phagocytophilum* détectée chez les deux merles de l'étude. En s'inspirant des travaux de Jahfari *et al.* (2014), une analyse phylogénétique de la séquence *groEl* (codant une protéine chaperonne) devrait être entreprise par le groupe de recherche au sein duquel ma thèse a été réalisée (groupe VAMP, UMR BIPAR) afin d'identifier le/les écotype(s) *groEl* d'*A. phagocytophilum* détecté(s) dans nos prélèvements. Chaque écotype *groEl* possédant a priori des caractéristiques géographiques et d'hôte uniques, il serait *a priori* cohérent d'identifier l'écotype IV associé aux oiseaux dans cette étude (Jahfari *et al.*, 2014). Néanmoins, la mise en évidence d'un

autre/d'autres écotypes pourrait suggérer la capacité des merles à héberger d'autres écotypes, non issus de l'avifaune. La caractérisation de la bactérie pourrait également se faire par un typage MLST qui constitue la technique de référence pour discriminer différentes souches bactériennes en se basant sur l'étude de plusieurs gènes de ménage (*typA*, *polA*, *pleD*, *recG*, *ctrA*, *msp4*, *groEL*, *gyrA* et *ankA*) codant des protéines essentielles à la bactérie (transductions de signaux, synthèse d'ADN polymérase, régulation de réponse, recombinaisons et réparations de l'ADN, régulation du cycle cellulaire, composition de la membrane, synthèse de protéines chaperonnes, de protéines impliquées dans l'enroulement de l'ADN ou dans la perturbation de l'expression des gènes de défense de l'hôte) qui ont la particularité de présenter un polymorphisme stable dans le temps et suffisant pour discriminer les souches (Chastagner *et al.*, 2014). Ce typage gagnerait à être complété par le recours à la technique MLVA, qui va plus loin dans la discrimination des souches en fonction des espèces hôtes mais qui est beaucoup plus délicat à mettre en œuvre et dont l'interprétation peut pâtir de la difficulté à caractériser certains VNTR (pour *Variable-Number Tandem-Repeat*, littéralement nombre variable de répétitions en tandem) (Dugat *et al.*, 2014).

Enfin, il serait intéressant de mener des investigations dans d'autres régions de France moins urbanisées afin d'analyser si les résultats sont comparables à ceux d'Ile-de-France, et notamment dans l'Est de la France (région du Grand Est par exemple) où *I. rininus*, principal vecteur d'*A. phagocytophilum* en Europe est largement présent - en témoignent les taux d'incidence annuels de la borréliose de Lyme entre 2015 et 2020 parmi les plus élevés de France avec 150 à 455 cas pour 100 000 habitants (Santé publique France, 2021). Cette présence marquée du vecteur pourrait davantage être propice à la présence d'*A. phagocytophilum* dans la faune sauvage, y compris l'avifaune.

Conclusion

Notre étude se composait de deux parties :

La partie bibliographique a permis de dresser un état des lieux des connaissances actuelles sur *A. phagocytophilum*, agent causal de l'anaplasmose granulocytaire chez des hôtes vertébrés sensibles et dont le cycle de développement fait intervenir de nombreux hôtes notamment les oiseaux. Sans pouvoir aller jusqu'à affirmer comme Keesing *et al.* (2012) que ces derniers constituent des hôtes réservoirs pour la bactérie, les études des deux dernières décennies ont démontré que des membres de ce taxon peuvent héberger des tiques infectées, acquérir l'agent infectieux lors du gorgement sanguin des tiques, en permettant à l'agent pathogène de se multiplier et de survivre pendant un certain temps et le transmettre à leur tour à d'autres tiques au cours d'un repas sanguin. De plus, les oiseaux sont des hôtes réceptifs mais a priori non sensibles à la bactérie, en partie grâce à leur température corporelle physiologiquement élevée qui leur assure une certaine résistance à l'infection par *A. phagocytophilum*. Toutefois, les juvéniles seraient globalement plus exposés aux tiques et donc aux agents pathogènes qu'elles transmettent, représentant notamment des hôtes « plus rentables » pour les tiques (bonnes ressources alimentaires, immunité moins développée) avec des compétences de toilettage moins développées que chez les oiseaux adultes.

Une partie expérimentale portant sur un total de 759 oiseaux : ce travail est à notre connaissance, le premier en France métropolitaine s'intéressant à la détection d'*A. phagocytophilum* dans l'avifaune. Même si notre échantillon présente des biais notables de recrutement, nos résultats témoignent d'une faible présence (0,27 %) de l'ADN de la bactérie parmi les passereaux originaires d'Ile-de-France et des départements limitrophes, à l'échelle de l'échantillon testé, et 2,2 % parmi les merles noirs de notre échantillon. Ainsi, nous confirmons la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez les passereaux dans cette zone géographique. Ce travail va dans le sens d'une présence faible mais réelle d'*A. phagocytophilum* en IdF. Certains éléments abordés dans notre discussion nous permettent d'envisager que les deux merles porteurs d'*A. phagocytophilum* étaient potentiellement de bons candidats à l'infection de par leur jeune âge, leur mode de vie majoritairement sédentaire (même si certains des individus peuvent être migrateurs) et leur mode d'alimentation au sol favorables à une infestation par des tiques. Ces éléments rendent très plausible l'hypothèse de l'infection de ces deux animaux par *A. phagocytophilum* directement sur le territoire français, ces juvéniles n'ayant pu migrer de leur vivant depuis un autre territoire. Leur contamination a pu résulter d'une piqûre de tique infectées à partir d'hôtes autochtones ou d'oiseaux migrants. Nos résultats ne permettent cependant pas de tirer de conclusion sur le rôle potentiel des oiseaux dans le cycle épidémiologique de la bactérie. Toutefois, les espèces aviaires pourraient constituer des hôtes nourriciers de la tique et jouer un rôle non négligeable dans leur persistance dans les milieux urbains et périurbains.

La méthode utilisée et sa capacité à identifier *A. phagocytophilum* dans trois prélèvements tissulaires différents offrent des perspectives pour l'étude épidémiologique de la bactérie au sein de cette classe. L'un des objectifs de cette étude était en effet de définir à terme, le(s) prélèvement(s) le(s) plus approprié(s) pour étudier les infections à *A. phagocytophilum* chez les oiseaux. En matière de capacité à « concentrer » la bactérie (Ct faible) et de capacité à fournir le plus rapidement des résultats, la peau et la rate semblent les organes les plus

susceptibles de répondre à ces objectifs (notamment car l'étape d'extraction de l'ADN, qui s'est avérée l'étape la plus chronophage de l'étude, est assez courte pour ces organes). En revanche, si la facilité de récupération du prélèvement et son état de conservation après la décongélation doivent être privilégiés, la peau et le foie semblent alors être les organes les plus appropriés. Il conviendra cependant de valider l'intérêt de la peau en testant systématiquement ce tissu, en parallèle de la rate et du foie, alors qu'il n'a été testé qu'en deuxième intention dans notre étude.

Des essais de typage sont en cours pour tenter de relier les ADN d'*A. phagocytophilum* aux variants rencontrés chez les humains et certaines espèces animales et déterminer, pour ces dernières, le risque potentiel que représenterait une proximité avec les oiseaux, indépendamment ou non du rôle joué par l'avifaune.

Cette étude mériterait également d'être approfondie à des oiseaux originaires d'autres régions, notamment la région du Grand-Est connue comme infectée par *A. phagocytophilum* de façon importante avec des cas chez les humains ou encore à d'autres espèces de mammifères recueillis au ChuvFs.

Liste des références bibliographiques

- AARDEMA, M.L., VON LOEWENICH, F.D. (2015) Varying influences of selection and demography in host-adapted populations of the tick-transmitted bacterium, *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC Evolutionary Biology* vol. 15, n° 1, p. 58. [https://doi.org/10.1186/s12862-015-0335-z]
- ADELMAN, J.S., BENTLEY, G.E., WINGFIELD, J.C., *et al.* (2010) Population differences in fever and sickness behaviors in a wild passerine: a role for cytokines. *The Journal of Experimental Biology* vol. 213, n° Pt 23, p. 4099-4109. [https://doi.org/10.1242/jeb.049528]
- ALMAZÁN, C., ŠIMO, L., FOURNIOL, L., *et al.* (2020) Multiple Antigenic Peptide-Based Vaccines Targeting *Ixodes ricinus* Neuropeptides Induce a Specific Antibody Response but Do Not Impact Tick Infestation. *Pathogens* vol. 9, n° 11, p. E900. [https://doi.org/10.3390/pathogens9110900]
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., *et al.* (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* vol. 215, n° 3, p. 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2]
- ANDERSON, B.E., GREENE, C.E., JONES, D.C., *et al.* (1992) *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the Etiologic Agent of Canine Granulocytic Ehrlichiosis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 42, n° 2, p. 299-302. [https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-299]
- ANSES (2021) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à un retour d'expérience sur la crise influenza aviaire hautement pathogène 2020-2021 (1ère partie). In Anses. [https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2021SA0022.pdf] (consulté le 25/05/2022).
- BARÁKOVÁ, I., DERDÁKOVÁ, M., SELYEMOVÁ, D., *et al.* (2018) Tick-borne pathogens and their reservoir hosts in northern Italy. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 9, n° 2, p. 164-170. [https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.012]
- BARBET, A.F., MEEUS, P.F.M., BÉLANGER, M., *et al.* (2003) Expression of Multiple Outer Membrane Protein Sequence Variants from a Single Genomic Locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity* vol. 71, n° 4, p. 1706-1718. [https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1706-1718.2003]
- BAYARD-MC NEELEY, M., BANSAL, A., CHOWDHURY, I., *et al.* (2004) In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Pathology* vol. 57, n° 5, p. 499-503. [https://doi.org/10.1136/jcp.2003.011775]
- BORJESSON, D.L. (2008) Culture, isolation, and labeling of *Anaplasma phagocytophilum* for subsequent infection of human neutrophils. *Methods in Molecular Biology* vol. 431, p. 159-171. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-032-8_13]
- BORJESSON, D.L., KOBAYASHI, S.D., WHITNEY, A.R., *et al.* (2005) Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Journal of Immunology* vol. 174, n° 10, p. 6364-6372. [https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6364]
- BRADLEY, C.A., ALTIZER, S. (2007) Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution* vol. 22, n° 2, p. 95-102. [https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.001]
- BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T., *et al.* (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 2, Part C. New York, Springer.
- BRICHETTI, P., DICAPI, C. (2000) *Guide des oiseaux de France et d'Europe, comment les reconnaître, les classer, les localiser*. Paris, de Vecchi.

