REPUBLIQUE TUNISIENNE

UNIVERSITE DE LA MANOUBA

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE VETERINAIRE DE SIDI THABET

ANNEE : 2021 **N°…/21**

Surveillance moléculaire et caractérisation phylogéographique d'*Anaplasma marginale* chez des bovins en Tunisie

THESE

Pour l'obtention du

DOCTORAT EN MEDECINE VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29/ 06 /2021 par

Meriem BEN ABDALLAH

Née le 08/05/1994 à Tunis

Membres du jury :

Président :	**Pr. Malek ZRELLI**
Assesseur :	**Pr. Mohamed Aziz DARGHOUTH**
Rapporteur :	**Pr. Lilia MESSADI**
Membre invité :	**Dr. Mourad BEN SAID**

Année universitaire : 2020-2021

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu pour que je suis et ce que j'ai

A notre président de jury
Monsieur le Professeur Malek ZRELLI
Vous nous avez fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse
Soyez assuré de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

A notre juge de thèse
Monsieur le Professeur Mohamed Aziz DARGHOUTH
Vous nous avez fait l'honneur de prendre part à notre jury de thèse.
Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.
Très sincères remerciements avec toute mon admiration.

A Notre Directrice de thèse
Madame la Professeure Lilia MESSADI
Vous nous avez fait l'honneur d'accepter la direction de notre thèse.
Nous vous remercions de nous avoir offert un cadre agréable
pour l'élaboration de notre travail.
Nous vous remercions infiniment pour votre aide précieuse, votre gentillesse,
votre disponibilité, votre confiance et vos conseils éclairés.
Vos qualités humaines et professionnelles sont un modèle à suivre.
Votre modestie et votre dévouement au travail seront pour nous un exemple à suivre
dans notre future vie professionnelle.
Que ce travail vous soit dédié, en témoignage de notre admiration et notre attachement.

A notre invité
Monsieur le Docteur Mourad BEN SAID
C'est pour nous un grand plaisir et une immense joie de vous avoir
parmi les membres de notre jury.
Vous nous avez guidée patiemment tout au long de ce travail.
Nous avons toujours trouvé auprès de vous le conseiller le plus vigilant et le maitre type.
Que ce travail vous soit dédié, en reconnaissance de l'aide précieuse et des énormes efforts
que vous avez consentis pour son accomplissement.
Veuillez trouver ici notre reconnaissance et notre profonde admiration
pour la qualité de la recherche que vous menez.

Je remercie

Dr. Hanène BELKAHIA et **Dr**. **Rachid SELMI**

Pour leur aide précieuse dans l'élaboration de ce travail

Sincères remerciements et hommages respectueux.

Je remercie également

Dr. FARHAT Malek, Dr. HSSINI Zouhaier, Dr. BENZARTI Haythem,
Dr. CHRAIET Maher, Dr. AJABI Mohamed Yosri, Dr. NOUASRI Hanene,
Dr. TIBINI Hssan, Dr. TOUIL Samir, Dr. TOUJENI Bilel, Dr. JLASSI Atef,
Dr. CHARFEDDINE Kamel, Dr. ZAAFOURI Sleheddin, Dr. GHANEY Najeh,
Dr. BOUMIZA Aissa, Dr. BRAYKI Mehdi, et Dr. MABROUK Sofiane
pour leur aide précieuse dans la réalisation de l'échantillonnage et l'accès aux fermes,
pour leur accueil chaleureux, leur bienveillance et leur professionnalisme.

Tous mes enseignants

C'est grâce à vos efforts conjugués que je postule aujourd'hui pour la thèse de doctorat en médecine vétérinaire.

Veuillez croire en ma reconnaissance indéfectible et ma gratitude.

DEDICACES

« Le plaisir des bons cœurs, c'est la reconnaissance » de Jean François de la Harpe

Je dédie ce travail aux personnes chères à mon cœur

A mes adorables parents M'HAMED et CHEDIA

Qui ont su m'encourager et me soutenir durant ces longues études

Qui m'ont inculqué leurs valeurs et une certaine vision de vie

Qui y ont cru parfois plus que moi

Qui sont toujours là quand j'ai besoin d'eux

Votre amour, votre confiance, et votre patience sont mes biens les plus précieux.

Je vous exprime mon respect, mon amour inconditionnel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

Puisse Dieu vous prêter une longue vie et bonne santé pour que je puisse vous combler à mon tour.

Avec ma gratitude infinie… je vous aime.

A ma chère sœur BOUTHEINA et mon cher petit frère MARWEN

Pour notre complicité et nos fous rires

La vie serait bien triste sans vous.

En témoignage de mon amour et de ma grande affection, je vous prie de trouver dans ce travail, l'expression de mon estime et mon sincère attachement.

Je prie Dieu, le tout puissant, pour qu'il vous donne bonheur et prospérité.

A mes chers grands-parents

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon amour et mon affection la plus sincère.

A tous mes amis de l'école préparatoire de la Soukra
et l'Ecole Vétérinaire de Sidi Thabet

Votre amitié est un honneur et une fierté pour moi.

J'espère revoir et pouvoir rester en contact avec la plupart d'entre vous.

Ce travail est le vôtre.

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur

A tous mes maitres et mes professeurs

A tous ceux qui sont présents

TABLE DES MATIERES **PAGE**

INTRODUCTION 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. GENERALITES SUR LES BACTERIES DU GENRE *Anaplasma* 2

II. *Anaplasma marginale* : PRINCIPALE ESPECE INFECTANT LES BOVINS 6

1. Définition 6

2. Histoire et découverte 6

3. Etude bactériologique 6

3.1. Taxonomie 6

3.2. Morphologie 7

3.3. Génome 8

3.4. Culture 8

4. Etude épidémiologique 10

4.1. Répartition géographique et hôtes 10

4.2. Vecteurs et transmission 11

4.3. Données actuelles sur l'infection par *Anaplasma marginale* en Afrique du Nord 14

5. Tableau clinique de l'anaplasmose bovine 16

6. Méthodes de détection de l'espèce *A. marginale* 18

6.1. Détection directe de la bactérie sur un étalement de sang 18

6.2. Méthodes de détection sérologique 19

6.3 Méthodes de détection moléculaire 20

7. Outils de caractérisation moléculaire d'*A. marginale* 21

7.1. Typage par un locus unique 21

7.1.1. Le locus de l'ARNr 16S 21

7.1.2. L'opéron groESL 21

7.1.3. Gènes codant pour les protéines majeures de surface (MSP) 22

7.2. Typage par un schéma multi-loci (MLST) 24

8. Traitement 25

9. Prophylaxie 26

9.1. Prophylaxie sanitaire 26

9.2. Prophylaxie médicale 26
9.2.1. Chimioprophylaxie 26
9.2.2. Vaccination 26
9.3. Recommandations relatives aux importations en provenance de pays considérés comme infectés par l'anaplasmose bovine selon l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) 28
10. Perspectives 28
Conclusion 29

PARTIE EXPERIMENTALE

I. OBJECTIFS 30

II. MATERIEL ET METHODES 30
1. Hôtes et régions d'étude 30
2. Prélèvement du sang total, extraction et analyse des ADN génomiques 33
2.1. Prélèvement du sang total 33
2.2. Extraction de l'ADN génomique 34
2.2.1. Principe 34
2.2.2. Protocole 35
2.3. Analyse de l'ADN génomique par électrophorèse 36
2.3.1. Principe 36
2.3.2. Protocole 36
2.4. Détection des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* 37
2.4.1. Principe 37
2.4.2. Protocole 38
3. Détection spécifique d'*A. marginale* 39
3.1. Principe 39
3.2. Protocole 39
4. Caractérisation moléculaire d'*A. marginale* 40
4.1. Principe 40
4.2. Protocole 41
5. Purification et séquençage automatique des produits de PCR sélectionnés 42

6. Analyses statistiques et étude bio-informatique 42

III. RESULTATS 44
1. Contrôle qualitatif et quantitatif des ADN génomiques 44
2. Détection moléculaire des *Anaplasmataceae* et d'*A. marginale* 44
2.1. Obtention des amplifiats 44
2.1.1. Détection moléculaire des *Anaplasmataceae* 44
2.1.2. Détection moléculaire d'*A. marginale* 45
2.2. Prévalence moléculaire des *Anaplasmataceae* et d'*A. marginale* 46
2.2.1. Prévalence moléculaire en fonction des gouvernorats 46
2.2.2. Prévalence moléculaire en fonction des délégations 47
2.2.3. Prévalence moléculaire en fonction des autres facteurs de risque 49
3. Caractérisation moléculaire de l'espèce *A. marginale* 50
3.1. Obtention des amplifiats 50
3.2. Analyse d'homologie et étude phylogénétique 51
3.2.1. Variants génétiques du locus *lipA* 53
3.2.2. Variants génétiques du locus *sucB* 57

IV. DISCUSSION 70

CONCLUSION 74

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES FIGURES **PAGE**

Figure 1 :	Les différentes espèces d'anaplasmes affectant les animaux domestiques et sauvages	2
Figure 2 :	Prévalences maximales des infections à *Anaplasma* spp. chez différentes espèces animales dans les pays d'Afrique du Nord	4
Figure 3 :	Tropisme des différentes espèces classifiées du genre *Anaplasma*	5
Figure 4 :	Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène ARNr 16S des différentes espèces bactériennes appartenant à l'ordre des Rickettsiales	7
Figure 5 :	Inclusions d'*A. marginale* infectant des érythrocytes d'un bovin atteint d'anaplasmose bovine	7
Figure 6 :	Microphotographie d'un frottis coloré au Panoptique de cellules ISE6 d'*Ixodes scapularis* infectées par la souche Jaboticabal d'*A. marginale*	8
Figure 7 :	Visualisation microscopique des formes réticulées se divisant par scission binaire (à gauche) et des formes denses (à droite) d'*A. marginale* dans des cellules de tiques	9
Figure 8 :	*Stomoxys calcitrans*	11
Figure 9 :	Photographie montrant une observation microscopique de glandes salivaires de la tique *Dermacentor reticulatus* infectées par *A. marginale*	13
Figure 10 :	Schéma du cycle de développement d'*Anaplasma marginale* chez les bovins	14
Figure 11 :	Bovins atteints d'anaplasmose à *Anaplasma marginale*	17
Figure 12 :	Photographie d'une observation microscopique d'un étalement de sang de bovin infecté par *A. marginale* coloré au Giemsa	19
Figure 13 :	Ecorégions mondiales	23
Figure 14 :	Carte de la Tunisie montrant les sites d'échantillonnage de la présente étude	32
Figure 15 :	Prélèvement de sang sur tube EDTA chez un bovin	34
Figure 16 :	Gel d'agarose à 0,8% montrant l'ADNg extrait	44

Figure 17 :	Photographie de gel visualisant les produits de la PCR sur des échantillons de sang et de tiques révélant une séquence partielle du gène ARNr 16S spécifique à toutes les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*	45
Figure 18 :	Photographie de gel visualisant les produits de la PCR sur des échantillons de sang révélant une séquence partielle du gène *msp4* spécifique à *A. marginale*	45
Figure 19 :	Gel visualisant les produits de la PCR amplifiés à partir d'une séquence partielle du gène *lipA* à partir des échantillons positifs à *A. marginale*	51
Figure 20 :	Gel visualisant les produits de la PCR amplifiés à partir d'une séquence partielle du gène *sucB* à partir des échantillons positifs à *A. marginale*	51
Figure 21 :	Arbre phylogénétique des variants génétiques d'*A. marginale* basée sur l'alignement multiple des séquences nucléotidiques partielles (501 pb) du gène *lipA* en utilisant la méthode 'Neighbor-Joining'	56
Figure 22 :	Différences nucléotidiques (A) et d'acides aminés (B) entre les différents variants génétiques du gène *sucB* jusqu'à cette étude	59
Figure 23 :	Arbre phylogénétique des isolats et souches d'*A. marginale* basé sur l'alignement multiple des séquences nucléotidiques partielles (681 pb) du gène *sucB* en utilisant la méthode 'Neighbor-Joining'	69

LISTE DES TABLEAUX **PAGE**

Tableau I :	Caractéristiques des principales espèces du genre *Anaplasma*	3
Tableau II :	Prévalences moléculaires d'*A. marginale* dans différents pays du monde	10
Tableau III :	Prévalence moléculaire d'*Anaplasma marginale* dans différents pays Nord-Africains	15
Tableau IV :	Diagnostic différentiel de l'anaplasmose avec les principales hémoparasitoses affectant les bovins	18
Tableau V :	Méthodes de détection sérologique d'*A. marginale*	19
Tableau VI :	Méthodes de détection moléculaire d'*A. marginale*	20
Tableau VII :	Répartition des bovins selon les zones bioclimatiques et des facteurs de risque liés aux bovins	31
Tableau VIII :	Répartition des bovins en fonction des gouvernorats et des délégations	33
Tableau IX :	Amorces utilisées dans la détection des espèces de la famille des *Anaplasmataceae*	37
Tableau X :	Réactifs mélangés dans chaque tube pour la PCR amplifiant le fragment du gène ARNr 16S	38
Tableau XI :	Calcul des volumes des réactifs restants ajoutés à la réaction	38
Tableau XII :	Programme d'amplification permettant la détection des espèces appartenant à la famille des *Anaplasmataceae*	39
Tableau XIII :	Amorces utilisées dans la détection de l'espèce *A. marginale*	39
Tableau XIV :	Programme d'amplification permettant la détection de l'espèce *A. marginale*	40
Tableau XV :	Gènes et amorces utilisés dans la caractérisation phylogéographique des isolats tunisiens révélés d'*A. marginale*	40
Tableau XVI :	Réactifs mélangés dans chaque tube pour les PCRs amplifiant les fragments des gènes *lipA* et *sucB*	41
Tableau XVII :	Calcul des volumes de réactifs restants ajoutés à la réaction d'amplification des fragments des gènes *lipA* et *sucB*	41

Tableau XVIII :	Programme d'amplification permettant l'obtention des amplifiats des fragments de gènes *lipA* et *sucB* isolés à partir de l'espèce *A. marginale*	42
Tableau XIX :	Prévalence moléculaire des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et de l'espèce *A. marginale* chez les bovins en fonction des gouvernorats	46
Tableau XX :	Prévalence moléculaire des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et de l'espèce *A. marginale* chez les bovins selon les délégations	48
Tableau XXI :	Prévalence moléculaire des *Anaplasmataceae* et de l'espèce *A. marginale* en fonction des facteurs de risque	50
Tableau XXII :	Désignations et informations sur les isolats d'*A. marginale* caractérisés après le séquençage des fragments des gènes *lipA* et *sucB*	52
Tableau XXIII :	Taux d'homologie des nucléotides (en bas) et des acides aminés (en haut) entre tous les variants génétiques disponibles sur la base de la séquence partielle étudiée du gène *lipA*	54
Tableau XXIV :	Différences nucléotidiques et d'acides aminés entre les différents variants génétiques du gène *lipA* révélés jusqu'à cette étude	55
Tableau XXV :	Taux d'homologie des nucléotides (en bas) et des acides aminés (en haut) entre tous les variants génétiques disponibles sur la base de la séquence partielle étudiée du gène *sucB*	58

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNg : acide désoxyribonucléique génomique

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

BET : bromure d'éthidium

dNTP : désoxynucléotides triphosphates

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

kb : kilo-bases

Mb : méga-bases

mM : milli-molaire

mL : millilitre

g : gramme

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

q-s-p : quantité suffisante pour

SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide

TBE : tampon tris-borate-EDTA

UV : ultra-violet

µM : micro-molaire

µL : microlitre

LISTE DES ABREVIATIONS DES ACIDES AMINES

A	Alanine
R	Arginine
N	Asparagine
D	Acide Aspartique
C	Cystéine
Q	Glutamine
E	Acide Glutamique
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
L	Leucine
K	Lysine
M	Méthionine
F	Phénylalanine
P	Proline
S	Sérine
T	Thréonine
W	Tryptophane
Y	Tyrosine
V	Valine
X	Acide aminé quelconque

INTRODUCTION GENERALE

L'élevage constitue la spéculation la plus répandue dans le domaine agricole tunisien et représente environ le tiers du PIB agricole (GIVLAIT, 2004). L'une des principales contraintes qui influencent négativement l'amélioration de la productivité du cheptel est l'infestation massive du bétail par les tiques ainsi que les maladies qu'elles transmettent (Boularias *et al*., 2021).

Les tiques sont considérées comme les principaux vecteurs d'agents pathogènes affectant le bétail. En effet, plus de 80% des bovins dans le monde risquent d'entrer en contact avec les tiques et de contracter des maladies transmises par les tiques (Boularias *et al*., 2021). Parmi ces maladies nous citons l'anaplasmose bovine.

L'anaplasmose bovine est une maladie infectieuse, bactérienne, transmissible par des arthropodes vecteurs. Elle est largement répandue dans le monde, touchant principalement les bovins et les ruminants sauvages (Battilani *et al*., 2017). Cette maladie est causée principalement par l'infection à *Anaplasma marginale*, bactérie intracellulaire obligatoire, Gram négative, infectant les érythrocytes (Kocan *et al*., 2008). L'anaplasmose bovine se manifeste essentiellement par un syndrome fébrile, une anémie et parfois un ictère sans hémoglobinurie. Chez les bovins adultes de plus de 2 ans, la maladie est aiguë et souvent mortelle avec des risques de mortalité compris entre 29% et 49% (Aubry et Geale, 2011).

Dans ce contexte, il semble intéressant d'étudier les foyers d'anaplasmose bovine dans notre pays. Dans une première partie, le point sera fait sur les connaissances actuelles sur l'anaplasmose en particulier les caractéristiques d'*Anaplasma marginale*, l'épidémiologie de l'infection, ainsi que les méthodes de détection et de caractérisation.

Dans une deuxième partie, pour la première fois des foyers d'anaplasmose bovine seront étudiés dans les élevages laitiers situés dans plusieurs régions de la Tunisie. Dans cette étude, le premier objectif sera d'évaluer la prévalence moléculaire d'*A. marginale* chez les bovins et d'analyser les différents facteurs de risque associés. Le deuxième objectif sera de caractériser génétiquement les souches tunisiennes de l'espèce *A. marginale* en se basant sur les deux marqueurs phylogéographiques *lipA* et *sucB*.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. GENERALITES SUR LES BACTERIES DU GENRE *Anaplasma*

Les bactéries du genre *Anaplasma* sont des bactéries à Gram négatif, de petite taille, de forme ronde ou ellipsoïdale, aux contours légèrement irréguliers, qui se multiplient à l'intérieur des vacuoles dans le cytoplasme des cellules hôtes sous forme de morula. Leurs cellules hôtes sont des cellules hématopoïétiques matures ou immatures (granulocytes, érythrocytes, monocytes, plaquettes) (Dumler *et al.*, 2001 ; Uilenberg et Gharbi, 2004 ; Silaghi *et al.*, 2017).

Le genre *Anaplasma* comprend des espèces classifiées à savoir *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis, A. platys* et *A. phagocytophilum* et d'autres non classifiées (**Tableau I**) (Belkahia *et al.*, 2015b ; Ben Said *et al.*, 2017, 2018a).

Ces différentes espèces bactériennes présentent une spécificité d'hôtes et un tropisme cellulaire bien défini et sont responsables d'une maladie appelée l'anaplasmose, communément appelée « la piroplasmose blanche » qui touche aussi bien les ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins et dromadaires) ainsi que les ruminants sauvages (buffles, bisons, gazelles, cerfs et antilopes), les chevaux, les chiens et les chats, les lapins, les chevreuils, les sangliers, les oiseaux et l'Homme (**Figures 1 et 3**) (Kuttler, 1984; M'ghirbi *et al.*, 2012; Boulouis *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017; Battilani *et al.*, 2017; Sisson *et al.*, 2017; Selmi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2020; Said *et al.*, 2021).