- BRUN-HANSEN, H., GRØNSTØL, H., HARDENG, F. (1998) Experimental Infection with *Ehrlichia phagocytophila* in Cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* vol. 45, n° 4, p. 193-203. [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00783.x>]
- BUCZEK, A.M., BUCZEK, W., BUCZEK, A., *et al.* (2020) The Potential Role of Migratory Birds in the Rapid Spread of Ticks and Tick-Borne Pathogens in the Changing Climatic and Environmental Conditions in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 17, n° 6, p. 2117. [<https://doi.org/10.3390/ijerph17062117>]
- BUSSIÉRAS, J., CHERMETTE, R. (1995) Abrégé de parasitologie vétérinaire. Maisons-Alfort, Service de parasitologie, Ecole nationale vétérinaire.
- CAMPBELL, R.S., ROWLAND, A.C., SCOTT, G.R. (1994) Sequential pathology of tick-borne fever. *Journal of Comparative Pathology* vol. 111, n° 3, p. 303-313. [[https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(05\)80009-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(05)80009-x)]
- CAPLIGINA, V., SALMANE, I., KEIŠS, O., *et al.* (2014) Prevalence of tick-borne pathogens in ticks collected from migratory birds in Latvia. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 5, n° 1, p. 75-81. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.08.007>]
- CARRADE, D.D., FOLEY, J.E., BORJESSON, D. I., *et al.* (2009) Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 23, n° 6, p. 1129-1141. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x>]
- CARSON, C.A., WEISIGER, R.M., RISTIC, M., *et al.* (1974) Appendage-related antigen production by *Paranaplasma caudatum* in deer erythrocytes. *American Journal of Veterinary Research* vol. 35, n° 12, p. 1529-1531.
- CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH (2013) Ehrlichiosis and Anaplasmosis: zoonotic species Iowa state university, college of veterinary medicine. *In Center for Food Security and Public Health*. [<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ehrlichiosis.pdf>.] (consulté le 13/05/2022).
- CENTRE ORNITHOLOGIQUE ILE-DE-FRANCE, OBSERVATOIRE RÉGIONAL DES OISEAUX COMMUNS, MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE (2010) Rapport d'activité 2010. *In Centre Ornithologique Ile-de-France*. [https://lpo-idf.fr/site/_fichiers/oroc/BilanStocFrance2010.pdf] (consulté le 25/05/2022).
- CHASTAGNER, A., DUGAT, T., VOUREC'H, G., *et al.* (2014) Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Veterinary Research* vol. 45, n° 1, p. 114. [<https://doi.org/10.1186/s13567-014-0114-7>]
- CHEN, S.M., DUMLER, J.S., BAKKEN, J.S., *et al.* (1994) Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 32, n° 3, p. 589.
- CHISU, V., ZOBBA, R., LECIS, R., *et al.* (2018) GroEL typing and phylogeny of *Anaplasma* species in ticks from domestic and wild vertebrates. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 9, n° 1, p. 31-36. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.012>]
- CORDONNIER, N. (2018) Histologie : le système lymphoïde. Polycopié. Unité pédagogique d'Histologie et d'Anatomie Pathologique. Module Histologie des Organes Lymphoïdes/Hématologie. EnvA.
- COURREAU, J. (2021) Association Faune Alfort - Bilan d'activités 2021. Maisons-Alfort, France.
- COURTNEY, J.W., KOSTELNIK, L.M., ZEIDNER, N.S., *et al.* (2004) Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 42, n° 7, p. 3164-3168. [<https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3164-3168.2004>]
- DANIELS, T.J., BATTALY, G.R., LIVERIS, D., *et al.* (2002) Avian Reservoirs of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis? *Emerging Infectious Diseases* vol. 8, n° 12, p. 1524-1525. [<https://doi.org/10.3201/eid0812.010527>]
- DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M. (2006) Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* vol. 28, n° 7, p. 275-283. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x>]

- DE LA FUENTE, J., NARANJO, V., RUIZ-FONS, F., *et al.* (2005) Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 5, n° 4, p. 390-401. [https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.390]
- DE LA FUENTE, J., ANTUNES, S., BONNET, S., *et al.* (2017) Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 7, p. 114. [https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114]
- DINGLER, R.J., WRIGHT, S.A., DONOHUE, A.M., *et al.* (2014) Surveillance for *Ixodes pacificus* and the tick-borne pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in birds from California's Inner Coast Range. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 5, n° 4, p. 436-445. [https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.02.002]
- DUAN, R., LV, D., FAN, R., *et al.* (2022) *Anaplasma phagocytophilum* in Marmota himalayana. *BMC genomics* vol. 23, n° 1, p. 335. [https://doi.org/10.1186/s12864-022-08557-x]
- DUBSKA, L., LITERAK, I., KVEREK, P., *et al.* (2012) Tick-borne zoonotic pathogens in ticks feeding on the common nightingale including a novel strain of *Rickettsia* sp. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 3, n° 4, p. 265-268. [https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.06.001]
- DUGAT, T., CHASTAGNER, A., LAGRÉE, A.-C., *et al.* (2014) A new multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. *Parasites & Vectors* vol. 7, p. 439. [https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-439]
- DUGAT, T., LAGRÉE, A.-C., MAILLARD, R., *et al.* (2015) Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 5, p. 61. [https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00061]
- DUGAT, T., LEBLOND, A., KECK, N., *et al.* (2017) One particular *Anaplasma phagocytophilum* ecotype infects cattle in the Camargue, France. *Parasites & Vectors* vol. 10, n° 1, p. 371. [https://doi.org/10.1186/s13071-017-2305-3]
- DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., *et al.* (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and « HGE agent » as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol. 51, Pt 6, p. 2145-2165. [https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145]
- DUMLER, J.S., MADIGAN, J.E., PUSTERLA, N., *et al.* (2007) Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clinical Infectious Diseases* vol. 45 Suppl 1, p. S45-51. [https://doi.org/10.1086/518146]
- EBANI, V.V., BERTELLONI, F., MANI, P. (2016) Molecular survey on zoonotic tick-borne bacteria and *chlamydiae* in feral pigeons (*Columba livia domestica*). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* vol. 9, n° 4, p. 324-327. [https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.005]
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2022) Maladies à transmission vectorielle. *In European Food Safety Authority*. [https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/vector-borne-diseases] (consulté le 20/07/2022).
- EUZÉBY, J., BOURDOISEAU, G., CHAUVE, C.-M. (2005) Dictionnaire de parasitologie médicale et vétérinaire. Paris, Lavoisier.
- FOGGIE, A. (1951) Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *The Journal of Pathology and Bacteriology* vol. 63, n° 1, p. 1-15. [https://doi.org/10.1002/path.1700630103]
- FRANKE, J., FRITZSCH, J., TOMASO, H., *et al.* (2010) Coexistence of Pathogens in Host-Seeking and Feeding Ticks within a Single Natural Habitat in Central Germany. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 76, n° 20, p. 6829-6836. [https://doi.org/10.1128/AEM.01630-10]

- FRANZÉN, P., ASPAN, A., EGENVALL, A., *et al.* (2009) Molecular Evidence for Persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the Absence of Clinical Abnormalities in Horses after Recovery from Acute Experimental Infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 23, n° 3, p. 636-642. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0317.x>]
- GALINDO, R.C., AYOUBI, P., GARCÍA-PÉREZ, A.L., *et al.* (2008) Differential expression of inflammatory and immune response genes in sheep infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 126, n° 1-2, p. 27-34. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.06.004>]
- GE, Y., YOSHIIE, K., KURIBAYASHI, F., *et al.* (2005) *Anaplasma phagocytophilum* inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. *Cellular Microbiology* vol. 7, n° 1, p. 29-38. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00427.x>]
- GELLER, J., NAZAROVA, L., KATARGINA, O., *et al.* (2013) Tick-Borne Pathogens in Ticks Feeding on Migratory Passerines in Western Part of Estonia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 13, n° 7, p. 443-448. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1054>]
- GOODMAN, J.L., NELSON, C., VITALE, B., *et al.* (1996) Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine* vol. 334, n° 4, p. 209-215. [<https://doi.org/10.1056/NEJM199601253340401>]
- GRANQUIST, E.G., ALEKSANDERSEN, M., BERGSTRÖM, K., *et al.* (2010a) A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 52, n° 1, p. 43. [<https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-43>]
- GRANQUIST, E.G., BÅRDSSEN, K., BERGSTRÖM, K., *et al.* (2010b) Variant -and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 52, p. 25. [<https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-25>]
- GYLFE, A., BERGSTRÖM, S., LUNDSTRÖM, J., *et al.* (2000) Reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature* vol. 403, n° 6771, p. 724-725. [<https://doi.org/10.1038/35001663>]
- HAMER, S.A., GOLDBERG, T.L., KITRON, U.D., *et al.* (2012) Wild birds and urban ecology of ticks and tick-borne pathogens, Chicago, Illinois, USA, 2005-2010. *Emerging Infectious Diseases* vol. 18, n° 10, p. 1589-1595. [<https://doi.org/10.3201/eid1810.120511>]
- HASLE, G. (2013) Transport of *ixodid* ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 3, p. 48. [<https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00048>]
- HENNIGER, T., HENNIGER, P., GROSSMANN, T., *et al.* (2013) Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany. *Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 55, n° 1, p. 38. [<https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-38>]
- HEYLEN, D., FONVILLE, M., DOCTERS VAN LEEUWEN, A., *et al.* (2017) Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries. *Parasites & Vectors* vol. 10, n° 1, p. 497. [<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2423-y>]
- HEYLEN, D.J.A., MATTHYSEN, E. (2010) Contrasting detachment strategies in two congeneric ticks (*Ixodidae*) parasitizing the same songbird. *Parasitology* vol. 137, n° 4, p. 661-667. [<https://doi.org/10.1017/S0031182009991582>]
- HEYLEN, D.J.A., VAN OOSTEN, A.R., DEVRIENDT, N., *et al.* (2014) Seasonal feeding activity of the tree-hole tick, *Ixodes arboricola*. *Parasitology* vol. 141, n° 8, p. 1044-1051. [<https://doi.org/10.1017/S0031182014000225>]
- HEYLEN, D.J.A., WHITE, J., ELST, J., *et al.* (2012) Nestling development and the timing of tick attachments. *Parasitology* vol. 139, n° 6, p. 766-773. [<https://doi.org/10.1017/S0031182011002277>]
- HILDEBRANDT, A., FRANKE, J., MEIER, F., *et al.* (2010) The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 1, n° 2, p. 105-107. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.12.003>]
- HILDEBRANDT, A., FRITZSCH, J., FRANKE, J., *et al.* (2011) Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 11, n° 5, p. 533-537. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0048>]