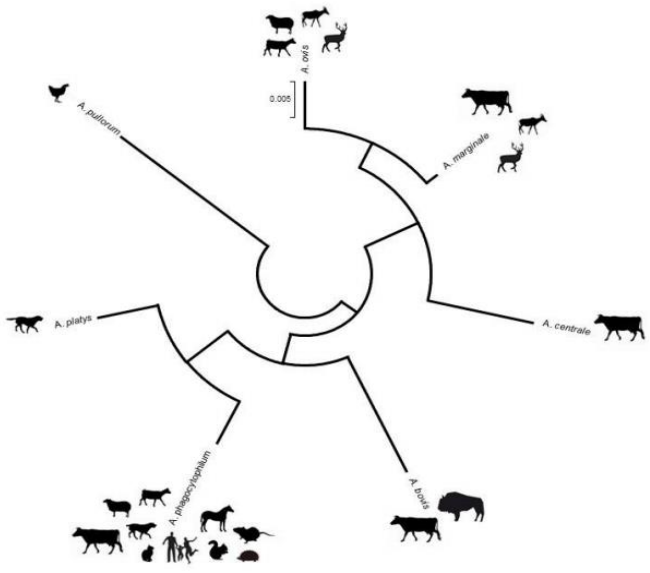

Figure 1 : Les différentes espèces d'anaplasmes affectant les animaux domestiques et sauvages (d'après Battilani *et al.*, 2017)

Tableau I : Caractéristiques des principales espèces du genre *Anaplasma* (d'après Battilani *et al.*, 2017)

***Anaplasma* spp.**	**Distribution géographique**	**Hôtes**	**Tropisme cellulaire**	**Maladie**	**Principaux genres de tiques vectrices**
A. marginale	Tropicales et subtropicales	Bovins, chevreuils et wapitis	Erythrocytes	Anaplasmose bovine	*Dermacentor, Boophilus, Rhipicephalus, Hyalomma, Ixodes*
A. centrale	Tropicales et subtropicales	Bovins	Erythrocytes	Anaplasmose modérée	*Rhipicephalus*
A. ovis	Tropicales et subtropicales	Moutons, chèvres, cerfs, wapitis et antilope	Erythrocytes	Anaplasmose ovine	*Dermacentor, Rhipicephalus*
A. bovis	Amérique du Nord, Asie et Afrique	Bovins, chèvres et lapins	Cellules mononucléées	Anaplasmose bovine monocytaire	*Hyalomma, Rhipicephalus, Amblyomma, Haemaphysalis*
A. phagocytophilum	Partout dans le monde	Humains, bovins, moutons, chiens, cerfs, bisons, rongeurs chats, chevaux, lamas, sangliers, lapins et oiseaux	Granulocytes	Anaplasmose granulocytaire humaine, canine et équine Fièvre à tiques	*Ixodes Hyalomma Rhipicephalus*
A. platys	Partout dans le monde	Chiens	Plaquettes	Thrombocytopénie cyclique canine infectieuse	*Rhipicephalus, Dermacentor, Hyalomma*

L'anaplasmose est largement répandue dans les pays tropicaux, subtropicaux et tempérés du monde.

Les principaux vecteurs incriminés dans la transmission de la maladie sont les tiques (Kocan et al., 2008; Ben Said et al., 2018a).

En Afrique du Nord, la prévalence est variable selon l'étage bioclimatique, la saison, les vecteurs incriminés, et en fonction de différents facteurs liés à l'hôte (**Figure 2**) (Ben Said *et al.*, 2018a).

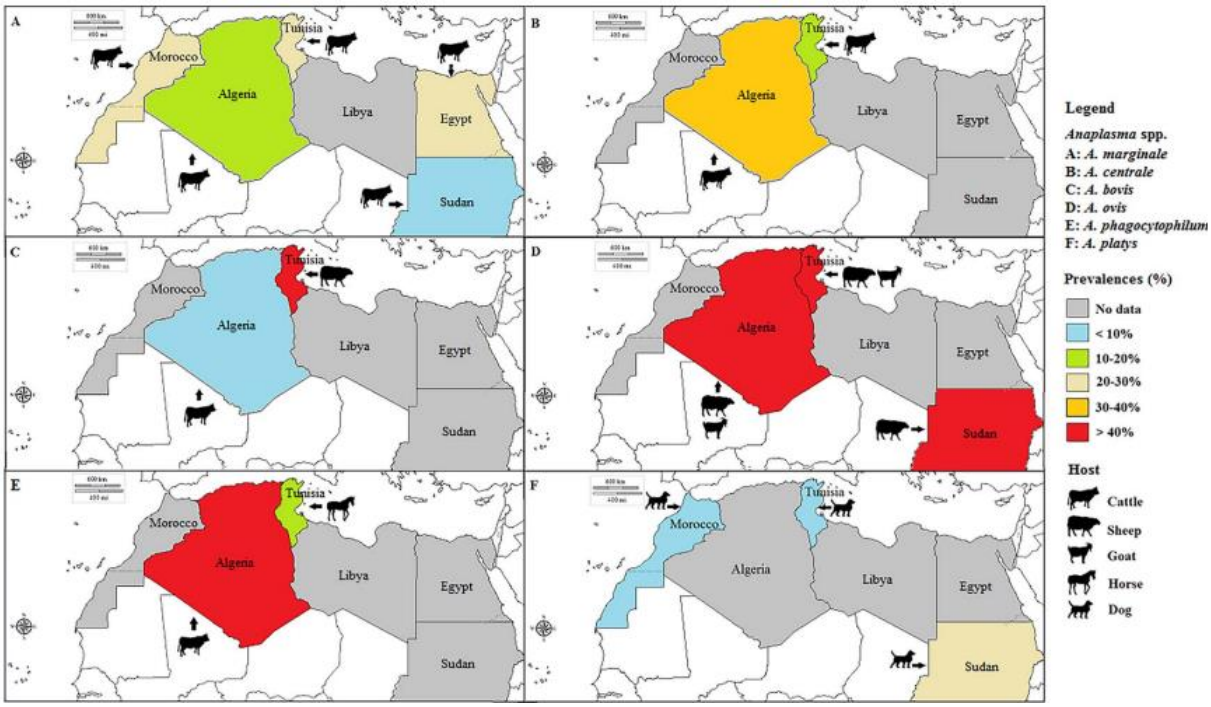

Figure 2 : Prévalences maximales des infections à *Anaplasma* spp. chez différentes espèces animales dans les pays d'Afrique du Nord (d'après Ben Said *et al.*, 2018a)

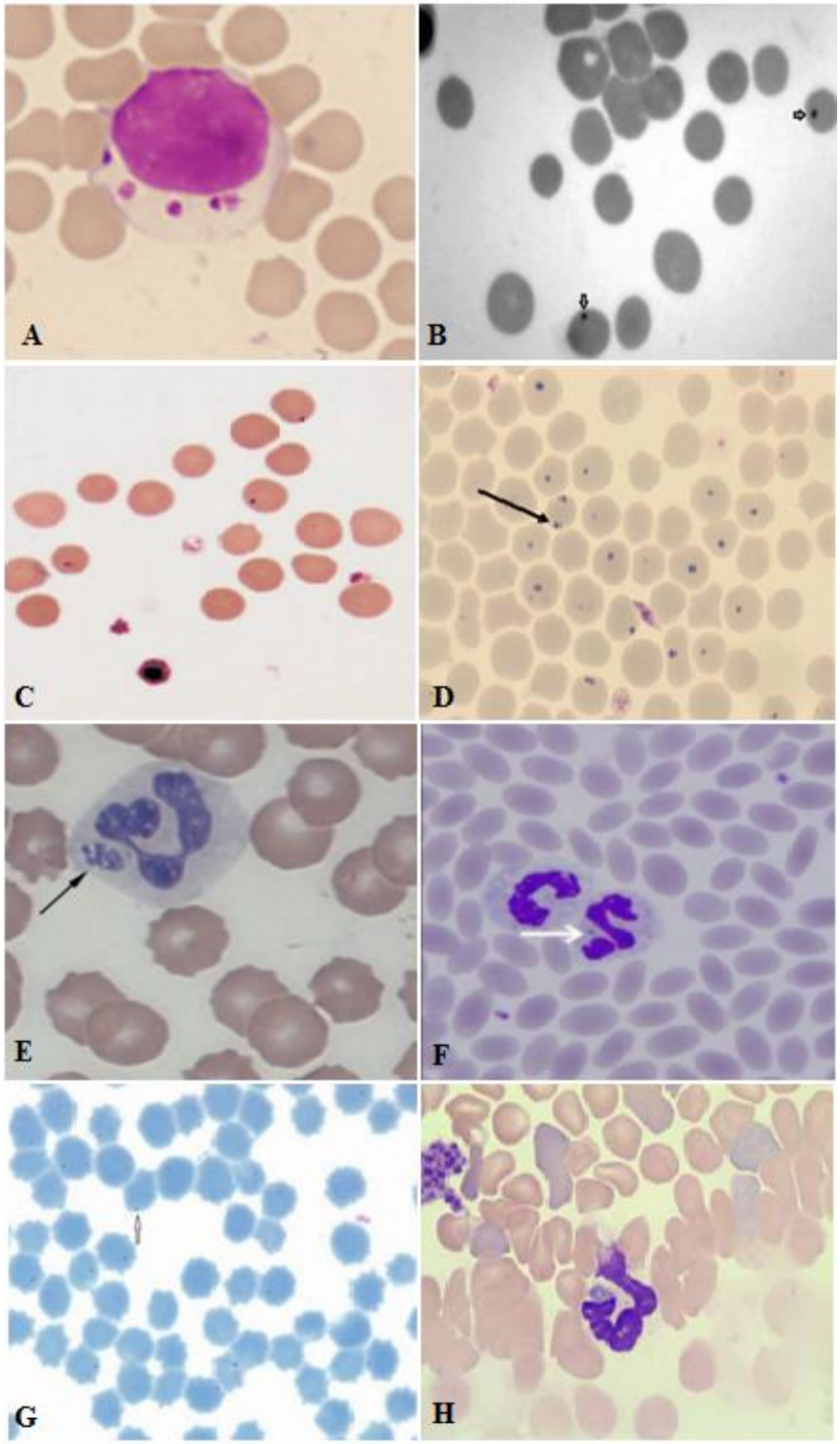

Figure 3 : Tropisme des différentes espèces classifiées du genre *Anaplasma*

A : Monocyte d'un ovin expérimentalement infecté avec *A. bovis* (Liu *et al.*, 2012).
B : Erythrocyte d'un ovin infecté par *A. ovis* (Ait Lbacha *et al.*, 2015).
C : Erythrocyte d'un bovin infecté par *A. marginale* (Sharma *et al.*, 2013).
D : Erythrocyte d'un bovin infecté par *A. centrale* (Bell-Sakyi *et al.*, 2015).
E : Polynucléaire neutrophile d'un chien infecté par *A. phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009).
F : Granulocyte neutrophile d'un dromadaire infecté par *Anaplasma* spp. (Selmi *et al.*, 2019).
G : Erythrocyte d'un cheval infecté par *Anaplasma* spp. (Selmi *et al.*, 2019).
H : Polynucléaire neutrophile d'un chevreuil infecté par *A. marginale* (Boulouis *et al.*, 2015).

II. *Anaplasma marginale* : PRINCIPALE ESPECE INFECTANT LES BOVINS

1. Définition

Anaplasma marginale est responsable chez les bovins d'une maladie infectieuse non contagieuse, inoculable et transmissible par des arthropodes vecteurs, appelée l'anaplasmose bovine. Elle est visible sous forme d'inclusions à la périphérie des érythrocytes (Uilenberg et Gharbi, 2004; Kocan *et al*., 2008).

L'anaplasmose bovine se manifeste cliniquement par un syndrome fébrile, une anémie hémolytique extravasculaire modérée à sévère, et un ictère chez les animaux en début de convalescence (Hornok *et al*., 2012; El-Ashker *et al*., 2015). Cette bactérie appartient à l'ordre des Rickettsiales, et à la famille des *Anaplasmataceae*, de petite taille, se divisant par scission binaire et infectant des vertébrés et des invertébrés (Dumler *et al*., 2001).

2. Histoire et découverte

En 1910, en Afrique du Sud, Arnold Theiler a visualisé sur des frottis sanguins de bovins des corpuscules qu'ils nomment « corps marginaux » situés à la périphérie des érythrocytes des bovins d'où l'appellation de cet agent pathogène *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910).

En 1911, Theiler découvre *A. centrale* (appelée également *A. marginale* subsp. *centrale*), très proche d'*A. marginale*, qui engendre des symptômes similaires d'anaplasmose chez les bovins mais beaucoup plus modérés. Theiler a alors l'idée d'utiliser *A. centrale* comme un vaccin contre *A. marginale* (Theiler, 1910).

L'anaplasmose décrite par Theiler en 1911 est par la suite reconnue aux Etats Unis en 1926. En 1957, *Anaplasma marginale* a été rattachée à l'ordre des Rickettsiales (Durrani et Goyal, 2012).

3. Etude bactériologique

3.1. Taxonomie

Pendant longtemps le genre *Anaplasma* a été placé parmi les protozoaires notamment par analogie avec les babésies et ce n'est qu'en 1957 qu'il a été rattaché à l'ordre des Rickettsiales du fait de ses propriétés métaboliques, morphologiques et sérologiques (Durrani et Goyal, 2012). Ainsi *Anaplasma marginale* appartient à l'embranchement des Proteobacteria, classe Alpha-proteobacteria, ordre des Rickettsiales et à la famille des *Anaplasmataceae* (**Figure 4**) (Battilani *et al*., 2017).

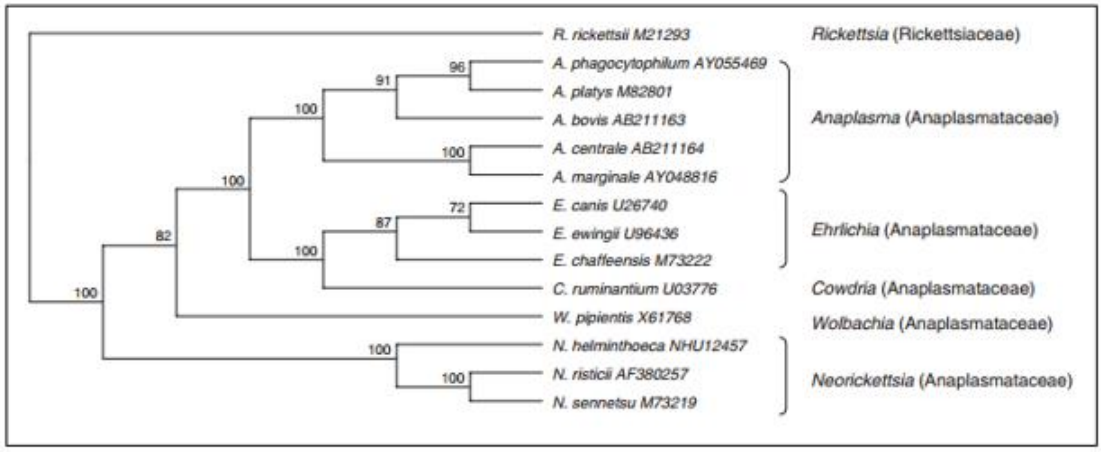

Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène ARNr 16S des différentes espèces bactériennes appartenant à l'ordre des Rickettsiales (d'après Carrade *et al.*, 2009)

3.2. Morphologie

Anaplasma marginale est une bactérie à Gram négatif, contenant un génome circulaire de petite taille (estimé à 1,6 Mb) (Kocan *et al.*, 2003; Atif, 2015), ne contenant pas de lipopolysaccharide (ou endotoxine). Elle est visible sur un étalement de sang coloré au Giemsa, sous forme de petites inclusions rondes, denses, de couleur pourpre foncé, de 0,3 à 0,8 µm de diamètre, accolées à la membrane des érythrocytes et aux contours légèrement irréguliers, ce qui les différencient des corps de Howell-Jolly qui sont parfaitement ronds (**Figure 5**).

Ces inclusions contiennent 4 à 8 sous unités appelées « corps initiaux » et constitués chacun d'une bactérie (Kocan *et al.*, 2003). Au microscopie électronique, ces corps initiaux contiennent une membrane externe et une membrane interne, qui entourent une matière filamenteuse (**Figure 5**).

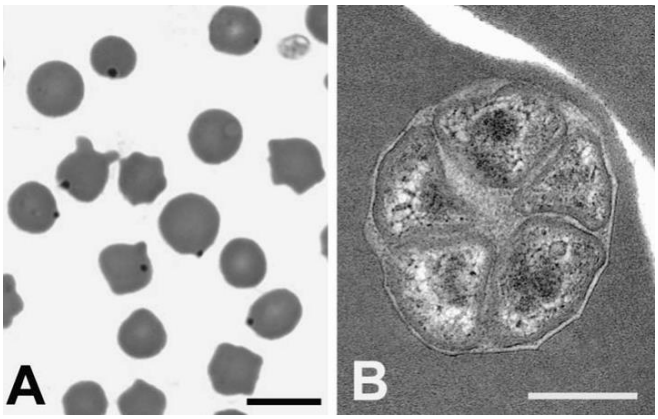

Figure 5 : Inclusions d'*A. marginale* infectant des érythrocytes d'un bovin atteint d'anaplasmose bovine visibles sur un étalement de sang (A) et contenant cinq-sous unités au microscope électronique (B) (d'après Kocan *et al.*, 2003)

3.3. Génome

Jusqu'à cette date, il existe quatorze génomes complets disponibles, y compris la souche de référence St. Maries, isolée à partir d'une vache à anaplasmose aiguë sévère. Le génome d'*A. marginale* est relativement petit (0,8-1,5Mb), a un seul chromosome circulaire et une capacité de codage nettement inférieure pour le métabolisme intermédiaire central. Le génome de la souche St. Maries d'*Anaplasma marginale* a été séquencé en 2005 par Brayton et ses collaborateurs. Il mesure 1 197 687 pb et son pourcentage en G+C est de 49,8%. Certains gènes de biosynthèse du peptidoglycane figurent dans ce génome, en revanche les gènes de biosynthèse du lipide A, composant principal du LPS, sont absents (Kocan *et al.*, 2008; Battilani *et al.*, 2017).

3.4. Culture

La culture d'*A. marginale* est difficile sur des lignées cellulaires habituellement utilisées, ce qui peut être expliqué par l'absence de métabolites nécessaires ou un environnement défavorable. Ce n'est qu'en 1990, que la culture d'*A. marginale* a été réalisée avec la lignée cellulaire de tique IDE8, dérivée d'*Ixodes scapularis* (Passos, 2012).

Alonso et ses collaborateurs (2020) ont utilisé une lignée cellulaire de tique ISE6, dérivée d'*Ixodes scapularis* afin d'évaluer la sensibilité des souches Jaboticabal et Palmeira d'*A. marginale*, face à différents antimicrobiens, afin de permettre la prescription d'un traitement efficace et éviter la sélection et la propagation de souches résistantes (**Figure 6**).

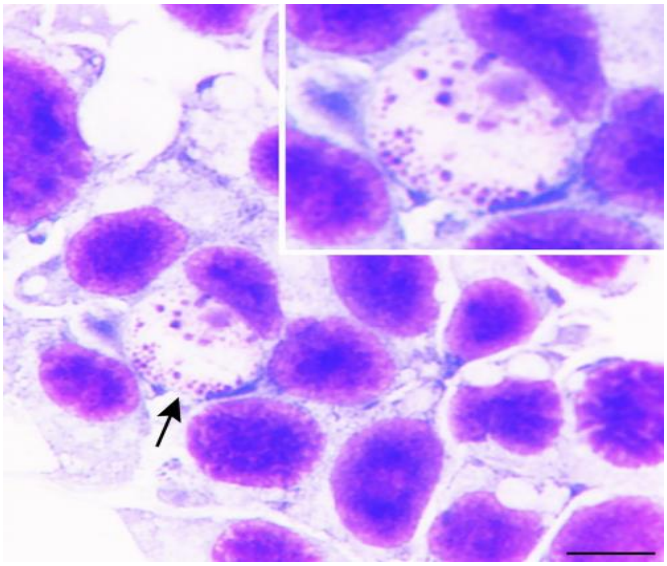

Figure 6 : Microphotographie d'un frottis coloré au Panoptique de cellules ISE6 d'*Ixodes scapularis* infectées par la souche Jaboticabal d'*A. marginale* (d'après Alonso *et al.*, 2020)

La bactérie se trouve sous deux formes, une forme réticulée et une forme dense. En effet, les formes denses présentes dans l'inoculum sont les formes infectantes. Elles adhèrent aux cellules et les infectent, puis elles se transforment en formes réticulées qui se divisent par scission binaire pour former des colonies larges constituées de plusieurs bactéries, qui se transforment de nouveau en formes denses, infectant d'autres cellules (**Figure 7**) (Kocan *et al.*, 2004).

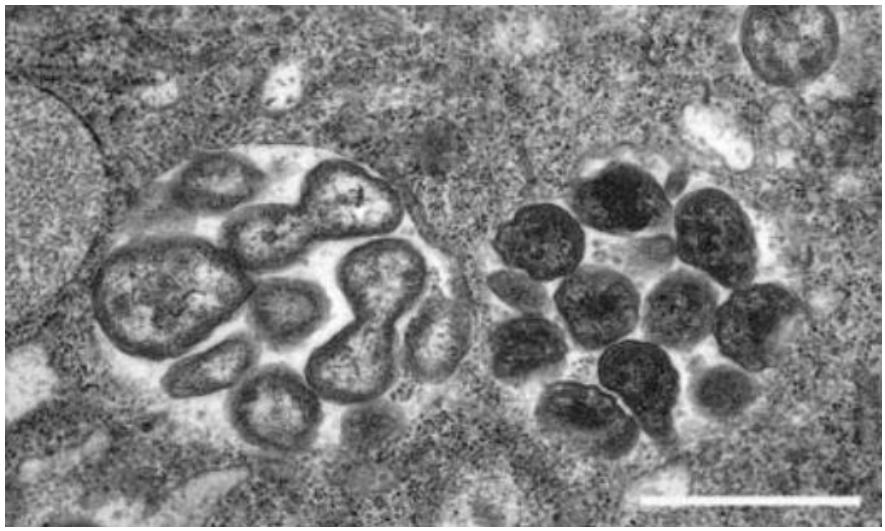

Figure 7 : Visualisation microscopique des formes réticulées se divisant par scission binaire (à gauche) et des formes denses (à droite) d'*A. marginale* dans des cellules de tiques (d'après Kocan *et al.*, 2004)

Cette avancée majeure dans la culture d'*A. marginale* réalisée avec la lignée IDE8, a permis l'étude et la compréhension des interactions hôte-pathogène (expression des gènes et des protéines lors de l'infection) et la réalisation d'un grand pas dans la lutte contre l'infection chez le vecteur et l'hôte, suite à la sélection de gènes candidats pour le développement de vaccins (Passos, 2012).

Une lignée cellulaire de tiques BME26, dérivée de *Boophilus microplus*, a été utilisée pour la première fois, afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés par les cellules des glandes salivaires de la tique en réponse à une infection par *A. marginale*. Il s'est avéré que les gènes différentiellement exprimés codant pour la subolésine, le facteur de Von Willebrand, et la protéine flagelliforme pourraient jouer un rôle dans l'infection et la multiplication d'*A. marginale* dans les cellules de tiques. Ces gènes jugés fonctionnellement pertinents pour les interactions tiques-pathogènes seront probablement des candidats pour le développement de vaccins conçus pour lutter à la fois contre les tiques et les agents pathogènes transmis par les tiques (Zivkovic *et al.*, 2010).

4. Etude épidémiologique

4.1. Répartition géographique et hôtes

Anaplasma marginale est présente sur les 5 continents. Elle infecte les bovins du monde entier, plus particulièrement en régions tropicales et subtropicales. L'infection est enzootique en Amérique latine, en Australie, en Asie, en Afrique et en Europe (**Tableau II**).

Tableau II : Prévalences moléculaires d'*A. marginale* dans différents pays du monde

Pays	Nb de BV étudiés	Prévalence (%)	Technique et gène cible	Référence
Tunisie	232	25,4	RT-PCR (*msp*1β)	Belkahia *et al*. (2015a)
Italie	374	36,3	PCR (*msp*4)	Torina *et al*. (2008)
Algérie	180	11,1	PCR (*msp*4)	Rjeibi *et al*. (2017)
Maroc	668	21,9	nPCR (*msp*5)	Ait Hamou *et al*. (2012)
France	12	100	RT-PCR (*gro*EL)	Dahmani *et al*. (2017)
Egypte	309	68,3	qPCR(*msp*1β)	Al Hosary *et al*. (2020)
Turquie	200	32,5	PCR-RLB (*ARNr*16S)	Aktas et çolak. (2020)
Soudan	692	6,1	PCR (*msp*4)	Awad *et al*. (2011)
Irak	44	9,09	ELISA	Ameen *et al*. (2012)
Sénégal	62	19,4	PCR (*gro*EL)	Dahmani *et al*. (2019)
Angola	76	38	PCR (*msp*4)	Kubelová *et al*. (2010)
Pakistan	184	16,3	PCR(*ARNr* 16S)	Zeb *et al*. (2020)
Inde	965	16,4	PCR (*msp*4)	George *et al*. (2016)
Madagascar	214	89,7	RT-PCR (*msp*1β)	Pothmann *et al*. (2016)
Kenya	192	15,7	PCR (*msp*5)	Franck *et al*. (2015)
Ouganda	240	82,9	qPCR (*msp*1β)	Byaruhanga *et al.* (2018)
Chine	557	31,6	PCR (*msp*4)	Yang *et al*. (2017)
Brésil	400	56,75	nPCR (*gro*EL)	Rogério *et al*. (2020)
Thaïlande	328	23,2	PCR (*msp*4)	Saetiew *et al*. (2020)
Colombie	1432	54,8	sn-PCR (*msp*5)	Jaimes-dueñez *et al*. (2018)
Costa Rica	449	56,9	RT-PCR (msp1β)	Shebish *et al*. (2012)
Equateur	151	86,1	PCR (*msp*5)	Tana-hernández *et al*. (2017)
Afrique du Sud	517	57	qPCR (*msp*1β)	Hove *et al*. (2018)
Îles Galápagos	395	90,1	PCR (msp1α)	Gioia *et al*., (2018)
Philippines	658	19,8	PCR (*gro*EL)	Ybañez *et al*. (2014)

Anaplasma marginale est spécifique des ruminants et plus particulièrement des bovins. Toutefois, la présence d'*A. marginale* a été démontrée aussi chez les bisons, les buffles, les antilopes, et les cerfs qui peuvent être infectés par cette bactérie (Kuttler, 1984; Silva *et al*., 2014; Pothmann *et al*., 2016; Sisson *et al*., 2017; Nguyen *et al*., 2020).

4.2. Vecteurs et transmission

La transmission d'*A. marginale* peut se faire de 3 manières :

Une transmission biologique par le biais des tiques. En effet, 20 espèces de tiques sont reconnues comme vectrices d'*A. marginale* dans le monde entier. La tique *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* est la tique potentiellement vectrice reconnue dans plusieurs régions du monde. Cependant, des tiques du genre *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* et *Amblyomma* peuvent transmettre ce pathogène (Alonso *et al*., 1992; Kocan *et al*., 1992; Naranjo *et al*., 2006; Zivkovic *et al*., 2007 ; Estrada-Peña *et al*., 2009; Barbosa *et al*., 2015; Pothmann *et al*., 2016; Rodriguez *et al*., 2020).

Futse *et al*. (2003) ont montré dans une étude que l'interaction continue entre la tique vectrice et le pathogène n'est pas nécessaire pour conserver la compétence vectorielle. En effet, la tique des régions tropicales et subtropicales *Rh. (B.) microplus* a transmis la souche St. Maries (Idaho) d'*A. marginale* distincte des régions tempérées, et *Dermacentor andersoni* a transmis efficacement la souche portoricaine d'*A. marginale* distincte des régions tropicales.

En Tunisie, il a été démontré que les bovins infestés par les tiques étaient statistiquement plus infectés par *A. marginale* que ceux exempts de tiques (Belkahia *et al*., 2015a).

Une transmission mécanique par les insectes hématophages est aussi rapportée. En effet, douze espèces d'insectes hématophages sont incriminées dans la transmission d'*A. marginale* dont les stomoxes (*Stomoxys calcitrans*), les tabanidés (*Tabanus* spp.) et des moucherons du genre *Culex* (**Figure 8**) (Hornok *et al*., 2008; Kocan *et al*., 2010; Aubry et Geale, 2011; Araújo *et al*., 2021).

Figure 8 : *Stomoxys calcitrans* (d'après Baldacchino *et al*., 2013)

Les stomoxes effectuent plusieurs repas de sang sur plusieurs hôtes. En injectant de la salive avant le repas sanguin, ils peuvent inoculer du sang infecté qui restait sur leurs pièces buccales. En plus de cette transmission directe, il a été observé que les stomoxes pouvaient conserver du sang dans leur jabot qui offre un environnement propice aux pathogènes, d'où une régurgitation de ces pathogènes lors du prochain repas sanguin. Un tel mécanisme a une conséquence épidémiologique considérable puisqu'il permet une transmission d'agents pathogènes entre les troupeaux (Baldacchino *et al*., 2013).

Il a été noté que la transmission de la souche « Florida » d'*Anaplasma marginale* se fait par le biais de *Stomoxys calcitrans* contrairement à la souche «St. Maries» qui est plutôt transmise par les tiques (Baldacchino *et al*., 2013).

Une étude réalisée au Costa Rica a mis en évidence que la présence de taons est un facteur de risque majeur dans la transmission de l'anaplasmose aux bovins et non pas la présence de tiques. C'est aussi le cas de la trypanosomose ; le protozoaire *Trypanosoma vivax* a été transféré de l'Afrique à l'Amérique latine il y a plus de 100 ans et il s'est adapté aux vecteurs présents en Amérique particulièrement les taons au lieu de la mouche tsé-tsé en Afrique après une délétion d'un gène dans son kinétoplaste. Ceci peut expliquer qu'*A. marginale*, à son tour se soit adaptée aux taons en Amérique du sud, d'où la prévalence élevée de l'anaplasmose dans ces régions (Tana-hernández *et al*., 2017).

La transmission biologique par les tiques reste plus efficace que la transmission mécanique en matière d'anaplasmose (Scoles *et al*., 2005).

Il a été rapporté que les poux et la puce *Xenopsylla cheopsis* peuvent avoir un rôle dans la transmission d'*Anaplasma marginale.* En effet, cette bactérie a été détectée chez la puce *Xenopsylla cheopsis* prélevée du renard roux en Italie (Durrani et Goyal, 2012; Dahmani *et al*., 2017).

La transmission iatrogène est également possible et se fait par des aiguilles souillées réutilisées, du matériel de tatouage, de castration, des pinces mouchettes, et lors de transfusion sanguine d'un bovin infecté à un autre bovin naïf (Kocan et al., 2008).

La voie transplacentaire est également prouvée. *Anaplasma marginale* peut traverser la barrière placentaire pendant les deux derniers tiers de gestation et il peut en résulter l'avortement, ou la naissance de veaux infectés (Costa *et al*., 2016).

Quel que soit le mode de transmission, les porteurs chroniques jouent un rôle de réservoir très important. Les ruminants domestiques ainsi que les ruminants sauvages comme les buffles (*Bubalus bubalis*), le bison d'Amérique (*Bison bison*), le cerf de Virginie (*Odocoileus*

virginianus), le cerf mulet, le cerf à queue noire (*Odocoileus hemionus columbianus*) et le wapiti des montagnes rocheuses, servent de réservoirs d'*A. marginale* (Kuttler, 1984; Rajput *et al.*, 2005).

Le cycle de développement d'*A. marginale* chez les tiques est complexe. Les globules rouges infectés par *A. marginale* sont ingérés par les tiques lors du repas sanguin. Les intestins des tiques sont les premiers organes infectés par la bactérie. L'infection se propage vers toutes les cellules de la tique (probablement via l'hémolymphe) y compris les glandes salivaires et la salive via laquelle *A. marginale* est transmise lors du repas sanguin d'un bovin à un autre (**Figures 9 et 10**) (Kocan *et al.*, 2003).

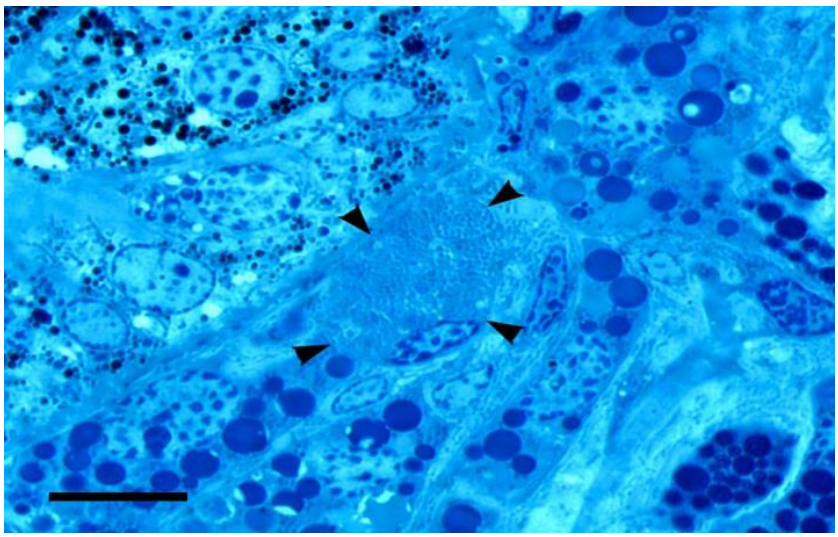

Figure 9 : Photographie montrant une observation microscopique de glandes salivaires de la tique *Dermacentor reticulatus* infectées par *A. marginale* (d'après Zivkovic *et al.*, 2007)

Chez les bovins, les cellules cibles sont les érythrocytes (Uilenberg et Gharbi, 2004). Les érythrocytes infectés sont ainsi phagocytés par le système des phagocytes mononucléés essentiellement dans la rate, d'où l'apparition de l'anémie.

En effet, deux formes d'*A. marginale*, les corps réticulés et denses, se trouvent dans les cellules de tiques infectées. La forme réticulée apparait en premier lieu et représente le stade végétatif. Ensuite, la forme réticulée se transforme en forme dense qui est la forme infectante (Kocan *et al.*, 2004).

Des études ont montré que les tiques mâles du genre *Dermacentor* peuvent jouer un rôle important dans la transmission biologique d'*A. marginale* étant donné qu'elles deviennent infectées de façon persistante et peuvent transmettre la bactérie aux bovins à plusieurs reprises au cours de leur cycle de développement (**Figure 10**) (Kocan *et al.*, 1992).

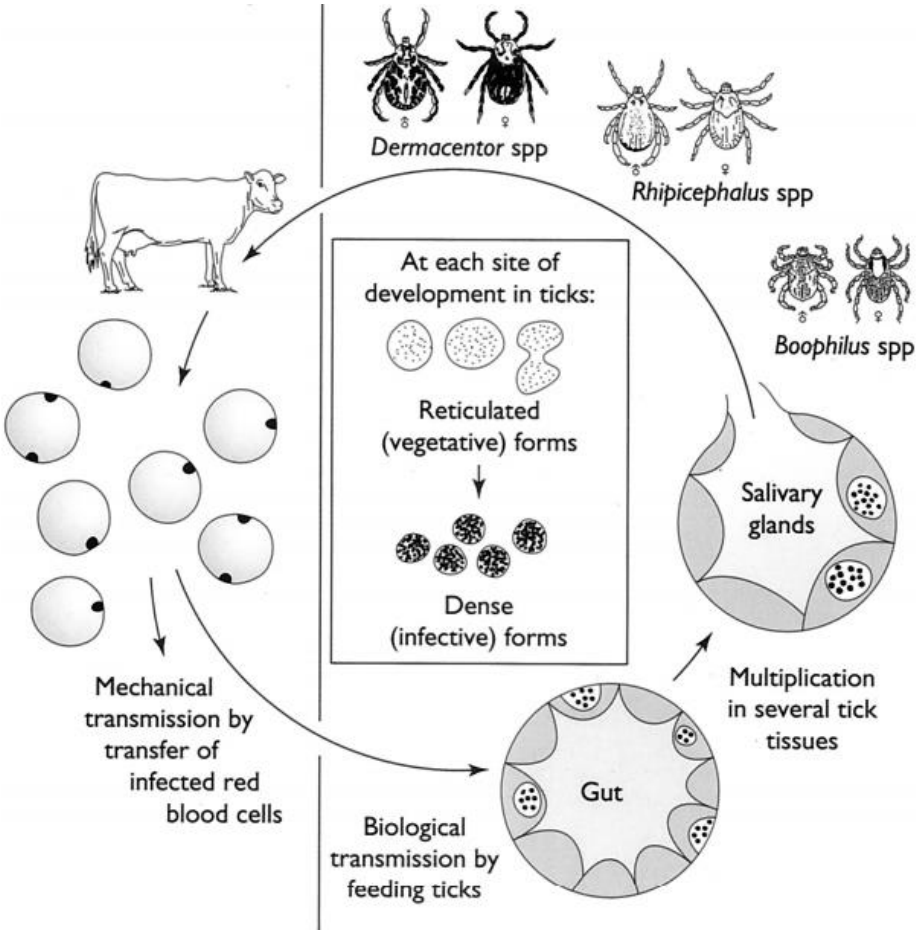

Figure 10 : Schéma du cycle de développement d'*Anaplasma marginale* chez les bovins (d'après Kocan *et al.*, 2003)

4.3. Données actuelles sur l'infection par *Anaplasma marginale* en Afrique du Nord

L'écosystème nord-africain offre une écologie favorable pour plusieurs espèces de tiques qui peuvent être des vecteurs potentiels de plusieurs pathogènes dont *A. marginale*. Plusieurs études ont été effectuées afin de détecter cette bactérie extrêmement pathogène chez les bovins et responsable de grandes pertes économiques. Des enquêtes transversales sur des bovins au Nord de la Tunisie effectuées par Belkahia et ses collaborateurs (2015a) et M'ghirbi et ses collaborateurs (2016) durant la période d'activité des tiques (printemps et été) ont mis en évidence la présence d'*A. marginale.* De même, différentes études effectuées en Algérie, au Maroc, en Egypte et au Soudan ont souligné la présence de cette bactérie chez les bovins étudiés (**Tableau III**).