- HODZIC, E., FISH, D., MARETZKI, C.M., *et al.* (1998) Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 36, n° 12, p. 3574-3578. [<https://doi.org/10.1128/JCM.36.12.3574-3578.1998>]
- HOFFMAN, T., WILHELMSSON, P., BARBOUTIS, C., *et al.* (2020) A divergent *Anaplasma phagocytophilum* variant in an *Ixodes* tick from a migratory bird; Mediterranean basin. *Infection Ecology & Epidemiology* vol. 10, n° 1, p. 1729653. [<https://doi.org/10.1080/20008686.2020.1729653>]
- HONIG, V., CAROLAN, H.E., VAVRUSKOVA, Z., *et al.* (2017) Broad-range survey of vector-borne pathogens and tick host identification of *Ixodes ricinus* from Southern Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology* vol. 93, n° 11, p. 1129. [<https://doi.org/10.1093/femsec/fix129>]
- HORNOK, S., CSÖRGŐ, T., DE LA FUENTE, J., *et al.* (2013) Synanthropic birds associated with high prevalence of tick-borne rickettsiae and with the first detection of *Rickettsia aeschlimannii* in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 13, n° 2, p. 77-83. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1032>]
- HORNOK, S., KOVÁTS, D., CSÖRGŐ, T., *et al.* (2014) Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. *Parasites & Vectors* vol. 7, p. 128. [<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-128>]
- HOROWITZ, H.W., KILCHEVSKY, E., HABER, S., *et al.* (1998) Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine* vol. 339, n° 6, p. 375-378. [<https://doi.org/10.1056/NEJM199808063390604>]
- HOTOPP, J.C.D., LIN, M., MADUPU, R., *et al.* (2006) Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genetics* vol. 2, n° 2, p. e21. [<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020021>]
- HUMAIR, P.-F.O., DOUET, V.R., CADENAS, F.M.N., *et al.* (2007) Molecular Identification of Bloodmeal Source in *Ixodes ricinus* Ticks Using 12S rDNA As a Genetic Marker. *Journal of Medical Entomology* vol. 44, n° 5, p. 12.
- INVENTAIRE FORESTIER NATIONAL (2020) Résultats régionaux de la campagne d'inventaire 2016-2020 pour la région d'Île-De-France. In *Inventaire forestier national*. [<https://inventaire-forestier.ign.fr/spip.php?rubrique127>] (consulté le 27/05/2022).
- IOANNOU, I., CHOCHLAKIS, D., KASINIS, N., *et al.* (2009) Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clinical Microbiology and Infection* vol. 15 Suppl 2, p. 158-160. [<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02207.x>]
- JAHFARI, S., COIPAN, E.C., FONVILLE, M., *et al.* (2014) Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasites & Vectors* vol. 7, n° 1, p. 365. [<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-365>]
- JOHNSTON, E., TSAO, J.I., MUÑOZ, J.D., *et al.* (2013) *Anaplasma phagocytophilum* infection in American robins and gray catbirds: an assessment of reservoir competence and disease in captive wildlife. *Journal of Medical Entomology* vol. 50, n° 1, p. 163-170. [<https://doi.org/10.1603/me12141>]
- JONCOUR, G., POULIQUEN, G., KAUFMANN, P., *et al.* (2006) *Anaplasma phagocytophilum*, agent de l'ehrlichiose granulocytaire bovine (EGB) et d'avortements chez les bovins, proposition de protocole d'aide au diagnostic. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires* n° 35, p. 95-104.
- KANG, J.-G., KIM, H.-C., CHOI, C.-Y., *et al.* (2013) Molecular detection of *Anaplasma*, *Bartonella*, and *Borrelia* species in ticks collected from migratory birds from Hong-do Island, Republic of Korea. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 13, n° 4, p. 215-225. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1149>]
- KARBOWIAK, G., BIERNAT, B., STAŃCZAK, J., *et al.* (2016) The role of particular ticks developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens in Central Europe. 4. Anaplasmataceae. *Annals of Parasitology* vol. 62, n° 4, p. 267-284. [<https://doi.org/10.17420/ap6204.62>]

- KEESING, F., HERSH, M.H., TIBBETTS, M., *et al.* (2012) Reservoir Competence of Vertebrate Hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases* vol. 18, n° 12, p. 2013-2016. [<https://doi.org/10.3201/eid1812.120919>]
- KEMPERMAN, M., NEITZEL, D., JENSEN, K., *et al.* (2008) *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood transfusion - Minnesota, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report* vol. 57, p. 1145-1148.
- KLAUS, C., GETHMANN, J., HOFFMANN, B., *et al.* (2016) Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany. *Parasitology Research* vol. 115, n° 7, p. 2729-2740. [<https://doi.org/10.1007/s00436-016-5022-5>]
- LABUDA, M., AUSTYN, J.M., ZUFFOVA, E., *et al.* (1996) Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* vol. 219, n° 2, p. 357-366. [<https://doi.org/10.1006/viro.1996.0261>]
- LEE, K.A., WIKELSKI, M., ROBINSON, W.D., *et al.* (2008) Constitutive immune defences correlate with life-history variables in tropical birds. *The Journal of Animal Ecology* vol. 77, n° 2, p. 356-363. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01347.x>]
- LEPIDI, H., BUNNELL, J.E., MARTIN, M.E., *et al.* (2000) Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 62, n° 1, p. 29-37. [<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.29>]
- LEVIN, M.L., NICHOLSON, W.L., MASSUNG, R.F., *et al.* (2002) Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 2, n° 3, p. 125-136. [<https://doi.org/10.1089/15303660260613693>]
- LIN, M., RIKIHISA, Y. (2003) *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity* vol. 71, n° 9, p. 5324-5331. [<https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5324-5331.2003>]
- LITERAK, I., STEKOLNIKOV, A.A., SYCHRA, O., *et al.* (2008) Larvae of chigger mites *Neotrombicula* spp. (Acari: *Trombiculidae*) exhibited (*Borrelia* but no *Anaplasma* infections: a field study including birds from the Czech Carpathians as hosts of chiggers. *Experimental & Applied Acarology* vol. 44, n° 4, p. 307-314. [<https://doi.org/10.1007/s10493-008-9150-1>]
- LIZ, J.S., ANDERES, L., SUMNER, J.W., *et al.* (2000) PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 38, n° 3, p. 1002-1007. [<https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1002-1007.2000>]
- LOMMANO, E., DVOŘÁK, C., VALLOTTON, L., *et al.* (2014) Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 5, n° 6, p. 871-882. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.001>]
- MACHADO, R.Z., ANDRÉ, M.R., WERTHER, K., *et al.* (2012) Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species? *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 12, n° 8, p. 705-708. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0803>]
- MACLEOD, J., GORDON, W.S. (1933) Studies in Tick-borne Fever of Sheep. I. Transmission by the Tick, *Ixodes ricinus*, with a Description of the Disease Produced. *Parasitology* vol. 25, n° 2, p. 273-283. [<https://doi.org/10.1017/S0031182000019442>]
- MADEWELL, B.R., GRIBBLE, D.H. (1982) Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 180, n° 5, p. 512-4.
- MALHER, F. (2020) L'avifaune parisienne 10 ans après : réflexions sur son évolution. *Le Passer* vol. 53, p. 24-33.
- MALIK, Y.S., MILTON, A.A.P., GHATAK, S., *et al.* (2021) Role of Birds in Transmitting Zoonotic Pathogens. Singapore, Springer Singapore.
- MASSUNG, R.F., COURTNEY, J.W., HIRATZKA, S.L., *et al.* (2005) *Anaplasma phagocytophilum* in White-tailed Deer. *Emerging Infectious Diseases* vol. 11, n° 10, p. 1604-1606. [<https://doi.org/10.3201/eid1110.041329>]