Tableau III : Prévalence moléculaire d'*Anaplasma marginale* dans différents pays Nord-Africains

Pays	Nombre de bovins étudiés	Prévalence (%)	Technique utilisée	Gène cible	Référence
Tunisie	232	25,4	RT PCR	*msp1β*	Belkahia *et al*. (2015a)
	1035	4,7	PCR	*msp 4*	Belkahia *et al*. (2017)
	328	24,7	PCR	*msp 4*	M'ghirbi *et al*. (2016)
Algérie	180	11,1	PCR	*msp 4*	Rjeibi *et al*. (2017)
Maroc	668	21,9	nPCR	*msp 5*	Ait Hamou *et al*. (2012)
Egypte	164	20,1	PCR	*msp1β*	El-Ashker *et al*. (2015)
	309	68,3	qPCR	*msp1β*	Al Hosary *et al*. (2020)
Soudan	692	6,1	PCR	*msp 4*	Awad *et al*. (2011)

En Tunisie, *A. marginale* a été identifiée chez des bovins provenant de plusieurs zones bioclimatiques. Cependant, les bovins appartenant à l'étage bioclimatique sub-humide étaient les plus infectés (Belkahia *et al*., 2017). Cette différence est probablement due à l'effet des conditions bioclimatiques (température et humidité) sur la distribution et la diversité des arthropodes vecteurs (Ben Said *et al*., 2018a).

Les bovins les plus âgés étaient plus fortement exposés à l'infection, ceci peut être expliqué par l'exposition de ces derniers à plusieurs cycles d'infestation par les arthropodes vecteurs (Atif *et al*., 2013; M'ghirbi *et al*., 2016).

Des études menées en Tunisie et en Algérie ont montré que les bovins femelles étaient statistiquement plus infectés que les mâles. Ceci a été expliqué par l'immunosuppression des femelles pendant la gestation et la lactation, qui pourrait durer jusqu'à deux ans (Belkahia *et al*., 2015a; Rjeibi *et al*., 2017; Ben Said *et al*., 2018a). Une deuxième explication serait que les femelles sont conservées pour la reproduction donc demeurent plus longtemps dans les élevages que les mâles destinés à la boucherie, d'où une plus grande probabilité d'exposition aux vecteurs pour les femelles.

Belkahia et ses collaborateurs (2015a) ont montré que la race Holstein était moins infectée que d'autres races (Schwyz et croisée). M'ghirbi et ses collaborateurs (2016) ont

montré que la race Schwyz est la plus infectée alors que Rjeibi et ses collaborateurs (2017) ont démontré que la race la plus infectée en Algérie serait la race Montbéliarde.

5. Tableau clinique de l'anaplasmose bovine

Les bovins infectés par *A. marginale* peuvent développer la forme aiguë de la maladie ou devenir des porteurs asymptomatiques. La durée d'incubation est variable et peut aller de 7 à 60 jours avec une moyenne de 28 jours (Kocan *et al.*, 2010).

La forme aiguë de la maladie ($\geq 10^7$ bactéries/ ml de sang) se traduit par un syndrome fébrile (>40°C) avec de l'anorexie, de la léthargie, de l'abattement, de l'amaigrissement, une anémie sans hémoglobinurie associée à une dyspnée, une tachycardie (>120 battement/min), un jetage oculo-nasal, une hypotonie ruminale et des matières fécales contenant du sang en nature (El-Ashker *et al.*, 2015). Des signes nerveux sont également notés suite à l'anoxie cérébrale (**Figure 11**).

La production laitière chute de façon foudroyante, et les femelles gestantes peuvent avorter suite à l'anoxie fœtale (Guillemi *et al.*, 2015a; Curtis et Coetzee, 2021).

Dans des cas extrêmement graves, l'anémie peut se compliquer par un ictère hémolytique (Aubry et Geale, 2011).

Le taux de létalité est estimé à 70% en Inde, et 60% en Sénégal (Dahmani *et al.*, 2017, 2019). Les animaux qui survivent à l'infection aiguë développent une infection persistante caractérisée par une bactériémie cyclique (Coetzee *et al.*, 2007), et deviennent des non-valeur économique. En effet, les pertes économiques suite à l'anaplasmose bovine sont estimées à 57 millions de dollars par an en Inde, 300 millions de dollars par an aux États-Unis, et 800 millions de dollars en Amérique du Sud (Ait Lbacha *et al.*, 2015; Dahmani *et al.*, 2017).

Les animaux infectés restent porteurs durant toute leur vie et constituent un réservoir non négligeable pour la maladie (Kocan *et al.*, 2008; El-Radwan *et al.*, 2013).

Le diagnostic différentiel se pose avec la sous-alimentation, la strongylose gastro-intestinale, la fasciolose, la leptospirose, l'hémoglobinurie bacillaire, le charbon bactéridien, les intoxications par les crucifères, le lymphosarcome multicentrique et les différentes hémoparasitoses telles que la babésiose, la theilériose et la trypanosomose (**Tableau IV**) (Kocan *et al.*, 2008).

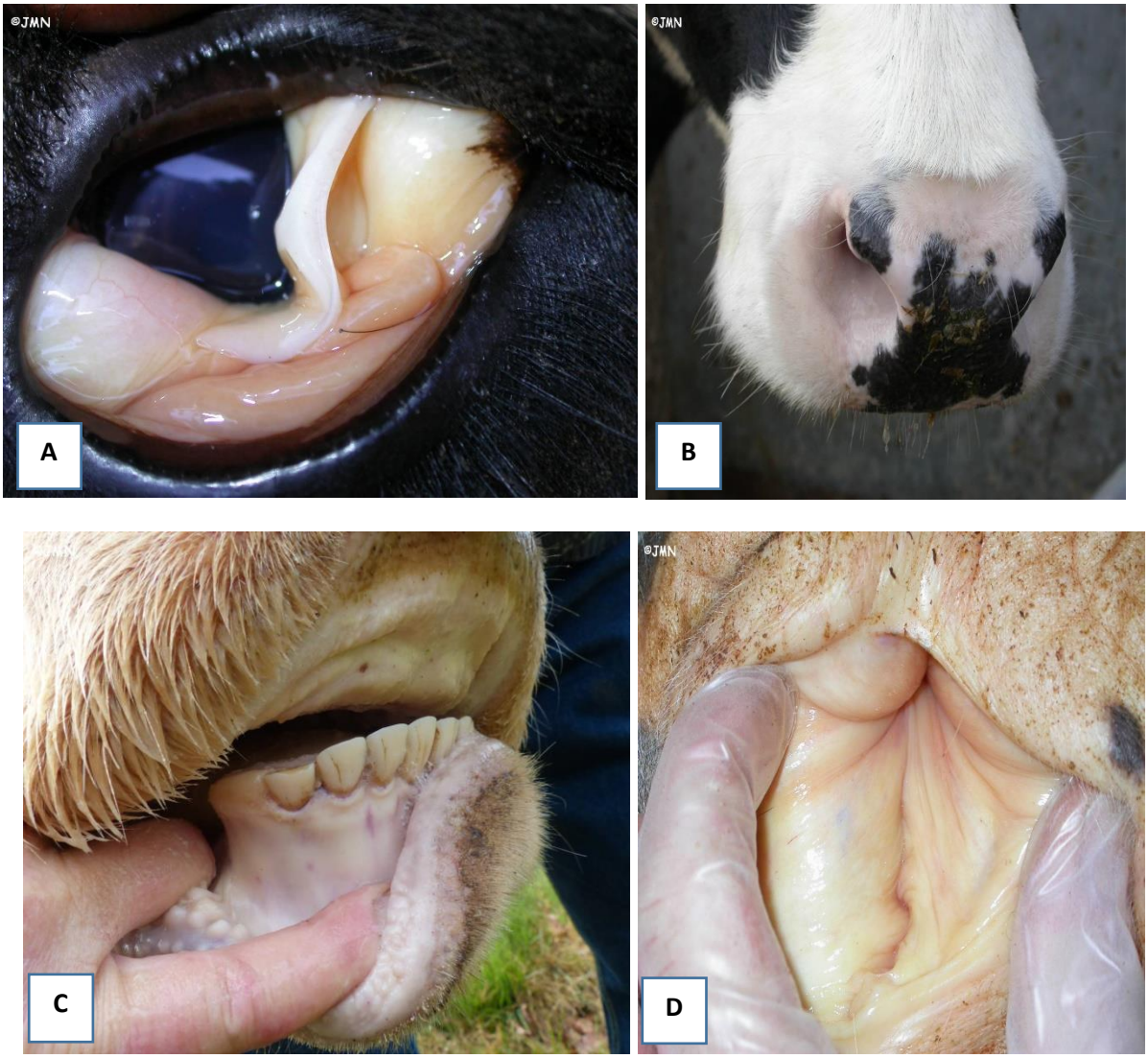

Figure 11 : Bovins atteints d'anaplasmose à *Anaplasma marginale*
(*Source* : Photothèque Dr Jean Marie Nicol)

A : Muqueuse oculaire pâle à sub-ictérique d'un bovin atteint d'anaplasmose.

B : Mufle pâle d'un bovin atteint d'anaplasmose.

C : Muqueuse buccale pâle d'un bovin atteint d'anaplasmose.

D : Muqueuse vulvaire pâle à sub-ictérique d'un bovin atteint d'anaplasmose.

Tableau IV : Diagnostic différentiel de l'anaplasmose avec les principales hémoparasitoses affectant les bovins

Symptômes	Anaplasmose	Babésiose	Theiléiriose	Trypanosomose
Fièvre	+++	+++++	++++++	++
Hypertrophie des nœuds lymphatiques	-	-	+++	-
Ictère	+/-	+++	+	-
Anémie	+++	+++	++	+
Jetage oculo-nasal	+	-	+++	-
Avortement	+	+	+++	-
Signes nerveux	+/-	+++	+	++
Pétéchies conjonctivales	-	-	+++	-
Larmoiement	-	-	+++	-
Hémoglobinurie	-	+++	-	-

A l'autopsie, le cadavre présente de l'amaigrissement, une anémie compliquée par un sub-ictère. La rate se trouve hypertrophiée ayant une consistance friable, la vésicule biliaire est distendue avec une bile épaisse. Des pétéchies sont aussi notées sur les séreuses (plèvre et péricarde) (Kocan *et al.*, 2008).

6. Méthodes de détection de l'espèce *A. marginale*

6.1. Détection directe de la bactérie sur un étalement de sang

Anaplasma marginale peut être mise en évidence lors de la réalisation d'un étalement de sang en couche mince sur une lame après coloration de Giemsa et observation microscopique par un microscope optique. Elle se présente sous forme d'inclusions rondes, denses, de couleur pourpre foncé de 0,3 à 1 µm de diamètre aux contours légèrement irréguliers (ce qui les différencient des corps de Howell-Jolly qui sont parfaitement ronds) accolées à la membrane interne des érythrocytes. C'est l'examen de laboratoire de choix lors de la forme aiguë de l'anaplasmose aiguë car plus de 70% des érythrocytes se trouvent infectés. Cependant, il ne constitue pas l'examen complémentaire de choix pour les animaux porteurs asymptomatiques et réservoirs de la bactérie d'où le recours aux moyens sérologiques et moléculaires (**Figure 12**) (Carelli *et al.*, 2007; El-Radwan *et al.*, 2013 ; Aktas et Özübek, 2017).

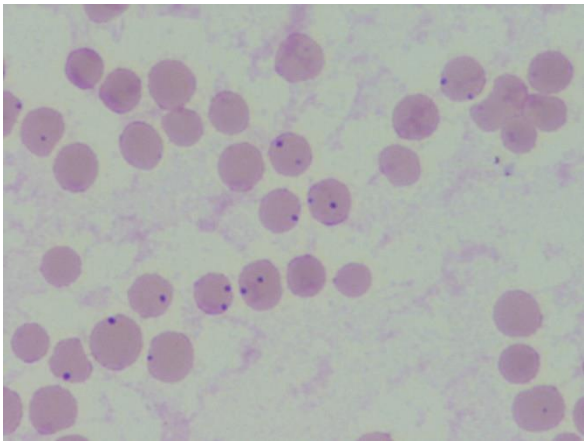

Figure 12 : Photographie d'une observation microscopique d'un étalement de sang de bovin infecté par *A. marginale* coloré au Giemsa (*Laboratoire de parasitologie de l'ENMV, Sidi Thabet*)

6.2. Méthodes de détection sérologique

Des méthodes de détection sérologique sont décrites dans le tableau ci-dessous et permettent la détection des anticorps dirigés contre *A. marginale* (**Tableau V**).

Tableau V : Méthodes de détection sérologique d'*A. marginale.*

Méthode	Description	Références
Méthode immuno-enzymatique : ELISA compétitive (c ELISA)	Le test ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) compétitive est le test le plus utilisé. Ce test permet la détection des Ac dirigés contre un épitope de la protéine MSP5 présente chez l'espèce *A. marginale.* L'Ag utilisé est un Ag recombinant synthétisé *in vitro* par des *E. coli* recombinants et appelé rMSP5. Ce test s'avère sensible (détection des Ac à partir de j9 post-infection) et spécifique (95%-100%).	Knowles *et al*. (1996) Torioni *et al*. (1998) Madruga *et al*. (2000) Araújo *et al*. (2005) Coetzee *et al*. (2007) Atif *et al*. (2013)
Méthode d'immunofluorescence indirecte (IFI)	L'IFI se base sur la propriété que possède un Ac de se lier spécifiquement à l'antigène qui a suscité sa production par le LB. Elle permet de définir la distribution tissulaire de cet Ag. Elle est sensible et spécifique mais compliquée à mettre en œuvre et peu utilisée.	Ekici et Sevinc (2011)
ELISA Sandwich double antigène (*Double Antigen ELISA Sandwich*)	Détection de faible taux d'Ac anti-rMSP5 d'*A. marginale* et d'*A. centrale*. Cette technique permet une détection rapide d'une séroconversion chez les bovins vaccinés avec *A. centrale*, par conséquent évaluer l'immunogénicité du vaccin. Déterminer l'état d'enzootie d'une étable vis-à-vis de l'anaplasmose.	Sarli *et al*. (2020)

LB : lymphocyte B ; Ac : anticorps ; Ag : antigène

6.3 Méthodes de détection moléculaire

Des techniques de détection moléculaire sont décrites dans le tableau **VI**.

Tableau VI : Méthodes de détection moléculaire d'*A. marginale*

Méthode	Description	Référence
PCR conventionnelle	Détection spécifique d'*Anaplasma marginale* en amplifiant une séquence du gène *msp4* (344pb) en utilisant des amorces spécifiques à cette espèce.	Tana-hernández *et al*. (2017)
PCR en temps réel (RT-PCR)	Quantification de la bactériémie en concevant une sonde et des amorces hautement spécifiques à *A. marginale*. Les amorces permettent d'amplifier une séquence de 95 pb du gène msp1$_\beta$ isolée à partir du génome d'*A. marginale*. C'est une méthode de plus en plus utilisée car elle est rapide, sensible, reproductible, mais elle reste tout de même plus couteuse.	Carelli *et al*. (2007) Shen et al. (2018) Al Hosary *et al*. (2020)
PCR nichée (nPCR)	Utilisation successivement de deux paires d'amorces différentes (la 1^{ére} détecte une séquence d'ADN d'*Anaplasma* spp. d'une taille de 458pb et la 2^{éme} amplifie une séquence d'une taille de 345 pb du gène *msp5* incluse dans le premier fragment. La deuxième paire d'amorces est spécifique à l'espèce *A. marginale*. La méthode est sensible et spécifique.	Molad *et al*. (2006)
PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism*)	Utilisation d'enzymes de restriction, comme la *Bst* 1107I sur le produit de PCR d'un fragment de l'ARNr 16S qui coupe spécifiquement le fragment d'*A. marginale*. La Bst 1107I ne reconnait que la séquence (GTATAC) dans le produit PCR correspondant à *A. marginale.*	Noaman et Shayan (2010). Aktas et çolak(2020)
PCR multiplexe (*multiplex* PCR)	Utilisation de plusieurs couples d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs cibles d'ADN bactériens à savoir celui d'*A. marginale* en une seule réaction de PCR**.**	Bilgiç *et al*. (2013)
LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification Method*)	L'amplification isotherme à médiation par boucle (LAMP) permet l'amplification à une seule température (65°C) et la détection de l'ADN cible de manière plus rapide et plus spécifique que les méthodes traditionnelles basées sur la PCR.	Giglioti *et al*. (2018)
RLB (*Reverse Line Blotting*)	Liaison de sondes spécifiques à l'espèce à la membrane Biodyne-C, dénaturation des produit PCR et hybridation avec les sondes, ensuite formation d'un complexe de Steptavidine-POD+biotine, et réalisation de l'émission lumineuse de ce complexe.	Soledad *et al*. (2017)

7. Outils de caractérisation moléculaire d'*A. marginale*

7.1. Typage par un locus unique

La caractérisation moléculaire d'*A. marginale* est basée sur la détermination et la comparaison des séquences nucléotidiques et d'acides aminés et sur l'analyse moléculaire et phylogénétique de divers loci.

Les gènes utilisés pour étudier la diversité génétique d'*A. marginale* sont :

- Le locus de l'ARNr 16S.
- L'opéron *groESL.*
- Les gènes codant des protéines majeures de surface (MSP) à savoir MSP 1 (msp 1 alpha et béta), MSP 2, MSP 3, MSP 4, et MSP 5.

Sur la base des marqueurs moléculaires utilisés, *A. marginale* peut se subdiviser en variants génétiques qui constituent des souches identifiées à l'intérieur de l'espèce bactérienne sans lien obligatoire avec les variations phénotypiques (de la Fuente *et al*., 2001b; Lew *et al*., 2002; Chakravorty *et al*., 2008).

7.1.1. Le locus de l'ARNr 16S

L'étude du gène *ARNr 16S* est devenue une méthode de base dans l'identification et le diagnostic des espèces bactériennes. Cependant, sa précision dans le génotypage, c'est-à-dire dans la détermination de variants au sein d'une espèce reste assez variable (Chakravorty *et al*., 2008). Ce gène code la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr). Il est fréquemment utilisé en raison de sa structure très conservée chez presque toutes les bactéries.

Le gène *ARNr 16S* des espèces du genre *Anaplasma*, possède une région hypervariable, sa séquence nucléotidique a été essentiellement utilisée pour la discrimination entre les différentes espèces du genre *Anaplasma* (Dumler *et al*., 2001).

7.1.2. L'opéron groESL

L'opéron *groESL* s'étend sur une région couvrant deux gènes codant pour des protéines du choc thermique GroES et GroEL (HSP) et un espace non codant. Les gènes *groEL* et *groES* sont des gènes de ménage indispensables à la survie des cellules bactériennes. En raison de leur répartition omniprésente, ces gènes sont considérés comme des marqueurs moléculaires précieux sur le plan phylogénétique.

Le locus *groEL* est une horloge moléculaire utile et un outil précieux pour les études phylogénétiques et il a été relativement plus discriminatif comparé au locus ARNr 16S (Ben Said *et al*., 2019).

7.1.3. Gènes codant pour les protéines majeures de surface (MSP)

L'interaction entre *A. marginale* et ses hôtes vertébrés et invertébrés se fait via les protéines majeures de surface (MSP). Il existe 6 sous classes de protéines MSP : MSP1 alpha, MSP 1 béta, MSP2, MSP3, MSP 4, et MSP 5 (Kocan *et al*., 2003). Les protéines MSP1 alpha, MSP4, MSP5, sont codées chacune par un gène unique, contrairement à MSP1 bêta, MSP2 et MSP3 qui sont codées par une famille multigénique.

La majeure partie des analyses phylogénétiques des souches d'*A. marginale* ont été réalisées à l'aide des séquences protéiques majeures de surface (MSP) (Estrada-Peña *et al*., 2009).

MSP1 est un complexe hétéromère, formé par des polypeptides MSP1 alpha et MSP1 béta, exclusivement présent chez l'espèce *A. marginale*. Le gène *msp1α* qui semble évoluer rapidement sous l'effet de la pression de sélection, a été utilisé par plusieurs chercheurs comme un marqueur phylogéographique. En effet, des études sur le gène *msp1α,* ont permis d'obtenir des regroupements par régions géographiques, mais des études suivantes à plus large échelle ont montré des variations au sein de la même région géographique. Récemment une approche différente a été utilisée afin d'acquérir des connaissances complètes sur l'évolution et la diversité génétique des souches d'*Anaplasma marginale,* basée sur l'analyse des séquences microsatellites du gène *msp1α* (de la Fuente *et al*., 2001a).

Estrada-Peña *et al*. (2009) ont montré dans une étude que la répartition phylogéographique des séquences du gène *msp1α* d'*Anaplasma marginale* est associée à des régions écologiques mondiales (écorégions) avec des enveloppes environnementales spécifiques et différentes entrainant différentes pressions évolutives. Ils ont avancé l'hypothèse que les facteurs environnementaux régulant les populations de tiques pourraient agir sur la sélection des différentes séquences *msp1α* d'*Anaplasma marginale* (**Figure 13**).

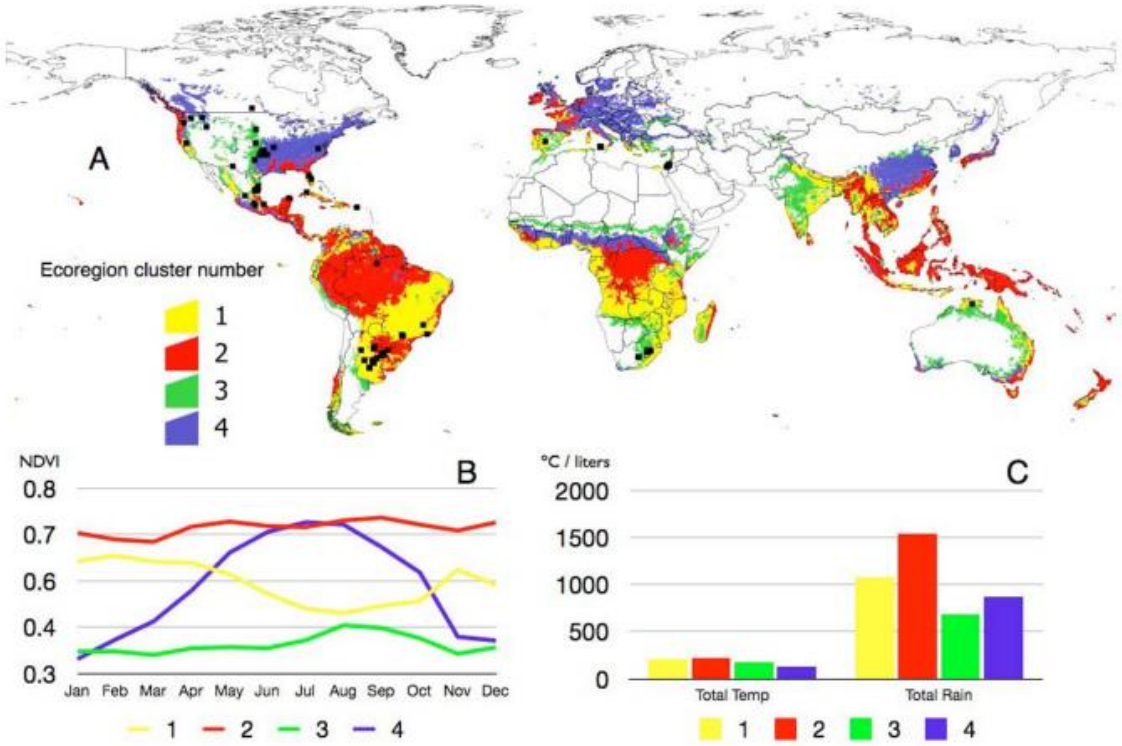

Figure 13 : Ecorégions mondiales. (A) Nombre des écorégions fournissant le plus d'informations, (B) Valeurs mensuelles de l'indice de végétation par différence normalisée (IVDN) des différentes écorégions, (C) Température et précipitations mensuelles enregistrées pour chaque écorégion (d'après Estrada-Peña *et al.*, 2009)

Une étude menée par Battilani et ses collaborateurs en 2017, a montré que la séquence partielle répétitive du gène *msp1a* n'a pas fourni d'informations phylogéographiques et les clades n'étaient pas conformes à l'origine géographique des souches d'*A. marginale* probablement en raison du degré élevé de variation des séquences dans les zones endémiques.

Il a été supposé que l'hétérogénéité génétique signalée chez les souches d'*A. marginale* pourrait être due à un niveau élevé d'évènements de transmission, ou de variation rapide du génotype *msp1a* d'*Anaplasma marginale* dans l'hôte bovin après la transmission par les tiques. En effet les interactions tiques-pathogènes pourraient influencer la présence des séquences répétitives du gène *msp1a,* dans des souches d'*A. marginale* provenant de régions géographiques particulières (Battilani *et al.*, 2017; Aktas et Ozubek, 2020).

La meilleure résolution phylogéographique a été fournie par des séquences du gène *msp4*.

Ce gène semble être un bon marqueur génétique, fournissant des informations phylogénétiques importantes sur l'évolution des différentes souches d'*A. marginale* à travers le monde. Il a été utilisé pour la caractérisation des souches d'*Anaplasma marginale* isolées chez les bovins en Tunisie (Belkahia et al., 2015a; M'ghirbi et al., 2016).

Belkhahia et ses collaborateurs (2015) ont décelé plusieurs nouvelles souches d'*Anaplasma marginale*, appartenant à différents clades de l'arbre phylogénétique conçu après l'alignement d'une séquence partielle du gène *msp4*.

Le gène *msp5* a été aussi utilisé comme outil de caractérisation moléculaire des souches d'*Anaplasma marginale,* surtout celles du nouveau monde (Kocan *et al*., 2003).

7.2. Typage par un schéma multi-loci (MLST)

La méthode MLST est basée sur l'amplification par PCR et le séquençage de plusieurs loci. Ces loci consistent généralement en sept gènes de ménage à savoir *dnaA*, *groEL*, *sucB*, *recA*, *secY*, *fts,* et *lipA*.

Pour un locus donné, chaque séquence nucléotidique correspond à un allèle. La combinaison d'allèles pour chaque locus permet l'obtention des séquences types (STs) de chaque souche d'*A. marginale* (Guillemi *et al*., 2015a, 2016).

MLST a été de plus en plus reconnu comme une méthode phylogénétique standard, étant donné que les gènes de ménage possèdent une horloge moléculaire lente et, par conséquent, leurs loci peuvent représenter d'excellents marqueurs phylogénétiques (Maiden, 2006).

Le premier schéma MLST pour l'espèce *A. marginale* a été développé pour la première fois en 2015 par Guillemi et ses collaborateurs sur 58 souches situées dans différentes régions du monde. Les sept gènes de ménage cités précédemment ont été amplifiés et séquencés, séparant les génotypes basés sur la diversité nucléotidique dans un fragment concaténé. Cependant, les auteurs n'ont pas réussi à trouver une association évidente entre les régions géographiques et les variants génétiques isolés à partir des différents isolats provenant de plusieurs régions du monde (Guillemi *et al*., 2015a).

Le schéma MLST d'*A. marginale* représente un outil précieux avec un pouvoir de discrimination élevé (Guillemi *et al*.,2015b). Ce même schéma a été appliqué par les mêmes auteurs à deux autres souches isolées pour la première fois à partir de deux espèces de ruminants sauvages à savoir le fourmilier géant *Myrmecophaga tridactyla* et le cerf andin *Hippocamelus antisensis* (Guillemi *et al*., 2016).

L'étude phylogénétique effectuée en 2018 par Ben Said et ses collaborateurs, a consisté à examiner tout d'abord chaque locus indépendamment selon la méthode d'analyse de locus unique, afin d'assurer l'analyse d'une grande quantité d'informations phylogénétiques individuelles pour chaque gène tout en tirant profit des caractéristiques des gènes de ménage utilisés initialement dans le schéma multi-loci. L'analyse phylogénétique des différents loci séparément a révélé que sur sept gènes analysés, deux gènes à savoir *lipA* et *sucB* ont été remarquablement plus intéressants sur le plan phylogéographique que les autres loci et ont permis la classification des séquences partielles et celles trouvées dans GenBank selon les continents. Les souches tunisiennes ont été affectées à quatre différents clades (Afrique, Amérique latine, Europe du Sud, et Amérique du nord) ce qui souligne la diversité exceptionnelle de ces dernières. De ce fait, la combinaison du résultat des caractéristiques de chaque locus unique avec celles du schéma multi-loci fournit une idée plus approfondie sur la diversité et l'évolution des souches d'*A. marginale* en Tunisie mais également dans le monde (Ben Said *et al.*, 2018b).

8. Traitement

Le traitement de choix de l'anaplasmose bovine est l'oxytétracycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines à bonne diffusion intracellulaire à la dose 20 mg/kg par la voie intramusculaire à raison de 3 injections espacées de 7 jours (J0-J7-J14) (Sarli *et al.*, 2021).

L'imidocarbe dipropionate a montré également son efficacité à la dose de 5mg/kg, à raison de 2 injections par la voie intramusculaire profonde, espacées de 14 jours (J0-J14) (Sarli *et al.*, 2021).

Une étude a montré que l'utilisation de l'enrofloxacine, une fluoroquinolone, à la dose de 12,5mg/kg par la voie sous cutanée à raison de deux injections espacées de 48 heures, sur des veaux splénectomisés infectés par *A. marginale* n'a pas donné de résultats, les veaux sont restés infectés et, suite à l'échec du traitement, ils ont été euthanasiés (Aubry et Geale, 2011).

Une transfusion sanguine serait fortement recommandée si l'anémie est très sévère et l'hématocrite est inférieur à 12%.

L'administration des précurseurs de l'érythropoïèse (les vitamines du groupe B telles que la vitamine B6, B9, et B12), du fer (fumarate ferreux à la dose de 0,4 g/kg/j pendant 4 à 5 jours, du cobalt, du cuivre, de la vitamine C (20-50 mg/kg/j), et de la vitamine E/sélénium (Vit E : 15-30 mg/10 kg/j en IM, Se : 0,5mg/10 kg/IM en une seule injection), ainsi que des hépatoprotecteurs (Sorbitol, Bétaine, Choline), des probiotiques et des prébiotiques, est recommandée.

9. Prophylaxie

9.1. Prophylaxie sanitaire

Les mesures prophylactiques consistent à éviter principalement l'apparition des cas cliniques en évitant l'introduction d'un animal porteur asymptomatique dans un troupeau naïf qui n'a pas rencontré la maladie auparavant. Pour cela, tout animal nouvellement acheté doit être mis en quarantaine pendant au minimum 15 jours, et un test sérologique (ELISA) ou moléculaire (PCR) est fortement recommandé (Kocan *et al.*, 2006).

Sur le plan vecteur, il est impératif de traiter les animaux et les locaux d'élevage par des acaricides et des insecticides surtout pendant la saison des arthropodes vecteurs (printemps et été). Cependant, l'utilisation abusive de ces substances chimiques rémanentes dans l'environnement peut nuire à l'environnement, avec la possibilité de créer des chimiorésistances (Gasquet, 2014).

9.2. Prophylaxie médicale

9.2.1. Chimioprophylaxie

La chimioprophylaxie consiste à administrer des antibiotiques à des animaux non atteints. L'administration de ces antibiotiques peut se faire par voie orale ou bien systémique. La contrainte majeure est l'apparition de résistances, ainsi que le coût du traitement (Kocan *et al.*, 2006).

9.2.2. La vaccination

La vaccination est un moyen économique et efficace pour contrôler l'anaplasmose dans le monde. Le premier essai vaccinal a eu lieu au début des années 1990, avec l'isolement d'*Anaplasma centrale,* une souche moins virulente qu'*A. marginale*, qui induit une réaction croisée avec les souches virulentes d'*A. marginale*. Par conséquent, elle est utilisée actuellement comme vaccin vivant en Australie, Israël, en Amérique du Sud, et plusieurs pays d'Afrique (Theiler, 1897; Sarli *et al.*, 2020).

Kocan et ses collaborateurs (2003) ont étudié l'histoire de l'utilisation des vaccins. Ces vaccins sont de deux types :

- Des vaccins vivants à base de sang infecté par *A. centrale*, qui permettent une immunité solide et durable contre des souches homologues et hétérologues d'*A. marginale* mais la protection ne concerne pas toutes les souches d'*A. marginale* circulantes sur le terrain.
- Des vaccins inactivés, basés sur l'utilisation de bactéries extraites des érythrocytes de bovins.

Les deux types de vaccin induisent une immunité protectrice qui réduit ou empêche la survenue de la maladie, mais n'empêche pas les infections persistantes chez les bovins réservoirs.

Les défis actuels sont d'une part, le développement de nouveaux vaccins à travers la compréhension de la réponse immunitaire de l'hôte et les changements qui surviennent après la vaccination et d'autre part l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre une multitude de souches variées circulantes sur le terrain, avec un seul vaccin.

Le séquençage complet du génome d'*A. marginale*, la protéomique et la vaccinologie inverse, ont identifié un certain nombre de protéines de membrane externe (OMP) qui pourrait servir de candidats vaccinaux (Brayton *et al.*, 2005; Hove *et al.*, 2020).

Les adhésines et les invasines sont des candidats vaccins particulièrement pertinents du fait que le blocage de l'adhésion et de l'invasion des cellules hôtes est mortel pour les agents pathogènes intracellulaires obligatoires.

MSP1*α* est une adhésine pour les érythrocytes des bovins et les cellules des tiques, alors que MSP1$_{\beta}$ est une adhésine uniquement pour les érythrocytes des bovins (de la Fuente *et al.*, 2001a).

Curtis *et al.* (2019) ont essayé de vacciner des bouvillons Holstein contre l'anaplasmose bovine en utilisant un implant sous cutané au niveau de l'oreille, qui permet une libération prolongée du vaccin dirigé contre la protéine de surface MSP1*α*.

Récemment, OmpA, annotée comme Am854 dans le génome d'*A. marginale*, a été identifiée comme une adhésine jouant un rôle essentiel dans la pénétration d'*A. marginale* dans les cellules de mammifères et de tiques. Par conséquent, cette protéine est considérée comme un vaccin hautement pertinent (Hebert *et al.*, 2017).

Hove et ses collaborateurs (2020) ont étudié cinq candidats vaccinaux potentiels pour les protéines majeures de la membrane externe (OMP), bien caractérisés dans des souches d'*A. marginale* des États-Unis. L'analyse des OMP recombinantes indique une forte conservation antigénique entre les souches sud-africaines et américaines. Cependant leur niveau de conservation dans d'autres pays doit être vérifié afin d'approuver leur utilisation dans un nouveau cocktail mondial de vaccin.

9.3. Recommandations relatives aux importations en provenance de pays considérés comme infectés par l'anaplasmose bovine selon l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) :

Les autorités vétérinaires des pays indemnes doivent exiger la présentation d'un certificat vétérinaire attestant que les bovins ne présentaient aucun signe clinique de l'anaplasmose, et qu'ils ont séjourné, depuis leur naissance, dans une zone réputée indemne d'anaplasmose bovine durant les deux dernières années, et qu'ils ont été soumis à un traitement acaricide, et si nécessaire, à un traitement répulsif contre les insectes piqueurs avant leur chargement et qu'ils sont totalement exempts de tiques.

10. Perspectives

Les maladies transmises par les tiques peuvent être difficiles à contrôler en raison de leur épidémiologie complexe qui peut impliquer différents vecteurs et hôtes.

En effet, les tiques constituent une menace pour la santé humaine et animale dans le monde. Elles sont considérées comme deuxième vecteur de maladies humaines et animales dans le monde après les moustiques (de la Fuente et Merino, 2013).

Les vaccins contre les tiques sont rentables et constituent une alternative écologique pour se protéger contre les maladies transmises par les tiques grâce au contrôle des infestations par conséquent la diminution du taux d'infection (de la Fuente et Merino, 2013).

Le développement de vaccins contre les maladies transmises par les tiques sera grandement amélioré par les approches vaccinomiques à partir de l'étude des interactions moléculaires tique-hôte-pathogène (de la Fuente et Merino, 2013).

La découverte de nouveaux antigènes vaccinaux candidats pour le contrôle des infestations de tiques, l'infection et la transmission de pathogènes nécessite le développement de plateformes de dépistage efficaces et des algorithmes qui permettent l'analyse et la validation des données produites. Ces vaccins peuvent être utilisés pour vacciner les populations humaines et animales en péril et les espèces réservoirs pour réduire l'exposition de l'hôte aux tiques tout en réduisant le nombre de tiques infectées et leur capacité vectorielle pour les agents pathogènes qui affectent l'homme et la santé animale dans le monde (de la Fuente et Merino, 2013).

Les vétérinaires et les médecins ont longtemps traité les maladies à transmission vectorielle dans leur routine quotidienne, suivant des voies parallèles, mais souvent non convergentes. Il est maintenant clair qu'une approche intégrative est nécessaire pour le contrôle de ces maladies particulièrement les zoonoses. Il est nécessaire d'unifier les branches

animale et humaine de la médecine « *One Health* » pour une meilleure gestion de ce groupe important de maladies (Dantas-torres *et al*., 2012).

Obsomer *et al*. (2013) ont mis l'accent sur l'importance et la nécessité de concevoir des politiques de santé publique visant à intégrer spatialement les principales composantes du cycle écologique des maladies transmises par les tiques.

Conclusion

L'anaplasmose bovine, causée par *A. marginale,* est enzootique en Afrique, et entraine des pertes économiques considérables pour l'industrie bovine.

Le dépistage de l'anaplasmose bovine a augmenté sensiblement dans le monde entier, particulièrement en Tunisie ou différentes enquêtes ont été menées chez les bovins. Cependant ces enquêtes étaient principalement axées sur les bovins au Nord de la Tunisie.

Par conséquent il est proposé d'étudier, dans la partie expérimentale de la présente étude, la prévalence moléculaire d'*A. marginale* chez les bovins couvrant plusieurs zones géographiques et bioclimatiques s'étendant du nord au sud de la Tunisie, d'évaluer les facteurs de risque potentiels, et de caractériser les souches tunisiennes d'*A. marginale* en utilisant deux marqueurs phylogéographiques pertinents, *lipA* et *sucB.*

PARTIE EXPERIMENTALE

I. OBJECTIFS

Les objectifs de la présente étude sont d'estimer la prévalence moléculaire de l'infection à *A. marginale*, d'évaluer les facteurs de risque potentiels associés chez des bovins répartis dans onze gouvernorats de la Tunisie et huit zones bioclimatiques, et de caractériser les souches tunisiennes d'*A. marginale* en utilisant deux marqueurs phylogéographiques pertinents à savoir *lipA* et *sucB*, et ce afin de contribuer à la lutte contre l'anaplasmose bovine qui ne doit plus être négligée dans notre pays.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Hôtes et régions d'étude

Notre étude a intéressé des bovins issus de 21 délégations appartenant à 11 gouvernorats de la Tunisie à savoir le gouvernorat de Bizerte, de l'Ariana, de la Manouba, de Béja, de Jendouba, de Siliana, de Kairouan, de Kasserine, de Zaghouan, de Sousse et de Gabès, qui appartiennent à différents étages bioclimatiques (subhumide, humide supérieur et inférieur, semi-aride supérieur, moyen, et inférieur, et aride supérieur et inférieur) (**Figure 14**).

Les 89 élevages étudiés sont de petits élevages d'une vingtaine de têtes en moyenne, munis de locaux de stabulation traditionnels mal entretenus.

La plupart des bovins prélevés ont présenté des antécédents de theiléiriose, babésiose, de mammites et d'indigestion. Le traitement acaricide n'est pas rigoureux et la majorité des bovins était infestée par des tiques au niveau de la région mammaire et la face interne des oreilles. Ces élevages ont été sélectionnés de façon aléatoire.