- MASSUNG, R.F., MAUEL, M.J., OWENS, J.H., *et al.* (2002) Genetic Variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. *Emerging Infectious Diseases* vol. 8, n° 5, p. 467-472. [<https://doi.org/10.3201/eid0805.010251>]
- MASSUNG, R.F., PRIESTLEY, R.A., MILLER, N.J., *et al.* (2003) Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 188, n° 11, p. 1757-1763. [<https://doi.org/10.1086/379725>]
- MASSUNG, R.F., SLATER, K., OWENS, J.H., *et al.* (1998) Nested PCR Assay for Detection of Granulocytic Ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 36, n° 4, p. 1090-1095.
- MATEI, I.A., D'AMICO, G., IONICĂ, A.M., *et al.* (2018) New records for *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal species. *Parasites & Vectors* vol. 11, n° 1, p. 193. [<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2791-y>]
- MATEI, I.A., ESTRADA-PEÑA, A., CUTLER, S.J., *et al.* (2019) A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasites & Vectors* vol. 12, n° 1, p. 599. [<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3852-6>]
- MATSON, K.D., TIELEMAN, B.I., KLASING, K.C. (2006) Capture stress and the bactericidal competence of blood and plasma in five species of tropical birds. *Physiological and biochemical zoology* vol. 79, n° 3, p. 556-564. [<https://doi.org/10.1086/501057>]
- MILNES, E.L., THORNTON, G., LÉVEILLÉ, A.N., *et al.* (2019) *Babesia odocoilei* and zoonotic pathogens identified from *Ixodes scapularis* ticks in southern Ontario, Canada. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 10, n° 3, p. 670-676. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.016>]
- MISSION MIGRATION (2007) Qu'est-ce que la migration ? In *Migraction.net*. [https://www.migraction.net/index.php?m_id=22016&item=16] (consulté le 20/05/2022).
- MØLLER, A.P. (2010) Body temperature and fever in a free-living bird. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* vol. 156, n° 1, p. 68-74. [<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.006>]
- MONGRUEL, A.C.B., BENEVENUTE, J.L., IKEDA, P., *et al.* (2017) Detection of *Anaplasma* sp. phylogenetically related to *A. phagocytophilum* in a free-living bird in Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria* vol. 26, n° 4, p. 505-510. [<https://doi.org/10.1590/S1984-29612017042>]
- MOUTAILLER, S., GEORGE, J.-C., HANSMANN, Y., *et al.* (2017) Principales maladies transmises par les tiques : épidémiologie, clinique et diagnostic. In McCoy, K.D. (Éd.), *Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. Marseille, IRD Editions, p. 193-209.
- MUNDERLOH, U.G., LYNCH, M.J., HERRON, M.J., *et al.* (2004) Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Veterinary Microbiology* vol. 101, n° 1, p. 53-64. [<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.011>]
- NARANJO, V., RUIZ-FONS, F., HÖFLE, U., *et al.* (2006) Molecular epidemiology of human and bovine anaplasmosis in southern Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1078, p. 95-99. [<https://doi.org/10.1196/annals.1374.013>]
- NIEMELÄ, J., BREUSTE, J.H., GUNTENSPERGEN, G., *et al.* (2011) *Urban Ecology: Patterns, Processes, and Applications*. Oxford, Oxford University Press.
- NIU, H., KOZJAK-PAVLOVIC, V., RUDEL, T., *et al.* (2010) *Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 Is Imported into Host Cell Mitochondria and Interferes with Apoptosis Induction. *PLOS Pathogens* vol. 6, n° 2, p. e1000774. [<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000774>]
- NIU, H., XIONG, Q., YAMAMOTO, A., *et al.* (2012) Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 109, n° 51, p. 20800-20807. [<https://doi.org/10.1073/pnas.1218674109>]
- OGDEN, N.H., CASEY, A.N.J., WOLDEHIWET, Z., *et al.* (2003) Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* Ticks from Sheep in the Acute and Post-Acute Phases of Infection. *Infection and Immunity* vol. 71, n° 4, p. 2071-2078. [<https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2071-2078.2003>]

- OGDEN, N.H., LINDSAY, L.R., HANINCOVÁ, K., *et al.* (2008) Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 74, n° 6, p. 1780-1790. [<https://doi.org/10.1128/AEM.01982-07>]
- PALOMAR, A.M., PORTILLO, A., SANTIBÁÑEZ, P., *et al.* (2015) Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology* vol. 29, n° 3, p. 349-353. [<https://doi.org/10.1111/mve.12124>]
- PALOMAR, A.M., SANTIBÁÑEZ, P., MAZUELAS, D., *et al.* (2012) Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. *Emerging Infectious Diseases* vol. 18, n° 7, p. 1188-1191. [<https://doi.org/10.3201/eid1807.111777>]
- PEDERSEN, B.N., JENKINS, A., KJELLAND, V. (2020) Tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in southern Norway. *PloS One* vol. 15, n° 4, p. e0230579. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230579>]
- PUSTERLA, N., HUDER, J., WOLFENBERGER, C., *et al.* (1998) Experimental oral transmission of *Ehrlichia phagocytophila* to calves. *Veterinary Record* vol. 143, n° 9, p. 250-251. [<https://doi.org/10.1136/vr.143.9.250>]
- RAR, V., TKACHEV, S., TIKUNOVA, N. (2021) Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria: Twenty years later. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* vol. 91, p. 104833. [<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104833>]
- REYNARD, O., RITTER, M., MARTIN, B., *et al.* (2021) La fièvre hémorragique de Crimée-Congo, une future problématique de santé en France ? *Médecine/Sciences* vol. 37, n° 2, p. 135-140. [<https://doi.org/10.1051/medsci/2020277>]
- RIKIHISA, Y. (2011) Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 24, n° 3, p. 469-489. [<https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10>]
- RIZZOLI, A., SILAGHI, C., OBIEGALA, A., *et al.* (2014) *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Frontiers in Public Health* vol. 2, p. 251. [<https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251>]
- ROCHE, B., DOBSON, A.P., GUÉGAN, J.-F., *et al.* (2012) Linking community and disease ecology: the impact of biodiversity on pathogen transmission. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 367, n° 1604, p. 2807-2813. [<https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0364>]
- SACCHI, A.B.V., ANDRÉ, M.R., CALCHI, A.C., *et al.* (2021) Molecular and serological detection of arthropod-borne pathogens in carnivorous birds from Brazil. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports* vol. 23, p. 100539. [<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100539>]
- SÁNDOR, A.D., KALMÁR, Z., MATEI, I., *et al.* (2017) Urban Breeding Corvids as Disseminators of Ticks and Emerging Tick-Borne Pathogens. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 17, n° 2, p. 152-154. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2054>]
- SANTÉ PUBLIQUE FRANCE (2021) Borréliose de Lyme : données épidémiologiques 2020. *In Santé publique France*. [<https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2021/borreliose-de-lyme-donnees-epidemiologiques-2020>] (consulté le 05/07/2022).
- SANTOS-SILVA, M.M., SOUSA, R., SANTOS, A.S., *et al.* (2006) Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Experimental & Applied Acarology* vol. 39, n° 3-4, p. 331-338. [<https://doi.org/10.1007/s10493-006-9008-3>]
- SARKAR, M., TROESE, M.J., KEARNS, S.A., *et al.* (2008) *Anaplasma phagocytophilum* MSP2(P44)-18 Predominates and Is Modified into Multiple Isoforms in Human Myeloid Cells. *Infection and Immunity* vol. 76, n° 5, p. 2090-2098. [<https://doi.org/10.1128/IAI.01594-07>]
- SASSERA, D., BENINATI, T., BANDI, C., *et al.* (2006) « *Candidatus Midichloria mitochondrii* », an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol. 56, n° Pt 11, p. 2535-2540. [https://doi.org/10.1099/ijs.0.64386-0]
- SCHÄFER, I., KOHN, B. (2020) *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats: A literature review to raise clinical awareness. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 22, n° 5, p. 428-441. [https://doi.org/10.1177/1098612X20917600]
- SEO, H.-J., NOH, J., KIM, H.-C., *et al.* (2021) Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of *Anaplasma* and *Borrelia* Species in Ticks Collected from Migratory Birds at Heuksan, Hong, and Nan Islands, Republic of Korea. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 21, n° 1, p. 20-31. [https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2629]
- SEVERO, M.S., STEPHENS, K.D., KOTSYFAKIS, M., *et al.* (2012) *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiology* vol. 7, p. 719-731. [https://doi.org/10.2217/fmb.12.45]
- SKORACKI, M., MICHALIK, J., SKOTARCZAK, B., *et al.* (2006) First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites (Acari: Symbiophilidae) parasitizing passerine birds. *Microbes and Infection* vol. 8, n° 2, p. 303-307. [https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.029]
- SKOTARCZAK, B., RYMASZEWSKA, A., WODECKA, B., *et al.* (2006) PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* vol. 13, n° 1, p. 21-23.
- SMITH, R.D., HUNGERFORD, L.L., ARMSTRONG, C.T. (1989) Epidemiologic investigation and control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 195, n° 4, p. 476-480.
- SPITALSKÁ, E., LITERÁK, I., KOČIANOVÁ, E., *et al.* (2011) The importance of *Ixodes arboricola* in transmission of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the Czech Republic, Central Europe. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 11, n° 9, p. 1235-1241. [https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0210]
- SPITALSKÁ, E., LITERÁK, I., SPARAGANO, O., *et al.* (2007) Ticks (*Ixodidae*) from passerine birds in the Carpathian region. *Wiener Klinische Wochenschrift* vol. 118, p. 759-64. [https://doi.org/10.1007/s00508-006-0729-4]
- STACHURSKI, F., VIAL, L. (2018) Installation de la tique *Hyalomma marginatum*, vectrice du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, en France continentale. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n° 84, p. 37-41.
- STANNARD, A.A., GRIBBLE, D.H., SMITH, R.S. (1969) Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *The Veterinary Record* vol. 84, n° 6, p. 149-150. [https://doi.org/10.1136/vr.84.6.149]
- STUEN, S. (2007) *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications* vol. 31 Suppl 1, p. 79-84. [https://doi.org/10.1007/s11259-007-0071-y]
- STUEN, S., ARTURSSON, K. (2000) Effects of the dose of *Ehrlichia phagocytophila* on the severity of experimental infections in lambs. *The Veterinary Record* vol. 146, n° 23, p. 669-672. [https://doi.org/10.1136/vr.146.23.669]
- STUEN, S., BERGSTRÖM, K. (2001) The Effect of Two Different Oxytetracycline Treatments in Experimental *Ehrlichia phagocytophila* Infected Lambs. *Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 42, n° 3, p. 339. [https://doi.org/10.1186/1751-0147-42-339]
- STUEN, S., GRANQUIST, E.G., SILAGHI, C. (2013) *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 3, p. 31. [https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031]
- STUEN, S., GRØVA, L., GRANQUIST, E.G., *et al.* (2011) A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 53, n° 1, p. 8. [https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-8]
- STUEN, S., HANDELAND, K., FRAMMARSVIK, T., *et al.* (2001) Experimental *Ehrlichia phagocytophila* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *The Veterinary Record* vol. 149, n° 13, p. 390-392. [https://doi.org/10.1136/vr.149.13.390]