Ce travail a été mené sur 545 échantillons de sang de bovins asymptomatiques. La répartition des bovins prélevés en fonction des zones bioclimatiques, des gouvernorats et des délégations est présentée dans les **Tableaux VII** et **VIII**.

L'échantillonnage a été effectué durant l'été (de juin à août 2020) sauf pour le gouvernorat de Gabès qui a été visité en décembre. Les bovins testés avaient un âge compris entre 6 mois et 15 ans, et la majorité était de race laitière Frisonne Pie Noire (**Tableau VII**).

Tableau VII : Répartition des bovins selon les zones bioclimatiques et des facteurs de risque liés aux bovins

Facteurs de risque	Nombre
Zone bioclimatique	
Subhumide	99
Humide supérieur	59
Humide inférieur	35
Semi-aride supérieur	141
Semi-aride moyen	77
Semi-aride inférieur	33
Aride supérieur	54
Aride inférieur	47
Genre	
Mâle	95
Femelle	450
Age	
≤ 2ans	183
> 2ans ≤ 5ans	162
> 5ans	200
Race	
Holstein	64
Brown Swiss	71
Montbéliarde	8
Tarentaise	8
Croisée	92
Locale	14
Charolaise	1
Frisonne Pie Noire	287
Infestation par les tiques	
Infesté	228
Non infesté	317
Total	545

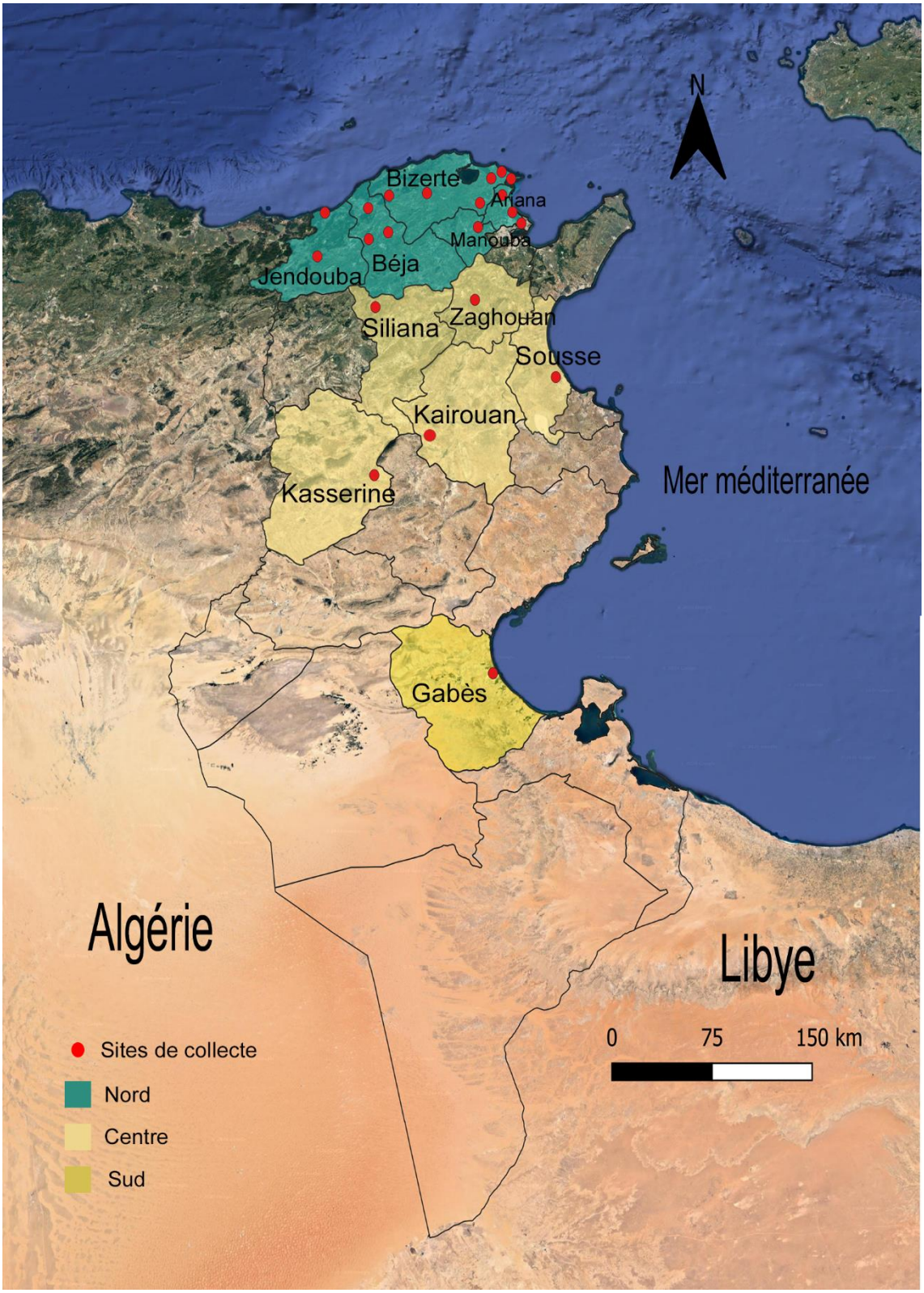

Figure 14 : Carte de la Tunisie montrant les sites d'échantillonnage de la présente étude

Tableau VIII : Répartition des bovins en fonction des gouvernorats et des délégations

Gouvernorat	Délégation	Nombre de bovins
Bizerte	Utique	50
	Ras Jbel	7
	El Alia	7
	Ghar El Melh	16
	Sejnane	1
	Ghzela	36
	Total	117
Ariana	Kalâat el Andalous	2
	Raoued	38
	La Soukra	1
	Total	41
Manouba	Jedaida	50
Béja	Amdoun	25
	Béja Nord	7
	Nefza	32
	Total	64
Jendouba	Fernana	35
	Tabarka	27
	Total	62
Siliana	El Krib	35
Kairouan	El Alaa	30
Kasserine	Sbeitla	24
Zaghouan	El Fahs	42
Sousse	El Kalaa El Kbira	33
Gabés	Gabés Médina	47
Total		545

2. Prélèvement du sang total, extraction et analyse des ADN génomiques

2.1. Prélèvement de sang total

Les prélèvements de sang total ont été réalisés sur 545 bovins. Le sang est collecté à partir de la veine jugulaire des bovins, dans des tubes à anticoagulant (EDTA) et placé dans des glacières garnies de plaques réfrigérantes jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Les échantillons de sang sont aliquotés dans des tubes Eppendorf et stockés à -20°C jusqu'à la réalisation de l'extraction des ADN génomiques (**Figure 15**).

Figure 15 : Prélèvement de sang sur tube EDTA chez un bovin

2.2. Extraction de l'ADN génomique

2.2.1. Principe

L'ADN génomique a été extrait à partir d'un volume de 300 µl de sang total pour chaque échantillon en utilisant le Kit « *Wizard® genomic DNA Purification system* » (Promega, USA).

L'extraction de l'ADN à partir du sang passe par les principales étapes suivantes :

- L'élimination des globules rouges et de toutes les impuretés du milieu extracellulaire.

- La lyse des globules blancs et précipitations des protéines.

- La précipitation et le lavage de l'ADN.

- L'élution de l'ADN génomique.

2.2.2. Protocole

Le tube de sang à anticoagulant (EDTA) est mélangé soigneusement, puis un volume de 300 µl est transféré dans un tube contenant 900 µl de la solution de lyse des cellules appelée *« Cell Lysis Solution »*.

Cette solution est hypotonique et elle ne permet l'éclatement que des globules rouges (les globules blancs sont beaucoup plus résistants).

Ensuite, le tube est incubé 10 minutes à température ambiante en le renversant 3 à 4 fois puis centrifugé pendant une minute à 16000 g. Le maximum de surnageant est éliminé en laissant 10 à 20 µl de la solution de lyse des cellules sans toucher le culot blanc au fond du tube. Ces étapes précédentes ont été répétées jusqu'à l'obtention d'un culot blanc visible.

Afin de resuspendre les cellules blanches dans le volume résiduel de la solution de lyse des cellules, le culot est légèrement mélangé pendant 10 à 15 secondes.

Dans le but de lyser les globules blancs, l'ajout d'un volume de 300 µl d'une solution de lyse de noyau appelée « *Nuclei Lysis solution* » est effectué. Cette solution va permettre la déstabilisation de la membrane des globules blancs et le noyau. Le mélange est pipeté 5 à 6 fois pour la lyse des cellules.

Afin de dégrader l'ARN, un volume de 1,5 µl d'ARNase est additionné au mélange et le tube est inversé 2 à 5 fois. La solution est incubée pendant 15 minutes à l'étuve à 37°C, puis équilibrée à température ambiante.

Ensuite, afin de précipiter les protéines, un volume de 100µl d'une solution de précipitation de protéines appelée « *Proteine Precipitation Solution* » est ajouté. La solution est mélangée pendant 10 à 20 secondes.

Une centrifugation à 16 000 g pendant 3 minutes est effectuée. La précipitation des protéines se fait sous forme d'un culot sombre.

Dans un but de séparer l'ADN du reste du lysat, le surnageant est transféré dans un tube contenant 300 µl d'isopropanol à température ambiante. Un faible volume est laissé au contact du culot pour éviter une possible contamination par les protéines.

Les filaments d'ADN sont visibles après inversion des tubes 2 à 5 fois. Ensuite, une centrifugation à 16000 g est effectuée pendant une minute et le surnageant est rejeté.

Afin de laver l'ADN, un volume de 300 µl d'éthanol 70% est ajouté, le tube est inversé délicatement plusieurs fois, puis centrifuger à 16 000 g pendant une minute.

A l'aide d'une pipette Pasteur, l'éthanol est aspiré soigneusement et le tube est inversé sur un papier filtre pendant 10 à 15 minutes.

Finalement, l'ADN est réhydraté en ajoutant un volume de 100 µl d'une solution de réhydratation appelée « *Rehydratation Solution* » et incubé pendant une nuit à +4°C.

L'ADN est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.3. Analyse de l'ADN génomique par électrophorèse

2.3.1. Principe

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation des fragments d'ADN (déposé sur un gel d'agarose) selon leur taille sous l'action d'un champ électrique.

Etant donné que l'ADN est chargé négativement à cause des groupements phosphate triacide qui cèdent un proton H^+, l'ADN migre du pôle négatif au pôle positif. La vitesse de migration est inversement proportionnelle à la taille des fragments d'ADN.

Bien que cette analyse soit principalement qualitative, l'intensité de la bande d'ADN permet d'avoir une idée sur la qualité de l'extraction et du matériel biologique de départ.

2.3.2. Protocole

La migration de l'ADN est effectuée sur un gel d'agarose à 1% (soit 1,15 g d'agarose dans 115 ml de tampon Tris Borate EDTA 1 x (TBE)).

Le mélange (agarose et TBE) est chauffé au four à micro-ondes jusqu'à ce qu'il devienne parfaitement translucide.

Par la suite, il faut ajouter un agent intercalant de l'ADN qui donne une fluorescence une fois exposé aux rayons ultraviolets, qui est le bromure d'éthidium (BET) (Sigma), à une concentration finale de 1 ng/ml (5%) soit 5,75 µl de BET pour un gel de 115 ml.

Le gel est versé dans un moule garni d'un peigne d'épaisseur convenable, qui est retiré après solidification de ce dernier.

Le gel pourvu de puits est ensuite placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration (TBE) 1x. Dans chaque puits, 5 µl d'ADN réhydraté sont déposés avec l'ajout de bleu de bromophénol (Promega) concentré (5x) comme tampon de charge qui permet à l'ADN de couler au fond des puits.

Le premier puits est rempli par le marqueur de taille (1 kb) additionné de bleu de bromophénol (Promega) concentré 5x comme tampon de charge. Dans les puits suivants, les ADN des échantillons étudiés sont déposés.

La migration est effectuée sous une différence de potentiel de 10 volts/cm de gel (1 h-1 h 30), les fragments d'ADN sont visualisés grâce à l'effet intercalant du bromure d'éthidium et sa fluorescence sous UV.

2.4. Détection des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*

2.4.1. Principe

La réaction de polymérisation en chaine (PCR) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier une séquence d'ADN donnée (pour obtenir plusieurs copies) à partir d'une faible quantité d'acide nucléique (l'ADN matrice) et d'amorces spécifiques formées d'oligonucléotides de synthèse.

Afin de détecter toutes les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*, une PCR ciblant un fragment du gène *ARNr 16S* a été réalisée à partir des échantillons de sang de bovins. Le fragment recherché a une taille égale à 345 pb (**Tableau IX**).

La réaction débute par la dénaturation des deux brins d'ADN génomique. Ensuite les amorces se positionnent de part et d'autre de la séquence cible. Sous l'action de l'ADN polymérase, chaque amorce est polymérisée dans le sens 5' → 3' permettant la synthèse du deuxième brin d'ADNg et l'amplification de la séquence cible. Cette réaction est réalisée dans un thermocycleur automatique (Thermocycleur 2720 de Thermo Scientific) selon un programme prédéfini présenté dans le **Tableau XII**.

Tableau IX : Amorces utilisées dans la détection des espèces de la famille des *Anaplasmataceae*

Essai (cible)	Amorce	Séquence (5'- 3')	Gène cible	Taille (pb)	Référence
PCR (Anaplasmataceae)	EHR16S D EHR16S R	GGTACCYACAGAAGAAGTCC TAGCACTCATCGTTTACAGC	ARNr16S	345	(Parola *et al.*, 2000)

2.4.2. Protocole

La réaction de polymérisation en chaine (PCR) a été effectuée dans un volume de 25 µl par tube contenant les réactifs indiqués dans le **Tableau X**.

Tableau X : Réactifs mélangés dans chaque tube pour la PCR amplifiant un fragment du gène ARNr 16S

Réactifs	Concentration par tube	Volume par tube
Tampon Taq (10x)	1x	2,5 µl
dNTP (10 mM pour chaque dNTP)	0,2 mM	0,5 µl
Taq DNA Polymerase (5 UI/µl)	0,05 U/µl	0,25 µl
MgCl2 (25 Mm)	3 mM	1,875 µl
Amorce directe (10 µM)	0,5 µM	1,25 µl
Amorce inverse (10 µM)	0,5 µM	1,25 µl
Echantillon d'ADNg à étudier ou témoin (+) d'ADN	-	2 µl
Eau exempte de nucléase q.s.p. 25 µl	-	15,375

Un mélange de 23 µl de tous les réactifs mentionnés dans le tableau **X** sauf un volume de 2 µl d'ADNg des échantillons de sang de bovins et un volume équivalent d'ADN du témoin positif et d'eau dépourvue de nucléase du témoin négatif, a été préparé. Les réactifs restants sont ensuite ajoutés au mélange selon les volumes indiqués ci-dessous (**Tableau XI**).

Tableau XI : Calcul des volumes des réactifs restants ajoutés à la réaction

	Volume d'ADNg par tube en µl	Volume d'eau exempte de nucléase
Echantillon analysé	2	0
Témoin positif	2	0
Témoin négatif	-	2

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur réglé sur un programme d'amplification (**Tableau XII**) afin d'amplifier le fragment du gène *ARNr 16S* qui cible toutes les espèces de la famille des *Anaplasmataceae.* Les produits de la PCR sont finalement stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Tableau XII : Programme d'amplification permettant la détection des espèces appartenant à la famille des *Anaplasmataceae*

Gène étudié (Référence)	Cycle	Température et temps d'incubation	Description
ARNr16S (Parola et al., 2000)	Première étape	94°C /5min	Dénaturation initiale des deux brins d'ADNg
	30 cycles	94°C / 30 sec	Dénaturation
		62°C / 30 sec	Hybridation des amorces
		72°C / 1,5 min	Elongation
	Dernière étape	72°C / 5 min	Elongation finale
	Période	4°C	Entretien

3. Détection spécifique d'*Anaplasma marginale*

3.1. Principe

La détection spécifique d'*A. marginale* est effectuée sur les échantillons de sang positifs aux bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*, par une PCR simple amplifiant une portion de 344 pb du gène *msp4* (**Tableau XIII**).

Tableau XIII : Amorces utilisées pour la détection de l'espèce *A. marginale*

Essai (cible)	Amorce	Séquence (5'- 3')	Gène cible	Taille (pb)	Référence
PCR (*A. marginale*)	Amargmsp4 F Amargmsp4 R	CTGAAGGGGGAGTAATGGG GGTAATAGCTGCCAGAGATTCC	*msp4*	344	(Torina *et al.*, 2012)

3.2. Protocole

La réaction de la PCR a été effectuée dans un volume de 25 µl par tube contenant les mêmes réactifs que ceux indiqués précédemment dans la détection des *Anaplasmataceae*. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur réglé selon le programme d'amplification prédéfini indiqué dans le tableau **XIV** afin d'amplifier la séquence cible.

Tableau XIV : Programme d'amplification permettant la détection de l'espèce *A. marginale*

Gène étudié (Référence)	Cycle	Température et temps d'incubation	Description
msp4 (Torina *et al.*, 2012)	Première étape	95°C /1min	Dénaturation initiale des deux brins d'ADNg
	30 cycles	95°C / 30 sec	Dénaturation
		60°C / 15sec	Hybridation des amorces
		72°C / 30sec	Elongation
	Dernière étape	72°C / 10 min	Elongation finale
	Période	4°C	Entretien

4. Caractérisation moléculaire d'*A. marginale*

4.1. Principe

Après l'identification spécifique d'*A. marginale*, des amplifications spécifiques sont effectuées sur les échantillons positifs à *A. marginale* ciblant un fragment du gène *lipA* et le gène *sucB* qui se sont révélés très intéressants sur le plan phylogéographique (**Tableau XV**). En effet, le gène *lipA* a permis une bonne différenciation des souches provenant de l'Afrique, l'Amérique latine, l'Amérique du nord et du sud de l'Europe (Ben Said *et al.*, 2018b) ; quant au gène *sucB*, il a montré un pouvoir discriminatoire élevé entre les différentes souches en fonction de leur localisation géographique et a permis de les classer selon le nouveau et l'ancien monde (Ben Said *et al.*, 2018b).

Tableau XV : Gènes et amorces utilisés dans la caractérisation phylogéographique des isolats tunisiens révélés d'*A. marginale*

Gène	Amorce	Séquence 5' à 3'	Protéine produite	Référence	Taille de l'amplifiat (pb)
lipA	lipAF	TGTGGATAGGGACGACCTTC	Lipoyle synthase	Guillemi *et al.* (2015a)	538
	lipAR	AAAGTCATCCTCAGCGTGGT			
sucB	sucBF	GAGATAGCATCTCCGGTTGC	Composant acétyltransférase dihydrolipoamide	Guillemi *et al.* (2015a)	808
	sucBR	CTCCCCTGGCCTTTTTACTC			

4.2. Protocole

La réaction de la PCR a été effectuée dans un volume de 50 µl par tube contenant les mêmes réactifs indiqués dans le tableau **XVI** avec des modifications des concentrations et des volumes utilisés.

Pour ce faire, un mélange de 48 µl de tous les composants sauf un volume d'ADN génomique des échantillons et du témoin positif et un volume d'eau dépourvue de nucléase du témoin négatif a été préparé. Les réactifs restants sont ensuite rajoutés au mélange selon les volumes indiqués ci-dessous (**Tableaux XVI et XVII**).