- SVITÁLKOVÁ, Z., HARUŠTIAKOVÁ, D., MAHRÍKOVÁ, L., *et al.* (2015) *Anaplasma phagocytophilum* prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in South-Western Slovakia. *Parasites & Vectors* vol. 8, n° 1, p. 276. [<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0880-8>]
- SZEKERES, S., CLAUDIA COIPAN, E., RIGÓ, K., *et al.* (2015) *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in natural rodent and tick communities in Southern Hungary. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 6, n° 2, p. 111-116. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.10.004>]
- SZEKERES, S., DOCTERS VAN LEEUWEN, A., TÓTH, E., *et al.* (2019) Road-killed mammals provide insight into tick-borne bacterial pathogen communities within urban habitats. *Transboundary and Emerging Diseases* vol. 66, n° 1, p. 277-286. [<https://doi.org/10.1111/tbed.13019>]
- TOFT, C., ANDERSSON, S.G.E. (2010) Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics* vol. 11, n° 7, p. 465-475. [<https://doi.org/10.1038/nrg2798>]
- TOMA, B., DUFOUR, B., SANAA, M., *et al.* (2018) *Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*, 4ème édition. Maisons-Alfort, Association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies animales.
- TROESE, M.J., CARLYON, J.A. (2009) *Anaplasma phagocytophilum* Dense-Cored Organisms Mediate Cellular Adherence through Recognition of Human P-Selectin Glycoprotein Ligand 1. *Infection and Immunity* vol. 77, n° 9, p. 4018-4027. [<https://doi.org/10.1128/IAI.00527-09>]
- TROESE, M.J., KAHLON, A., RAGLAND, S.A., *et al.* (2011) Proteomic Analysis of *Anaplasma phagocytophilum* during Infection of Human Myeloid Cells Identifies a Protein That Is Pronouncedly Upregulated on the Infectious Dense-Cored Cell. *Infection and Immunity* vol. 79, n° 11, p. 4696-4707. [<https://doi.org/10.1128/IAI.05658-11>]
- UNITED NATIONS. DEPARTEMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS (2019) World urbanization prospects: the 2018 revision. *In United Nations*. [<https://population.un.org/wup/publications/Files/WUP2018-Report.pdf>]
- US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2021) Principles of Epidemiology. Lesson 1 : Introduction to Epidemiology - Section 10 : Chain of Infection. *In Centers for Disease Control and Prevention*. [<https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section10.html>] (consulté le 20/07/2022).
- USPENSKY, I. (2014) Tick pests and vectors (Acari: *Ixodoidea*) in European towns: Introduction, persistence and management. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 5, n° 1, p. 41-47. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.011>]
- VIAL, L., MERCIER, A., STACHURSKI, F., *et al.* (2016a) Déclaration de deux cas humains de fièvre hémorragique de Crimée-Congo en Espagne - point de situation 2016-01 au 05 septembre 2016. *In Epidémiosurveillance santé animale*. [<https://www.pplateforme-esa.fr/article/declaration-de-deux-cas-humains-de-fievre-hemorragique-de-crimee-congo-en-espagne-point-de>] (consulté le 15/07/2022).
- VIAL, L., STACHURSKI, F., LEBLOND, A., *et al.* (2016b) Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 7, n° 6, p. 1162-1167. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.002>]
- WOLDEHIWET, Z. (2010) The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology* vol. 167, n° 2-4, p. 108-122. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.013>]
- WOLDEHIWET, Z. (2006) *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1078, p. 446-460. [<https://doi.org/10.1196/annals.1374.084>]
- WOLDEHIWET, Z., HORROCKS, B.K., SCAIFE, H., *et al.* (2002) Cultivation of an ovine strain of *Ehrlichia phagocytophila* in tick cell cultures. *Journal of Comparative Pathology* vol. 127, n° 2-3, p. 142-149. [<https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0574>]

- WOLDEHIWET, Z., SCOTT, G.R. (1982) Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *Journal of Comparative Pathology* vol. 92, n° 3, p. 469-474. [[https://doi.org/10.1016/0021-9975\(82\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0021-9975(82)90033-0)]
- YANG, J., LIU, Z., NIU, Q., *et al.* (2015) Tick-borne zoonotic pathogens in birds in Guangxi, Southwest China. *Parasites & Vectors* vol. 8, p. 637. [<https://doi.org/10.1186/s13071-015-1249-8>]
- ZHANG, L., LIU, Y., NI, D., *et al.* (2008) Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *Journal of the American Medical Association* vol. 300, n° 19, p. 2263-2270. [<https://doi.org/10.1001/jama.2008.626>]
- ZHI, N., OHASHI, N., RIKIHISA, Y. (1999) Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 274, n° 25, p. 17828-17836. [<https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17828>]

Annexes

Annexe 1 : Récapitulatif des études publiées sur PubMed® portant sur la détection d'ADN d'*A. phagocytophilum* à partir de tiques récoltées sur des oiseaux, classées selon le continent et l'année de publication

ADN d'*A. phagocytophilum* est abrégé en ADN d'Aph dans le tableau ci-dessous.

Continent	Auteur, date	Echantillon (effectif)	Technique d'échantillonnage, zone et période d'étude	Techniques moléculaires employées		Résultats de l'étude
				pour détecter la présence d'ADN d'Aph	pour confirmer la présence d'ADN d'Aph	
Europe	Santos-Silva <i>et al.</i> (2006)	Oiseaux migrateurs - 22 espèces (n = 40) Tiques – 5 espèces (n = 152)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre janvier 2002 et décembre 2004, au Portugal	PCR ciblant le gène <i>msp2</i> (550 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	Aucun résultat positif à l'ADN d'Aph à partir des tiques
	Literak <i>et al.</i> (2008)	Oiseaux migrateurs - 37 espèces (n = 1080) Tiques – 3 espèces (n = 325)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre juillet-septembre 2005, en République Tchèque	PCR ciblant le gène <i>epank 1</i> (444 pb) d'Aph	/	Aucun résultat positif à l'ADN d'Aph à partir des tiques
	Franke <i>et al.</i> (2010)	Oiseaux migrateurs - 12 espèces (n = 211)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre mai et octobre 2007, en Allemagne	PCR ciblant le gène <i>ARNr 16S</i> (944 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 3,2 % des tiques d' <i>I. ricinus</i>

		Tiques – 1 espèce (n = 680)				collectées sur des oiseaux
Hildebrandt <i>et al.</i> (2010)	Oiseaux migrants - 11 espèces (n = 99) Tiques – 1 espèce (n = 191)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, été 2007, Ile de la mer Baltique (Allemagne)	PCR ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (944 pb) d'Aph	Digestion des amplicons positifs avec Sspl et séquençage des fragments (633 et 311 pb)		L'ADN d'Aph était présente chez 2,6 % des tiques d' <i>I. ricinus</i> collectées sur des oiseaux
Hildebrandt <i>et al.</i> (2011)	Oiseaux migrants - 5 espèces (n = 189) Tiques – 1 espèce (n = 658)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, pendant la période de mai et octobre 2007, au centre de l'Allemagne	PCR ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (944 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés		L'ADN d'Aph était présente chez 1,6 % des tiques d' <i>I. ricinus</i> collectées sur des oiseaux
Spitalská <i>et al.</i> (2011)	Oiseaux migrants - 20 espèces (n = 120) Tiques – 3 espèces (n = 549)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre 2003 et 2005, en République Tchèque	PCR ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (298 pb) du genre <i>Anaplasma</i> spp..	PCR ciblant le gène <i>msp4</i> d'Aph (849 pb) Séquençage des amplicons purifiés		L'ADN d'Aph était présente chez 1,6 % des tiques collectées sur les oiseaux
Palomar <i>et al.</i> (2012)	Oiseaux migrants - 8 espèces (n = 97)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre avril et octobre 2009, en Espagne	PCR nichée ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (932/546 pb) d'Aph	PCR ciblant le gène <i>msp2</i> (334 pb) du genre <i>Anaplasma sp</i> Séquençage des amplicons purifiés		L'ADN d'Aph était présente chez 0,5 % des tiques collectées sur les oiseaux