Tableau XVI : Réactifs mélangés dans chaque tube pour les PCRs amplifiant les fragments des gènes *lipA* et *sucB*

Réactifs	Concentration par tube	Volume par tube
Tampon Taq (10x)	1x	5 µl
dNTP (10 mM pour chaque dNTP)	0,2 mM	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 UI/µl)	0,05 U/µl	0,5 µl
MgCl2 (25 Mm)	3 mM	3,75 µl
Amorce directe (10 µM)	0,5 µM	2,5 µl
Amorce inverse (10 µM)	0,5 µM	2,5 µl
Echantillon d'ADNg à étudier ou témoin (+) d'ADN	-	2 µl
Eau exempte de nucléase q.s.p. 50 µl	-	32,75 µl

Tableau XVII : Calcul des volumes de réactifs restants ajoutés à la réaction d'amplification des fragments des gènes *lipA* et *sucB*

Essai	Echantillon ou témoin	Volume d'ADNg par tube en µl	Volume d'eau exempte de nucléase en µl qsp 50 µl
PCR simple	Echantillon analysé	2	32,75
	Témoin positif	2	32,75
	Témoin négatif	-	34,75

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur réglé sur un programme prédéfini d'amplification des séquences cibles, indiqué dans le tableau **XVIII**.

Tableau XVIII : Programme d'amplification permettant l'obtention des amplifiats des fragments de gènes *lipA* et *sucB* isolés à partir de l'espèce *A. marginale*

Gène étudié (Référence)	Cycle	Température et temps d'incubation	Description
lipA Guillemi *et al.* (2015a)	Première étape	94°C /1 min	Dénaturation initiale des deux brins d'ADNg
	30 cycles	94°C / 30 sec	Dénaturation
		60°C / 30 sec	Hybridation des amorces
		72°C / 30 sec	Elongation
	Dernière étape	72°C / 7 min	Elongation finale
	Période	4°C	Entretien
sucB Guillemi *et al.* (2015a)	Première étape	94°C /3 min	Dénaturation initiale des deux brins d'ADNg
	35 cycles	95°C / 30 sec	Dénaturation
		60°C / 30 sec	Hybridation des amorces
		72°C / 45 sec	Elongation
	Dernière étape	72°C / 10 min	Elongation finale
	Période	4°C	Entretien

Les produits des PCRs sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

5. Purification et séquençage automatique des produits de PCR sélectionnés

Les produits de la PCR sélectionnés pour la caractérisation (9 pour *LipA* et 5 pour *sucB*) ont été purifiés sur colonne et séquencés dans les deux sens, en utilisant les mêmes amorces des réactions PCRs amplifiant les fragments des gènes *lipA* et *sucB* à partir des isolats révélés d'*A. marginale* (**Tableau XV**). Le séquençage a été réalisé en utilisant un kit conventionnel de séquençage appelé « *Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction* » (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA), et un séquenceur d'ADN qui est automatisé « ABI3730XL » (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA).

6. Analyses statistiques et étude bio-informatique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test χ2 à l'aide du logiciel Epi Info 6 dans le but de comparer la prévalence d'infection par les *Anaplasmataceae* et l'espèce *A. marginale* chez les bovins étudiés en fonction des gouvernorats, des délégations, des étages bioclimatiques, de la race, du sexe, de l'âge et de l'infestation par les tiques. Pour chaque taux

de prévalence (Formule : (nombre de bovins infectés / nombre total de bovins) x 100), l'intervalle de confiance à 95% a été calculé. Une différence est considérée statistiquement significative lorsque la valeur de P est inférieure ou égale à 0,05.

L'obtention des séquences partielles nucléotidiques et d'acides aminés des gènes *lipA* et *sucB* amplifiés à partir des isolats d'*A. marginale* a été réalisée en utilisant les logiciels Chromas et DNAMAN (Version 5.2.2, Lynnon Biosoft, Que., Canada).

L'analyse « BLAST » (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) a été utilisée afin d'identifier les séquences génétiquement proches et précédemment soumises dans GenBank et de les comparer avec celles trouvées dans notre étude.

Deux arbres phylogénétiques montrés dans **les Figures 21** et **23** ont été dressés selon la méthode '*Neighbor-Joining*' en utilisant le logiciel DNAMAN (Version 5.2.2 ; Lynnon Biosoft., Que., Canada). La robustesse des nœuds a été analysée sur 1000 itérations.

III. RESULTATS

1. Contrôle qualitatif et quantitatif des ADN génomiques

Pour tous les échantillons étudiés, l'ADN génomique a été extrait à partir du sang. Une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% a été faite afin d'évaluer la qualité de l'extraction de l'ADN génomique. Bien que cette analyse soit principalement qualitative, l'intensité de la bande d'ADNg a permis d'avoir une idée sur la quantité d'ADNg extrait (**Figure 16**).

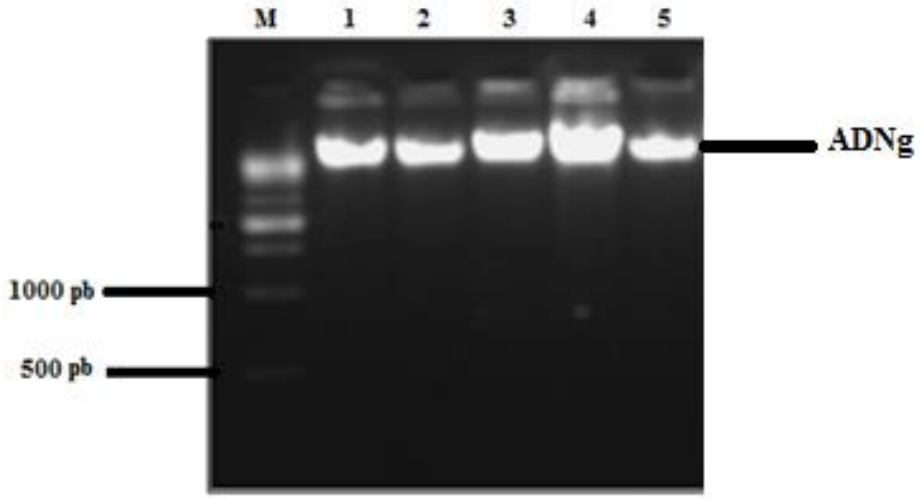

Figure 16 : Gel d'agarose à 0,8% montrant l'ADNg extrait.

Le premier puits est pourvu du marqueur de taille 1 kb.

Les puits 1 à 5 sont pourvus de l'ADNg extrait.

2. Détection moléculaire des *Anaplasmataceae* et d'*A. marginale*

2.1. Obtention des amplifiats

2.1.1. Détection moléculaire des *Anaplasmataceae*

L'amplification d'une séquence partielle du gène *ARN 16S* possédant une taille de 345 pb a permis d'effectuer une première sélection des échantillons positifs à toutes les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* (**Figure 17**).

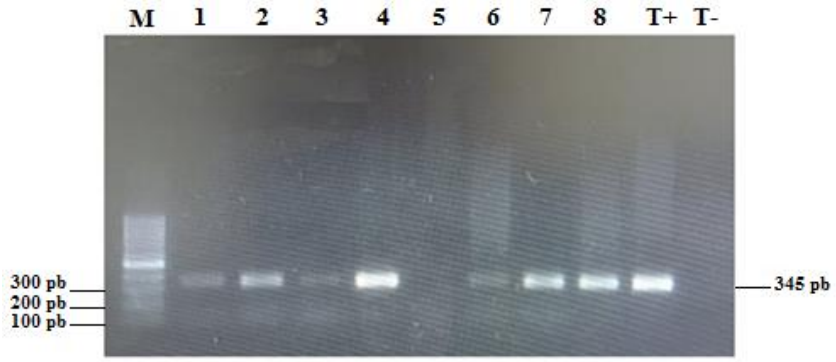

Figure 17 : Photographie de gel visualisant les produits de la PCR sur des échantillons de sang révélant une séquence partielle du gène *ARNr 16S* spécifique à toutes les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*

Note : Le premier puits contient le marqueur de taille 100pb. Les puits 1-4 et 7-9 contiennent des produits PCR d'échantillons positifs aux bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*. Le puits 5 contient un échantillon négatif aux bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*. L'avant dernier et le dernier puits contiennent, respectivement, un témoin positif et un témoin négatif de la réaction de PCR.

2.1.2. Détection moléculaire d'*A. marginale*

Les ADNg des échantillons positifs aux bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* ont été soumis à une deuxième PCR afin de détecter spécifiquement l'espèce *A. marginale* basée sur l'amplification d'une séquence partielle du gène *msp4* possédant une taille de 344 pb (**Figure 18**).

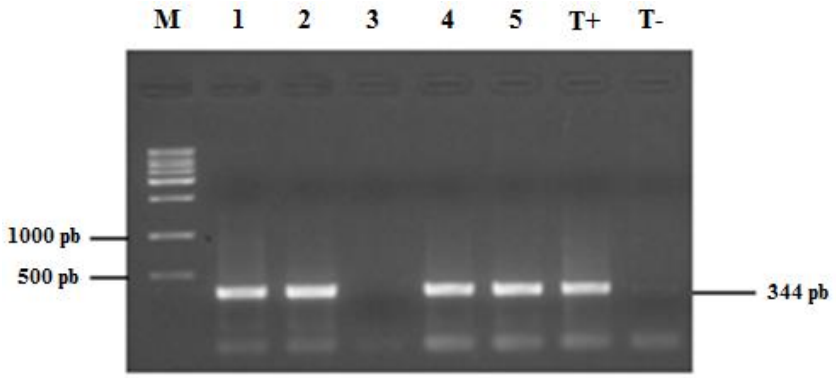

Figure 18 : Photographie de gel visualisant les produits de la PCR sur des échantillons de sang révélant une séquence partielle du gène msp4 spécifique à *A. marginale*

Note : Le premier puits contient le marqueur de taille 1Kb. Les puits 1, 2, 4 et 5 contiennent des produits PCR d'échantillons positifs à *A. marginale*. Le puits 3 contient un échantillon négatif à *A. marginale*. L'avant dernier et le dernier puits contiennent, respectivement, un témoin positif à *A. marginale* et un témoin négatif de la réaction de la PCR.

2.2. Prévalence moléculaire des *Anaplasmataceae* et d'*A. marginale*

Chez les bovins (n=545), le taux global d'infection par les *Anaplasmataceae* est de 15,23% (83/545). Parmi ces bovins, 14 sont infectés par *A. marginale*, soit une prévalence moléculaire globale de 2,57%.

2.2.1. Prévalence moléculaire en fonction des gouvernorats

La prévalence moléculaire des *Anaplasmataceae* statistiquement la plus élevée est constatée chez les bovins appartenant au gouvernorat de Béja (37,50%, 24/64), alors que ceux appartenant au gouvernorat de Sousse sont les moins infectés (3,03%, 1/33) (P<0,001). En plus, aucun bovin appartenant aux gouvernorats de Siliana et Gabès n'était infecté par les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*.

La prévalence moléculaire d'*A. marginale* la plus élevée est enregistrée chez les bovins appartenant au gouvernorat de Bizerte (5,98%, 7/117), alors que ceux de Manouba sont les moins infectés (2%, 1/50). De plus, aucun bovin appartenant aux gouvernorats de Siliana, Kairouan, Zaghouan, Sousse, et Gabès n'était infecté par cette espèce bactérienne. Cette différence d'infection par *A. marginale* reste statistiquement non significative (P= 0,514) (**Tableau XIX**).

Tableau XIX : Prévalence moléculaire des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et de l'espèce *A. marginale* chez les bovins en fonction des gouvernorats

Gouvernorats	Nombre total	Nombre d'infectés par les *Anaplasmataceae*	Taux d'infection (%±I.C.)	Valeur de P	Nombre d'infectés par *A. marginale*	Taux d'infection (%±I.C.)	Valeur de P
Bizerte	117	23	19,66±0,071	0,000*	7	5,98±0,042	0,514
Ariana	41	3	7,32±0,079		1	2,44±0,046	
Manouba	50	9	18,00±0,106		1	2,0±0,038	
Siliana	35	0	0		0	0	
Jendouba	62	11	17,74±0,095		2	3,23±0,043	
Béja	64	24	37,50±0,118		2	3,13±0,042	
Kairouan	30	4	13,33±0,121		0	0	
Kasserine	24	2	8,33±0,110		1	4,17±0,079	
Zaghouan	42	6	14,29±0,105		0	0	
Sousse	33	1	3,03±0,058		0	0	
Gabès	47	0	0		0	0	
Total	545	83	15,23±0,030		14	2,57±0,013	

* : Valeur de P statistiquement significative (P< 0,05).

2.2.2. Prévalence moléculaire en fonction des délégations

Sur les 21 délégations étudiées, 16 délégations se sont révélées positives à l'infection par les *Anaplasmataceae*.

Dans le gouvernorat de Bizerte, la délégation statistiquement la plus infectée est celle de Ras Jbel avec un taux d'infection de 71,43% (5/7) par rapport aux autres délégations de Bizerte étudiées à savoir Utique, El Alia, Ghar El Melh, Sejnane et Ghzela (P=0,002).

Dans le gouvernorat de Béja, les bovins appartenant à la délégation de Amdoun sont statistiquement les plus infectés avec un taux estimé à 60% (15/25) (P=0,010).

Concernant les autres délégations, la différence d'infection par les *Anaplasmataceae* est statistiquement non significative à savoir celles appartenant aux gouvernorats de l'Ariana (P=0,880) et de Jendouba (P=0,233) (**Tableau XX**).

Sur les 21 délégations étudiées, 9 se sont révélées positives à l'infection par *A. marginale*. Concernant le gouvernorat de Bizerte, la délégation statistiquement la plus infectée est la délégation de Ras Jbel avec un taux d'infection de 28,75% (2/7) par rapport aux autres délégations de Bizerte étudiées avec une absence d'infection chez les bovins analysés appartenant aux délégations de Sejnane et Ghzela (P=0,008).

La différence d'infection par *A. marginale* pour les autres délégations reste statistiquement non significative, à savoir celles de l'Ariana (P=0,960), Béja (P=0,199), et Jendouba (P=0,104) (**Tableau XX**).

Tableau XX : Prévalence moléculaire des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et de l'espèce *A. marginale* chez les bovins selon les délégations

Gouvernorats	Délégations	Nombre total	Nombre d'infectés par les *Anaplasmataceae*	Taux d'infection (%±I.C)	Valeur de P	Nombre des infectés par *A. marginale*	Taux d'infection (%±I.C)	Valeur de P
Bizerte	Utique	50	4	8,00±0,075	0,002*	1	2,00±0,038	0,008*
	Ras Jbel	7	5	71,43±0,334		2	28,57±0,334	
	El Alia	7	1	14,29±0,258		1	14,29±0,258	
	Ghar El Melh	16	3	18,75±0,191		3	18,75±0,191	
	Sejnane	1	0	0		0	0	
	Ghzela	36	10	27,77±0,146		0	0	
Ariana	Kalaat El Andalous	2	0	0	0,880	0	0	0,960
	Raoued	38	3	7,89±0,085		1	2,63±0,050	
	La Soukra	1	0	0		0	0	
Béja	Amdoun	25	15	60±0,192	0,010*	2	8,00±0,106	0,199
	Béja Nord	7	1	14,29±0,258		0	0	
	Nefza	32	8	25,00±0,150		0	0	
Jendouba	Fernana	35	8	22,86±0,138	0,233	0	0	0,104
	Tabarka	27	3	11,11±0,118		2	7,41±0,098	
Siliana	El Krib	35	0	0	-	0	0	-
Kairouan	El Alaa	30	4	13,33±0,121	-	0	0	-
Manouba	Jedaida	50	9	18,00±0,106	-	1	2,00±0,038	-
Kasserine	Sbeitla	24	2	8,33±0,110	-	1	4,17±0,079	-
Zaghouan	El Fahs	42	6	14,29±0,105	-	0	0	-
Sousse	Kalaa el Kbira	33	1	3,03±0,058	-	0	0	-
Gabés	Gabès médina	47	0	0	-	0	0	-
Total		545	83	15,23±0,030		14	2,57±0,013	

* : Valeur de P statistiquement significative (P< 0,05).

2.2.3. Prévalence moléculaire en fonction des autres facteurs de risque

La prévalence moléculaire des *Anaplasmataceae* statistiquement la plus élevée est notée chez les bovins de l'étage bioclimatique subhumide (35,35%, 35/99) par rapport à ceux appartenant aux autres étages bioclimatiques à savoir l'humide inférieur et supérieur, le semi-aride supérieur, moyen et inférieur, et l'aride supérieur et inférieur. Cette différence est statistiquement significative (P<0,001). La même constatation est faite pour l'infection à *A. marginale* où les bovins de l'étage subhumide sont statistiquement les plus infectés (8,08%, 8/99) (P=0,014).

Les bovins de sexe femelle sont plus infectés par les *Anaplasmataceae* que les mâles (15,56%, 70/450) (P=0,644), contrairement à l'infection par *A. marginale* où les mâles sont les plus infectés mais la différence entre ces deux taux d'infection reste statistiquement non significative (P=0,689).

Les bovins âgés au plus de 5 ans sont plus infectés par les *Anaplasmataceae* (17,50%, 35/200) et *A. marginale* (3,50% ; 7/200) que les plus jeunes. Cette différence reste statistiquement non significative pour l'infection par les *Anaplasmataceae* (P=0,527) et par *A. marginale* (P=0,393).

Quant à la race, notre étude montre que les races bovines Montbéliarde et Tarentaise sont les plus infectées par les *Anaplasmataceae* (25%, 2/8), et la race locale est celle la plus infectée par *A. marginale* (7,14%, 1/14). Cette différence reste statistiquement non significative pour l'infection par les *Anaplasmataceae* (P=0,452) et *A. marginale* (P=0,943).

Les bovins infestés par les tiques se sont révélés plus infectés par les *Anaplasmataceae* (20,61%, 47/228) par rapport aux bovins non infestés (11,36, 36/317). Cette différence est statistiquement significative (P=0,003). Quant à l'infection par *A. marginale*, les bovins infestés sont plus infectés (3,51%, 8/228) que les bovins non infestés, mais cette différence reste statistiquement non significative (P=0,239) (**Tableau XXI**).

Tableau XXI : Prévalence moléculaire des *Anaplasmataceae* et de l'espèce *A. marginale* en fonction des facteurs de risque

Facteurs de risque	Nombre	*Anaplasmataceae*		*A. marginale*	
		Positifs (%±I.C)	Valeur de P	Positifs (%±I.C)	Valeur de P
Zone bioclimatique					
Subhumide	99	35 (35,35±0,094)	0,000	8 (8,08±0,053)	0,014
Humide supérieur	59	11 (18,64±0,099)		2 (3,39±0,045)	
Humide inférieur	35	8 (22,86±0,138)		0	
Semi-aride supérieur	141	16 (11,35±0,052)		3 (2,13±0,023)	
Semi-aride moyen	77	6 (7,79±0,059)		0	
Semi-aride inférieur	33	1 (3,03±0,058)		0	
Aride supérieur	54	6 (11,11±0,083)		1 (1,85±0,035)	
Aride inférieur	47	0		0	
Sexe					
Mâle	95	13 (13,68±0,068)	0,644	3 (3,16±0,034)	0,689
Femelle	450	70 (15,56±0,033)		11 (2,44±0,014)	
Age					
≤ 2 ans	183	25 (13,66±0,049)	0,527	5 (2,73±0,023)	0,393
> 2 ans ≤ 5 ans	162	23 (14,20±0,053)		2 (1,23±0,016)	
> 5 ans	200	35 (17,50±0,052)		7 (3,50±0,025)	
Race					
Holstein	64	12 (18,75±0,095)	0,452	2 (3,13±0,042)	0,943
Brown Swiss	71	12 (16,90±0,087)		1 (1,41±0,027)	
Montbéliarde	8	2 (25,00±0,300)		0	
Tarentaise	8	2 (25,00±0,300)		0	
Croisée	92	19 (20,65±0,082)		3 (3,26±0,035)	
Locale	14	2 (14,29±0,182)		1 (7,14±0,134)	
Charolaise	1	0		0	
Frisonne Pie Noire	287	34 (11,85±0,037)		7 (2,44±0,017)	
Infestation par les tiques					
Infesté	228	47 (20,61±0,052)	0,003	8 (3,51±0,023)	0,239
Non infesté	317	36 (11,36±0,034)		6 (1,89±0,014)	
Total	545	83 (15,23±0,030)		14 (2,57±0,013)	

3. Caractérisation moléculaire de l'espèce *A. marginale*

3.1. Obtention des amplifiats

Afin de caractériser l'espèce *A. marginale,* des PCR ont été réalisées afin d'amplifier les séquences partielles de deux gènes à analyser à savoir *lipA* (538 pb) et *sucB* (808 pb).