	Tiques – 5 espèces (n = 222)					
Dubska <i>et al.</i> (2012)	Oiseaux migrants - 1 espèce (n = 120) Tiques – 1 espèce (n = 77)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre avril et août 2008, dans le Nord-Ouest de la République Tchèque	PCR ciblant le gène <i>epank1</i> (444 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 1 % des tiques <i>I. ricinus</i> (1 %) collectées sur les oiseaux	
Geller <i>et al.</i> (2013)	Oiseaux migrants - 24 espèces (n = 178) Tiques – 2 espèces (n = 249)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, durant la période d'août à octobre de 2006 à 2009, à l'Ouest de l'Estonie	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé selon Courtney <i>et al.</i> (2004) Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 0,4 % des tiques collectées sur les oiseaux	
Hornok <i>et al.</i> (2013)	Oiseaux migrants - 13 espèces (n = 5846) Tiques – 3 espèces (n = 184)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, au printemps, été et automne 2011, en Hongrie	qPCR Taqman ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (106 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé pour un Ct<30	L'ADN d'Aph était présente chez 0,5 % des tiques collectées sur les oiseaux	
Lommano <i>et al.</i> (2014)	Oiseaux migrants - 71 espèces (n = 4558)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre 2007 et 2010 durant la période de reproduction des oiseaux, en Suisse	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé selon Courtney <i>et al.</i> (2004) PCR ciblant le gène <i>groESL</i> (1297 pb)	L'ADN d'Aph était présente chez 2 % des tiques collectées sur les oiseaux	

		Tiques – 2 espèces (n = 1205)				
Capligina <i>et al.</i> (2014)	Oiseaux migrateurs - 9 espèces (n = 41) Tiques – 1 espèce (n = 93)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre septembre et octobre 2009, en Lettonie	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé selon Courtney <i>et al.</i> (2004) PCR nichée ciblant le gène de l'ARNr 16S (932/546) pb Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 2 % des tiques collectées sur les oiseaux	
Palomar <i>et al.</i> (2015)	Oiseaux migrateurs - 19 espèces (n = 121) Tiques – 5 espèces (n = 336)	Capture hebdomadaire au filet d'oiseaux en bonne condition physique entre 2009 et 2011 en Espagne	PCR nichées ciblant les gènes de l'ARNr 16S (932/546 pb) et <i>groESL</i> (1350/1297 pb) du genre <i>Anaplasma</i> spp.	PCR ciblant le gène p44 <i>msp2</i> (380 pb) du genre <i>Anaplasma</i> spp. PCR ciblant les régions EHR et GEP du gène de l'ARNr 16S (345 pb et 341 pb, respectivement) Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 5,9 % des tiques collectées sur les oiseaux	
Heylen <i>et al.</i> (2017)	Oiseaux migrateurs - 35 espèces (n = 375) Tiques – 3 espèces (n = 671)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre 2012 et 2014, au Pays-Bas	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	qPCR ciblant le gène <i>groEL</i> Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 5,1 % des tiques collectées sur les oiseaux	

Honig <i>et al.</i> (2017)	Oiseaux migrants - Nombre d'espèce non mentionné (n = 12) Tiques – 1 espèce (n = 48)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, durant l'été 2010, au Sud de la République Tchèque	PCR ciblant le gène <i>msp4</i> (849 pb) et <i>groEL</i> (1292 pb) d' <i>Anaplasma</i> spp.	/	Aucun résultat positif à l'ADN d'Aph à partir des tiques récoltées sur les oiseaux
Chisu <i>et al.</i> (2018)	Oiseaux migrants - 3 espèces (n = 4) Tiques – 4 espèces (n = 4)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, pendant la période de migration entre 2013 et 2014, au Nord-Ouest de la Sardaigne	PCR ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (293 pb) du genre <i>Anaplasma</i> spp.	PCR héli-nichée ciblant le gène <i>groEL</i> (518 pb) d'Aph Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez une tique (1/4) collectée sur les oiseaux
Baráková <i>et al.</i> (2018)	Oiseaux migrants - 9 espèces (n = 72) Tiques – 3 espèces (n = 98)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre mars 2011 et juin 2013, Italie	PCR nichée ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (932/546 pb)	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 3,1 % des tiques collectées sur les oiseaux
Hoffman <i>et al.</i> (2020)	Oiseaux migrants, - 27 espèces (n = 7 354) Tiques – 4 espèces (n = 358)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, durant le printemps 2010 sur deux Îles de la Méditerranées - Grèce et Italie	qPCR Taqman ciblant le gène <i>glt A</i> (64 pb) d'Aph	PCR ciblant les gènes de l' <i>ARNr 16S</i> (507) et <i>ank A</i> (398 pb) Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 0,2 % des tiques collectées sur les oiseaux

	Pedersen <i>et al.</i> (2020)	Oiseaux migrants - 21 espèces (n = 6 538) Tiques – 1 espèce (n = 815)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre avril et juin ainsi que juillet et novembre 2008, au Sud de la Norvège	qPCR ciblant le gène <i>glt A</i> (64 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente chez 1,2 % des tiques <i>I. ricinus</i> collectées sur les oiseaux
	Daniels <i>et al.</i> (2002)	Oiseaux migrants - Nombre d'espèce non mentionné (n = non mentionné) Tiques – 1 espèce (n = 123)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, durant la période d'août à octobre entre 2006 et 2009, dans des villes des EUA	PCR nichée ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (932/537 pb) d'Aph	/	L'ADN d'Aph était présente chez 4,1 % des tiques <i>I. scapularis</i> collectées sur les oiseaux
	Ogden <i>et al.</i> (2008)	Oiseaux migrants - 10 ordres (n = 39 095) Tiques – 7 espèces (n = 897)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, de mars à juin entre 2005 et 2006, Est du Canada	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé selon Courtney <i>et al.</i> (2004) (Ct < 32,6)	L'ADN d'Aph était présente chez 1,4 % des tiques collectées sur les oiseaux
	Keesing <i>et al.</i> (2012)	Oiseaux migrants - 4 espèces (n = 81)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre juillet et septembre en 2008, 2009 et 2010, aux EUA	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé selon Courtney <i>et al.</i> (2004) Echantillon considéré positif si 1 des 3 reliquats	L'ADN d'Aph était présente chez 5,0 % des tiques collectées sur les oiseaux

Amérique du Nord et du Sud		Tiques – nombre d'espèce non mentionnée (n = 1479)			donne une amplification par qPCR	
	Hamer <i>et al.</i> (2012)	Oiseaux migrants - 78 espèces (n = 5506) Tiques – 3 espèces (n = 357)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre mai 2005 et octobre 2010, en zone semi-urbaine de Chicago (EUA)	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	/	Aucun résultat positif à l'ADN d'Aph à partir des tiques
	Milnes <i>et al.</i> (2019)	Oiseaux migrants - 24 espèces (n = 595) Tiques – 1 espèce (n = 166)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, pendant la période de mai 2017 à mai 2018, au Canada	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé selon Courtney <i>et al.</i> (2004)	L'ADN d'Aph était présente chez 0,6 % des tiques <i>I. scapularis</i> collectées sur les oiseaux
Asie	Kang <i>et al.</i> (2013)	Oiseaux migrants - 21 espèces (n = 2161) Tiques – 5 espèces (n = 212)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre avril et mai ainsi que septembre et novembre entre 2012 et 2014, sur une île de la République de Corée	PCR ciblant le gène de l'ARNr 16S (1406 pb) du genre <i>Anaplasma spp.</i> PCR ciblant le gène de l'ARNr 16S (926 pb) d'Aph	PCR nichée ciblant le gène <i>groEL</i> d'Aph (1433/1297 pb) Purification des amplicons positifs, clonage dans un vecteur (plasmide), transformation et multiplication dans des bactéries (<i>E. coli</i>)	L'ADN d'Aph était présente chez 0,5 % des tiques collectées sur les oiseaux

					Séquençage des plasmides d'intérêt	
	Seo <i>et al.</i> (2021)	Oiseaux migrants - plus de 150 espèces (n = 13793) Tiques – 9 espèces (n = 877)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre 2010 et 2011 et en 2016, durant la période de migration des oiseaux en République de Corée	PCR ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (511 pb) et <i>groEL</i> (1292 pb) d'Aph	Séquençage des échantillons positifs après purification	L'ADN d'Aph était présente chez 0,1 % des tiques collectées sur les oiseaux

Annexe 2 : Récapitulatif des études publiées sur PubMed® portant sur la détection d'ADN d'*A. phagocytophilum* à partir de tissus d'oiseaux, classées selon le continent et l'année de publication

La majorité des études de ce tableau ont recherché la présence d'*A. phagocytophilum* à partir de prélèvements tissulaires d'oiseaux et de tiques nidicoles collectées sur ces espèces. Ne sont renseignés ici que les résultats des analyses sur les prélèvements tissulaires d'oiseaux.

A. phagocytophilum est abrégé Aph dans le tableau ci-dessous.

n.m : non mentionné

Continent	Auteur, date	Echantillon (effectif)	Technique d'échantillonnage, zone et période d'étude	Organes étudiés	Techniques moléculaires employées		Résultats de l'étude	Espèces d'oiseaux infectées par Aph (<i>nom latin</i>) [n = effectif]
					pour détecter la présence d'ADN d'Aph	pour confirmer la présence d'ADN d'Aph		
Europe	De La Fuente <i>et al.</i> (2005)	Oiseaux migrants - 18 espèces (n = 46)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, pendant la période de chasse 2003-2004, au centre de l'Espagne	Sang	PCR ciblant le gène <i>msp4</i> (849 pb) d'Aph	PCR ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (468 pb) puis séquençage	L'ADN d'Aph était présente dans le sang de 10 oiseaux (4,6 %)	Merle noir (<i>Turdus merula</i>) [n = 3] Pinson des arbres (<i>Fringilla coelebs</i>) [n = 1] Moineau domestique (<i>Passer domesticus</i>) [n = 1] Moineau espagnol (<i>Passer hispaniolensis</i>) [n = 1] Bruant des rochers (<i>Emberiza cia</i>) [n = 1] Pie-grièche écorcheur (<i>Lanius senator</i>) [n = 1] Pie bavarde (<i>Pica pica</i>) [n = 1]

								Orite à longue queue (<i>Aegithalos caudatus</i>) [n = 1]
Naranjo <i>et al.</i> (2006)	Oiseaux migrants - Nombre d'espèce non mentionné (n = 46)	Ramassage des oiseaux morts, entre 2011-2013, en Italie et Espagne	Sang Rate	PCR ciblant le gène <i>msp4</i> (849 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente dans 10 oiseaux (2,2 %) sans qu'il ne soit précisé la nature des échantillons positifs (sang ou rate)	Merle noir (<i>Turdus merula</i>) [n = n.m] Pinson des arbres (<i>Fringilla coelebs</i>) [n = n.m] Moineau domestique (<i>Passer domesticus</i>) [n = n.m] Moineau espagnol (<i>Passer hispaniolensis</i>) [n = n.m] Bruant des rochers (<i>Emberiza cia</i>) [n = n.m] Pie-grièche écorcheur (<i>Lanius senator</i>) [n = n.m] Pie bavarde (<i>Pica pica</i>) [n = n.m] Orite à longue queue (<i>Aegithalos caudatus</i>) [n = n.m]	
Skotarczak <i>et al.</i> (2006)	Oiseaux migrants - 9 espèces (n = 108)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre Mai et Septembre 2002, en Pologne	Sang	PCR ciblant le gène <i>epank 1</i> (944 pb) d'Aph	/	Aucun résultat positif à l'ADN d'Aph à partir du sang des oiseaux	/	
Skoracki <i>et al.</i> (2006)	Oiseaux migrants - 8 espèces	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique,	Sang	PCR ciblant le gène	/	Aucun résultat positif à	/	

		(n = 126)	Mai à Juin 2022, Centre-Ouest de la Pologne		<i>epank 1</i> (444 pb) d'Aph		L'ADN d'Aph à partir du sang des oiseaux	
	Jahfari <i>et al.</i> (2014)	Oiseaux mi- grateurs - 9 espèces (n = 35)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, période inconnue, au Pays-Bas et en Belgique	Rate	qPCR Taqman ci- blant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	qPCR ciblant le gène <i>groEL</i> (624 pb) Séquençage des ampli- cons purifiés	L'ADN d'Aph était présente dans la rate d'un oiseau (2,9 %)	Merle noir (<i>Turdus merula</i>) [n = 1]
	Hornok <i>et al.</i> (2014)	Oiseaux mi- grateurs - 16 espèces (n = 1219)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, pendant la période Été-Automne 2013, en Hongrie	Sang	qPCR Taqman ci- blant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de posi- tivité : Ct < 39 cycles (Ebani <i>et al.</i> , 2016)	L'ADN d'Aph était présente dans le sang d'un oiseau (0,08 %)	Grive mauvis (<i>Turdus iliacus</i>) [n = 1]
	Ebani <i>et al.</i> (2016)	Pigeons - 1 espèce (n = 84)	Ramassage de pi- geons morts, entre 2011-2013, en Tos- cane (Italie)	Rate	PCR nichée ciblant le gène de l' <i>ARNr 16S</i> (932/546 pb) d'Aph	/	Aucun ré- sultat po- sitif à l'ADN d'Aph à partir des rates des oiseaux	/

	Sándor <i>et al.</i> (2017)	Corvidés - 2 espèces (n = 108)	Tués au fusil par des chasseurs professionnels en juin 2013, en Roumanie	Coeur	PCR ciblant le gène <i>msp2</i> (345 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente dans le cœur d'un oiseau (0,9 %)	Corbeau freux (<i>Corvus frugilegus</i>) [n = 1]
Amérique du Nord et du Sud	Machado <i>et al.</i> (2012)	Oiseaux migrants et carnivores - 7 espèces (n = 21)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre 2009 et 2010, Brésil	Sang	PCR nichée ciblant le gène de l'ARNr 16S (932/546 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente dans le sang de 3 oiseaux (14 %)	Urubu noir (<i>Coragyps atratus</i>) [n = 2] Caracara huppé (<i>Caracara plancus</i>) [n = 1]
	Johnston <i>et al.</i> (2013)	Oiseaux migrants - 2 espèces (n = 43)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, Août-Octobre 2011 au Michigan (EUA)	Sang	qPCR Taqman ciblant le gène de l'ARNr 16S (106 pb) d'Aph	Seuil de positivité fixé selon Courtney <i>et al.</i> (2004) (Ct < 32,6)	Aucun résultat positif à l'ADN d'Aph à partir du sang des oiseaux	/
	Dingler <i>et al.</i> (2014)	Oiseaux migrants - 48 espèces (n = 349)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, 2011-2012, en Californie (EUA)	Sang	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb) d'Aph	Seuil de positivité : Ct < 40 cycles	L'ADN d'Aph était présente dans le sang de	Bruant à couronne dorée (<i>Zonotrichia atricapilla</i>) [n = 1] Etourneau sansonnet (<i>Sturnus vulgaris</i>) [n = 1]

						PCR ciblant les gènes <i>ank</i> (567 pb) et <i>groESL</i> (1164 pb)	deux oiseaux (0,5 %)	
						Séquençage des amplicons purifiés		
	Mongruel <i>et al.</i> (2017)	Oiseaux migrateurs - 11 espèces (n = 15)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, d'Août à Novembre 2014, au Brésil	Sang	PCR nichée ciblant le gène de l'ARNr 16S (932/546 pb) d'Aph	Séquençage des amplicons purifiés	L'ADN d'Aph était présente dans le sang d'un oiseau (6,6 %)	Pénélope yacouhou (<i>Penelope obscura</i>) [n = 1]
	Sacchi <i>et al.</i> (2021)	Oiseaux carnivores - 4 ordres (n = 121)	Capture au filet d'oiseaux en bonne condition physique, entre 2012 et 2014, Brésil	Sang	qPCR ciblant le gène <i>groEL</i> (83 pb) (<i>Anaplasma</i> spp.)	qPCR Taqman ciblant le gène <i>msp2</i> (77 pb)	L'ADN d'Aph était présente dans le sang de 12 oiseaux (9,9 %) pour la qPCR <i>groEL</i> , mais tous revenus négatifs pour la	Petit-duc choliba (<i>Megascops choliba</i>) [n = 1] Chouette des terriers (<i>Speotyto cunicularia</i>) [n = 2] Chouette effraie (<i>Tyto alba</i>) [n = 1] Hibou strié (<i>Asio clamator</i>) [n = 1] Caracara à tête jaune (<i>Milvago chimachima</i>) [n = 1] Faucon aplomado

							qPCR <i>msp2</i>	<i>(Falco femoralis)</i> [n = 2] Buse à gros bec <i>(Rupornis magnirostris)</i> [n = 4]
Asie	Yang <i>et al.</i> (2015)	Oiseaux mi- grateurs - 9 espèces (n = 90)	Cadavres d'oi- seaux, de Mars 2010 à Avril 2012, au Sud de la Chine	Foie	PCR nichée ciblant le gène de l'ARNr 16S (932/546 pb) d'Aph	Séquençage des ampli- cons purifiés	L'ADN d'Aph était présente dans le foie de 4 oiseaux (4,4 %)	Tourterelle à collier <i>(Streptopelia decaocto)</i> [n = 2] Hibou grand-duc <i>(Bubo bubo)</i> [n = 2]

Annexe 3 : Bilan brut de la collecte des oiseaux appartenant à d'autres familles entre mars et octobre 2021 par ordre d'effectif décroissant

Famille	Espèce : <i>nom latin</i> (nom usuel)	Effectif	% selon la famille
Columbidé n = 6	<i>Columba livia</i> (Pigeon biset)	4	2/3
	<i>Columba palumbus</i> (Pigeon ramier)	2	1/3
Apodidé n = 2	<i>Apus apus</i> (Martinet noir)	2	2/2
Ralidé n = 1	<i>Fulica atra</i> (Foulque macroule)	1	1/1
Picidé n = 1	<i>Drycopus martius</i> (Pic noir)	1	1/1
Sans identification	Espèce non renseignée	11	/

Annexe 4 : Effectifs des Suivi Temporel des Oiseaux Communs par Échantillonnage Ponctuel Simple (STOC) pour les espèces d'IdF – données du rapport d'activité de 2015-2018 (source : Malher, 2020)

Les tableaux bleus donnent les valeurs « objectives » de l'estimation des effectifs de chacune des espèces de l'étude de Malhers (2020). Ces valeurs sont des intervalles et correspondent à des effectifs de « couple » d'oiseaux.

La colonne « effectif retenu » a été obtenue en prenant comme nombre la valeur centrale de l'intervalle « effectif 2015-2018 » (présent dans les tableaux bleus) arrondie à l'entier supérieur (exemple : Serin cini – « Effectif 2015-2018 » valant 5 – 10 couples ; Valeur centrale de 7,5 et valeur retenue de 8 couples).

Cette valeur centrale de l'intervalle n'est calculée que pour les oiseaux appartenant à la famille des passereaux.

Les cases vertes de la colonne « Effectif retenu » correspondent aux espèces de passereaux communes à notre étude et celle de Malhers (2020).

Les cases bleues de la colonne « Effectif retenu » correspondent à la somme des valeurs « Effectif retenu » des passereaux des 4 catégories « Espèces en déclin », « Espèces stables », « Espèces en hausse » et « Espèces marginales » respectivement.

La case « Total couple de passereaux (2015-2018) » correspond à la somme des valeurs des 4 catégories précédemment citées.

Les espèces « non passereaux » sont indiquées dans la colonne « Effectif retenu » mais non prises en comptes dans ces calculs.

ESPÈCES EN DÉCLIN	2005-2008	2015-2018	Effectif retenu
Accenteur mouchet	700-1 000	350-450	400
Chardonneret élégant	12-20	7	7
Choucas des tours	15-20	0-1	1
Chouette hulotte	< 5	1 ?	non passereaux
Étourneau sansonnet	env. 2 000	env. 1 000	1000
Faucon crécerelle	35-50	25-35	non passereaux
Gobemouche gris	30-35	5-7	6
Hirondelle de fenêtre	550	94	94
Hirondelle rustique	7-10	1-2	2
Martinet noir	1 500-2 500	1 000-1 500	non passereaux
Moineau friquet	< 5	0	0
Moineau domestique	?	2 500-4 000	3250
Pic épeichette	20-30	2	non passereaux
Serin cini	60-90	5-12	9
Sittelle torchepot	32-37	5-10	8
Verdier d'Europe	300-500	120-180	150
			4927
ESPÈCES STABLES	2005-2008	2015-2018	
Bergeronnette grise	10	12	12
Canard colvert	75-120	90-140	non passereaux
Corneille noire	400-500	450-550	500
Geai des chênes	75-130	80-140	110
Grive musicienne	60-100	60-100	80
Merle noir	1 000-1 700	1 300-2 100	1700
Pie bavarde	250-300	250-300	275
Pigeon colombin	230-380	200-350	non passereaux
Rougequeue noir	200-300	150-250	275
Goéland leucophée	3	7 (dont 4 mixtes)	non passereaux
Grimpereau des jardins	80-125	100-150	125
Fauvette grisette	1	1	1
Rousserolle effarvatte	1	3	non passereaux
			3078

ESPÈCES EN HAUSSE	2005-2008	2015-2018	
Bernache du Canada	0	3-4	non passereaux
Cygne tuberculé	0	2	non passereaux
Faucon pèlerin	0	2-3	non passereaux
Foulque macroule	0	3	non passereaux
Bergeronnette des ruisseaux	20-25	46-50	48
Épervier d'Europe	3	10-15	non passereaux
Fauvette à tête noire	120-150	250-300	275
Gallinule poule-d'eau	17-19	40-45	non passereaux
Goéland argenté	> 35	70-150	non passereaux
Goéland brun (mixtes compris)	3-4	env. 15	non passereaux
Mésange à longue queue	40-60	75-100	88
Mésange bleue	400-600	650-800	725
Mésange charbonnière	425-650	750-1 000	875
Mésange huppée	10-15	20-30	25
Mésange nonnette	5-10	15-25	20
Perruche à collier	1	> 50	non passereaux
Pic épeiche	1	4	non passereaux
Pic vert	< 5	6-10	non passereaux
Pinson des arbres	100-175	200-250	225
Pouillot véloce	15-25	40-65	85
Roitelet à triple bandeau	1	5-10	8
Roitelet huppé	30-45	40-70	55
Rougegorge familier	60-110	180-250	430
Troglodyte mignon	200-300	400-550	950
Tourterelle turque	< 5	5-10	non passereaux
			3809
ESPÈCES MARGINALES	2005-2008	2015-2018	
Bruant zizi	1	0	0
Fauvette des jardins	0	1	1
Goéland pontique	0	1 (mixte)	non passereaux
Grive draine	1	4	4
Hypolaïs polyglotte	1	1	non passereaux
Linotte mélodieuse	1	0	0
Martin-pêcheur d'Europe	1	0	non passereaux
Mésange noire	2	1	1
Petit Gravelot	1	0	non passereaux
Rousserolle verderolle	1	0	non passereaux
			6

Total couple de passereaux 2015-2018	11820
--------------------------------------	-------

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA PRÉVALENCE D'ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM CHEZ LES OISEAUX D'ILE-DE-FRANCE

AUTEUR : Adrien ETIENNE

RÉSUMÉ :

Objectifs : Après avoir dressé un état des lieux des connaissances actuelles du portage d'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* par les oiseaux, il s'agissait de documenter la présence de l'ADN de cette bactérie dans des cadavres d'oiseaux originaires d'Ile-de-France par des techniques de biologie moléculaire et de comparer sa détection selon le type de prélèvements effectués pour à terme identifier celui/ceux qui est/sont le(s) plus approprié(s) dans l'étude des infections par cet agent pathogène.

Méthodes : Des prélèvements de rate et de foie provenant de 739 oiseaux sauvages (famille des passeriformes), morts ou ayant été euthanasiés au ChuvFs et originaires des zones urbaines et péri-urbaines d'Ile-de-France et des départements limitrophes, ont été examinés par qPCR *msp2* pour détecter l'ADN d'*A. phagocytophilum*. Seule la peau des individus positifs pour la rate et/ou le foie a ensuite été testée. Des PCR nichées *ARNr 16S* et *typA* suivis du séquençage des segments amplifiés ont été réalisées pour confirmer la positivité des échantillons. Ces prélèvements ont été comparés selon différents critères (facilité de prélèvement, état de conservation, rapidité d'extraction de l'ADN, capacité à « concentrer » la bactérie *in vivo*).

Résultats : Deux jeunes merles noirs (*Turdus merula*) ont fourni un résultat positif pour l'ADN d'*A. phagocytophilum*, ce qui correspond à une prévalence de 0,27 % (2/739). Ce résultat s'élève à 2,2 % (2/91) s'il est rapporté à l'effectif des merles noirs de l'étude. Enfin, la rate et la peau ont donné les Ct les plus faibles en matière de détection d'*A. phagocytophilum* chez ces deux oiseaux.

Conclusion : Notre étude confirme la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez des merles noirs en Ile-de-France. Ces oiseaux étant autochtones car jeunes, nos résultats suggèrent fortement une infection de source locale, ayant pu résulter d'une piqûre de tiques infectées à partir d'hôtes autochtones ou d'oiseaux migrateurs. Toutefois, ce taux de prévalence faible ne permet pas de spéculer quant à la nature du/des rôle(s) que les hôtes aviaires pourraient jouer – ou pas – dans le(s) cycle(s) d'*A. phagocytophilum*. Le typage à partir des échantillons positifs pourrait apporter des pistes et des études complémentaires sont à envisager. Il serait notamment intéressant de mener des investigations dans d'autres régions de France, moins urbanisées, en particulier celles où *A. phagocytophilum* est connue pour circuler activement, afin d'analyser si les résultats sont comparables à ceux d'Ile-de-France et/ou peuvent être reliées à la situation épidémiologique dans ces régions.

MOTS CLÉS :

ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM / PASSÉRIFORME / MERLE NOIR / HÔTE RÉSERVOIR / ZONE URBAINE / ÉPIDEMIOLOGIE MOLÉCULAIRE / RATE / FOIE / PEAU / OISEAU / ILE-DE-FRANCE

JURY :

Présidente : Pr Nadia HADDAD HOANG-XUAN

Directeur de thèse : Dr Pierre DESHUIILLERS

Invité co-encadrant : Dr Pascal ARNÉ

Examinatrice : Dr Anne-Claire LAGRÉE

Invités : Pr Henri-Jean BOULOUIS et Dr Cécile LE BARZIC

PRELIMINARY STUDY OF THE PREVALENCE OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* IN BIRDS FROM ILE-DE-FRANCE

AUTHOR: Adrien ETIENNE

SUMMARY:

Objectives: Following a review of the literature pertaining to the presence of *A. phagocytophilum* DNA in birds, the aim of this experimental study was twofold: First, to document the occurrence of *A. phagocytophilum* DNA in birds from Ile-de-France, by molecular biology techniques; Second, in birds infected by the bacterium, the aim was to compare the detection of *A. phagocytophilum* DNA in three different tissues in order to determine which sample(s) is (are) the most suited to detect *A. phagocytophilum* DNA in birds.

Methods: Spleen and liver samples from 739 wild birds (passeriforms), dead or euthanized in the ChuvFs, coming from urban and peri-urban areas of Ile-de-France and bordering departments, were examined by *msp2* qPCR to detect *A. phagocytophilum* DNA. Only the skin of individuals positive for spleen and/or liver was/were then tested. Nested *16S rRNA* and *typA* PCR followed by sequencing were performed to confirm the positivity of the samples. These samples were compared according to different criteria (ease of collection, state of preservation, speed of DNA extraction, ability to « concentrate » the bacteria *in vivo*).

Results: Two young blackbirds (*Turdus merula*) tested positive for *A. phagocytophilum* DNA, corresponding to a prevalence of 0.27% (2/739). This result rises to 2.2% (2/91) if the number of blackbirds in the study is considered. Finally, the spleen and skin gave the lower Ct for detection of *A. phagocytophilum* in these two birds.

Conclusion: Our study confirm the presence of *A. phagocytophilum* DNA in blackbirds in Ile-de-France. As these birds are autochthonous because they are young, our results strongly suggest a local source of infection, which may have resulted from infected ticks from autochthonous hosts or from migratory birds. However, this low prevalence rate does not allow to speculate on the nature of the role(s) that avian hosts may or may not play in the cycle(s) of *A. phagocytophilum*. Typing positive samples could provide indices regarding the origin of the infectious agent and further studies should be considered. In particular, it would be interesting to carry out investigations in other, less urbanised regions of France in particular those where *A. phagocytophilum* circulates actively, to compare the results to those of Ile-de-France and/or to determine if they can be related to the epidemiological situation in these regions.

KEYWORDS:

ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM / PASSERIFORM / BLACKBIRD / RESERVOIR HOST / URBAN AREA / MOLECULAR EPIDEMIOLOGY / SPLEEN / LIVER / SKIN / BIRDS / ILE-DE-FRANCE

JURY:

Chairperson: Pr Nadia HADDAD HOANG-XUAN

Thesis Director: Dr Pierre DESHUIILLERS

Guest co-director: Dr Pascal ARNÉ

Reviewer: Dr Anne-Claire LAGRÉE

Guests: Pr Henri-Jean BOULOUIS and Dr Cécile LE BARZIC