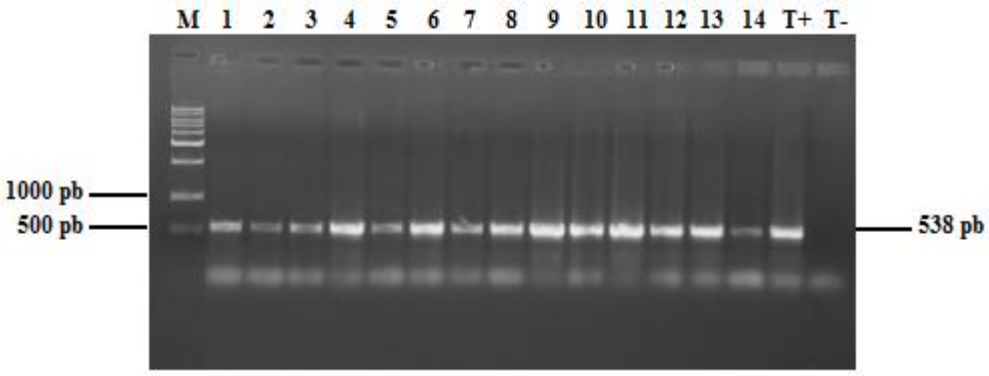

Figure 19 : Gel visualisant les produits de la PCR amplifiés à partir d'une séquence partielle du gène *lipA* à partir des échantillons positifs à *A. marginale*

Le premier puits contient le marqueur de taille 1 Kb. Les puits numérotés de 1 à 14 contiennent les produits de PCR d'une séquence partielle du gène *lipA* de taille 538 pb isolée à partir d'échantillons positif à *A. marginale*. L'avant dernier et le dernier puits contiennent, respectivement, un témoin positif et un témoin négatif de la réaction PCR.

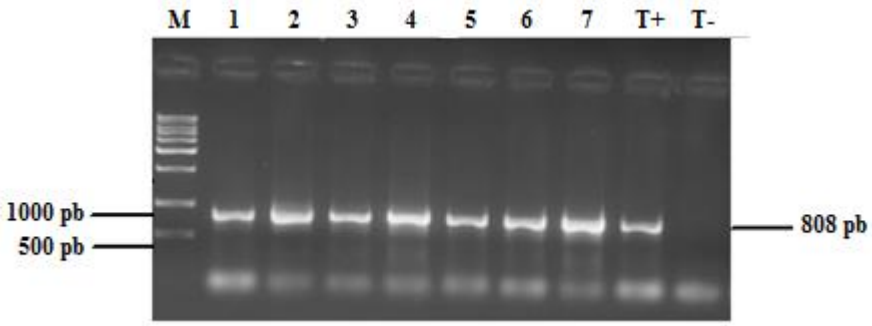

Figure 20 : Gel visualisant les produits de la PCR amplifiés à partir d'une séquence partielle du gène *sucB* à partir des échantillons positifs à *A. marginale*

Le premier puits contient le marqueur de taille 1Kb. Les puits numérotés de 1 à 7 contiennent les produits de PCR d'une séquence partielle du gène *sucB* de taille 808 pb isolée à partir d'un échantillon PCR positif à *A. marginale*. Le puits 8 et le dernier puits contiennent, respectivement, un témoin positif et un témoin négatif de la réaction de PCR.

3.2. Analyse d'homologie et étude phylogénétique

Comme indiqué dans le tableau **XXII**, le séquençage s'est porté sur des échantillons appartenant à cette étude et qui ont montré une bande d'ADN intense lors de la migration électrophorétique alors que l'analyse d'homologie et l'étude phylogénétique se sont portées sur les échantillons positifs de la présente étude et ceux obtenus par Andolsi (2020).

Tableau XXII : Désignations et informations sur les isolats d'*A. marginale* caractérisés après le séquençage des fragments des gènes *lipA* et *sucB*

Gène	Isolat	Gouvernorat (Délégation)[2]	Origine de l'échantillon	Génotype	Analyse BLAST
lipA	TunBvBz105	Bizerte (Utique)	Andolsi (2020)	lipATunGv1	100% MG807984
	TunBvBz106	Bizerte (Utique)	Andolsi (2020)		
	TunBvBz107	Bizerte (Utique)	Andolsi (2020)		
	TunBvAr312	Ariana (Raoued)	Présente étude		
	TunBvBz346	Bizerte (El Alia)	Présente étude		
	TunBvBz271	Bizerte (Ras Jbel)	Présente étude		
	TunBvBz362	Bizerte (Ghar El Melh)	Présente étude		
	TunBvBz108	Bizerte (Utique)	Andolsi (2020)	lipATunGv2	99,8% MG807984
	TunBvBz113	Bizerte (Utique)	Andolsi (2020)	lipATunGv3	99,4% MG807984
	TunBvBj489	Beja (Amdoun)	Présente étude	lipATunGv4	100% MG807970
	TunBvBj488	Beja (Amdoun)	Présente étude		
	TunBvBz274	Bizerte (Ras Jbel)	Présente étude		
	TunBvJa724	Jandouba (Tabarka)	Présente étude	lipATunGv5	100% MG807982
	TunBvJa742	Jandouba (Tabarka)	Présente étude		
sucB	TunBvBz107	Bizerte (Utique)	Andolsi (2020)	sucBTunGv1	100% MG808018
	TunBvAr312	Ariana (Raoued)	Présente étude		
	TunBvBz346	Bizerte (El Alia)	Présente étude		
	TunBvBz362	Bizerte (Ghar El Melh)	Présente étude		
	TunBvJa724	Jandouba (Tabarka)	Présente étude		
	TunBvJa742	Jandouba (Tabarka)	Présente étude		
	TunBvBz105	Bizerte (Utique)	Andolsi (2020)		

Note : Les numéros d'accès à GenBank présents dans l'analyse BLAST sont représentés dans les deux arbres phylogénétiques montrés dans les **figures 21** et **23**.

3.2.1. Variants génétiques du locus *lipA*

L'alignement des séquences nucléotidiques partielles du gène *lipA* (501pb) a révélé cinq génotypes distincts (lipATunGv1 à lipATunGv5) qui diffèrent en neuf positions nucléotidiques (**Tableaux XXIII et XXIV**). Deux génotypes (lipATunGv2 et lipATunGv3) ont montré une diversité nucléotidique par rapport à toutes les séquences publiées dans GenBank et sont considérés comme nouveaux (**Tableau XXIV et Figure 21**). Les pourcentages d'homologie des séquences nucléotidiques entre les génotypes du gène *lipA* obtenus dans cette étude étaient de 98,4 à 99,8% (100% au niveau protéique) (**Tableau XXIII**). En outre, les génotypes tunisiens étaient de 98,4 à 100% identiques à toutes les séquences d'*A. marginale* analysées dans l'arbre phylogénétique. L'homologie nucléotidique diminue (86,2 à 87,2%) lorsque les variants tunisiens sont comparés à la séquence de référence d'*A. centrale* (CP001759) publiée dans GenBank.

L'analyse phylogénétique basée sur l'alignement des cinq génotypes tunisiens, représentant les 14 isolats séquencés, avec les 73 séquences d'*A marginale* obtenues à partir du GenBank a généré cinq principaux clades (**Figure 21**). Le premier clade est formé exclusivement par la souche d'Afrique du Sud. Le deuxième clade comprend principalement des isolats d'Amérique du Nord (représentés exclusivement par les États-Unis). Le troisième clade est formé par des isolats méditerranéens provenant de l'Italie et de la Tunisie. Le quatrième clade contient principalement des souches d'Amérique latine à savoir le Mexique, le Brésil, la Colombie, l'Uruguay et l'Argentine. Le dernier comprend des isolats provenant exclusivement du Nord-Afrique à savoir la Tunisie (**Figure 21**).

Les isolats tunisiens ont été affectés aux trois derniers clades (un génotype aux troisièmes et quatrième clades et trois au cinquième). En particulier, les génotypes lipATunGv1 à lipATunGv3 sont regroupés dans le cinquième clade avec d'autres isolats provenant exclusivement de la Tunisie. Au sein du troisième clade, le génotype lipATunGv4 est inclus avec d'autres isolats méditerranéens à savoir tunisiens et italiens. Dans le quatrième clade, le génotype lipATunGv5 était identique à plusieurs isolats originaires principalement d'Amérique latine comme l'Argentine, le Brésil et le Mexique (**Figure 21**).

Tableau XXIII : Taux d'homologie des nucléotides (en bas) et des acides aminés (en haut) entre tous les variants génétiques disponibles sur la base de la séquence partielle étudiée du gène *lipA*

Variant[1]	Taux d'homologie (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LA846	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Italia8	99,8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Italia7	99,6	99,8	100	100	100	100	100	100	100	100	100
St. Maries	99,2	99,0	98,8	100	100	100	100	100	100	100	100
Africa	99,0	99,2	99,4	99,4	100	100	100	100	100	100	100
lipAGv4	98,8	99,0	99,2	99,6	99,8	100	100	100	100	100	100
lipATunGv1	98,8	99,0	99,2	99,6	99,8	100	100	100	100	100	100
lipATunGv2	98,6	98,8	99,0	99,4	99,6	99,8	99,8	100	100	100	100
lipATunGv3	98,4	98,6	98,8	99,2	99,4	99,6	99,6	99,4	100	100	100
lipATunGv4	99,8	100	99,8	99,0	99,2	99,0	99,0	98,8	98,6	100	100
lipATunGv5	100	99,8	99,6	99.2	99,0	98,8	98,8	98,6	98,4	99,8	100

[1] : Nom du variant, du génotype ou de l'isolat.

Note : L'isolat "LA846" est isolé à partir de bovin argentin et représenté par le numéro d'accès à GenBank KM091034. Les isolats "Italia7" et "Italia8" sont isolés à partir de bovins en Italie représentés respectivement par les numéros d'accès à GenBank KM091031 et KM091032. La souche "St. Maries" est isolée à partir de bovin en USA et représentée par le numéro d'accès à GenBank CP000030. L'isolat "Africa" est isolé à partir de bovin sud-africain et représenté par le numéro d'accès à GenBank KM091016.

Tableau XXIV : Différences nucléotidiques et d'acides aminés entre les différents variants génétiques du gène *lipA* révélés jusqu'à cette étude

Variant [1]	**Positions nucléotidiques (positions d'AA)[2]**								
	402	420	438	495	606	639	699	708	726
LA846	T	A	T	T	A	C	C	A	C
Italia8	*	*	*	C	*	*	*	*	*
Italia7	*	*	C	C	*	*	*	*	*
St. Maries	*	*	*	*	G	*	T	G	T
Africa	*	*	C	C	*	*	T	G	T
lipAGv4	*	*	C	C	G	*	T	G	T
lipATunGv1	*	*	C	C	G	*	T	G	T
lipATunGv2	*	*	C	C	G	T	T	G	T
lipATunGv3	C	T	C	C	G	*	T	G	T
lipATunGv4	*	*	*	C	*	*	*	*	*
lipATunGv5	*	*	*	*	*	*	*	*	*

[1] : Nom du variant, du génotype ou de l'isolat.

[2] : Les nombres représentent les positions nucléotidiques par rapport à la séquence *lipA* d'*A. marginale* de la souche St. Maries de l'USA (nombre d'accès à GenBank CP000030). Les positions de nucléotides conservées par rapport à la première séquence sont indiquées par des astérisques. Les changements d'acides aminés, s'ils existent, sont indiqués entre parenthèses avec un code à une seule lettre.

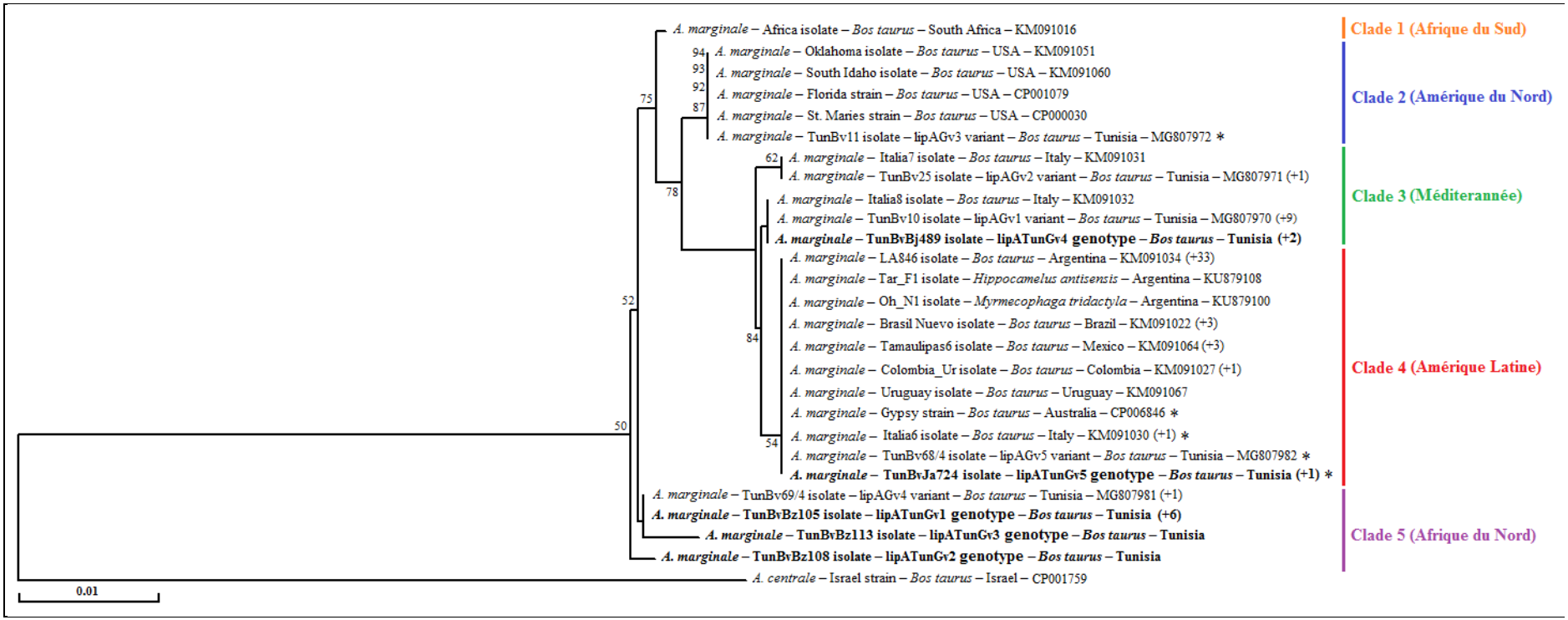

Figure 21 : Arbre phylogénétique des variants génétiques d'*A. marginale* basé sur l'alignement multiple des séquences nucléotidiques partielles (501 pb) du gène *lipA* en utilisant la méthode 'Neighbor-Joining'

Notes : Les nombres liés aux nœuds représentent le pourcentage de robustesse sur 1000 itérations soutenant les nœuds (seuls les pourcentages supérieurs à 50% sont représentés). L'hôte, la souche ou l'isolat, le pays d'origine et le numéro d'accès à GenBank sont indiqués. Les séquences d'*A. marginale* nouvellement obtenues dans la présente étude sont en gras.

*: Séquences non classées dans leurs régions géographiques appropriées représentées par les clades. Les nombres entre parenthèses à la fin de certaines séquences représentent le nombre de séquences des isolats ou des souches qui sont identiques à celle de l'isolat ou de la souche présente dans l'arbre.

3.2.2. Variants génétiques du locus *sucB*

Les séquences partielles (681 pb du gène *sucB*) des sept isolats tunisiens d'*A. marginale* ont été alignées, permettant l'identification d'un seul génotype (sucBTunGv1) (**Tableau XXV**). Le génotype sucBTunGv1 était de 97,5 à 100% identiques par rapport à toutes les séquences d'*A. marginale* analysées dans l'arbre phylogénétique, donnant une homologie de 96,9 à 100% au niveau protéique. En fait, 27 SNP ont été observés donnant 8 substitutions d'acides aminés (**Figure 22**). En comparant le génotype révélé à celui d'*A. centrale* (numéro d'accès à GenBank CP001759), le pourcentage d'identité était de 98,7%.

Pour ce gène, l'arbre phylogénétique basé sur l'alignement du génotype obtenu dans cette étude avec toutes les séquences partielles du gène *sucB* d'*A. marginale* trouvées dans GenBank et une séquence d'*A. centrale* ajoutée en tant que hors groupe « *out-group* » montrent la présence de deux clades principaux (**Figure 23**). Excepté les deux isolats italiens Italia6 et Italia7, l'isolat tunisien TunBv31 et la souche australienne (Gypsy), le premier clade comprend tous les isolats provenant des pays du nouveau monde (à savoir les États-Unis, le Mexique, le Brésil, la Colombie, l'Uruguay et l'Argentine). Le deuxième clade contient plusieurs isolats provenant des pays de l'ancien monde comme l'Italie (isolats Italia 8 et Italia 10) et l'Afrique du Sud (isolat Africa) en plus de la souche israélienne d'*A. centrale* (**Figure 23**). Le génotype sucBTunGv1 représentant les sept isolats tunisiens révélés a été affecté au deuxième clade (**Figure 23**). Au sein de ce dernier, sucBTunGv1 forme avec d'autres isolats Tunisiens révélés précédemment un sous-clade distinct relativement éloigné de la souche de référence d'*A. centrale* groupée avec d'autres isolats des pays de l'ancien monde exclusivement représentés par l'Italie (isolats Italia 8 et Italia 10) et l'Afrique du Sud (isolat Africa) (**Figure 23**).

Tableau XXV : Taux d'homologie des nucléotides (en bas) et des acides aminés (en haut) entre tous les variants génétiques disponibles sur la base de la séquence partielle étudiée du gène *sucB*

Variant[1]	**Taux d'homologie (%)**																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
LH917	100	98,7	99,1	99,1	98,7	99,6	99,1	99,6	99,6	97,4	97,4	99,6	97,4	97,4	99,6	96,9	97,4	97,4
Mer 2 may13	98,5	100	99,6	99,6	100,0	99,1	98,7	99,1	99,1	96,9	97,8	99,1	96,9	97,8	99,1	97,4	97,8	97,8
Florida	98,5	99,4	100	100,0	99,6	99,6	99,1	99,6	99,6	97,4	98,2	99,6	97,4	98,2	99,6	97,8	98,2	98,2
Tamaulipas 6	98,4	99,3	99,9	100	99,6	99,6	99,1	99,6	99,6	97,4	98,2	99,6	97,4	98,2	99,6	97,8	98,2	98,2
LA802	99,1	99,4	99,1	99,0	100	99,1	98,7	99,1	99,1	96,9	97,8	99,1	96,9	97,8	99,1	97,4	97,8	97,8
Oklahoma	99,3	99,3	99,3	99,1	99,3	100	99,6	100,0	100,0	97,8	97,8	100,0	97,8	97,8	100	97,4	97,8	97,8
LM3	99,6	98,7	98,7	98,5	99,3	99,4	100	99,6	99,6	98,2	98,2	99,6	98,2	98,2	99,6	97,8	98,2	98,2
COB14	99,6	98,7	98,7	98,5	99,3	99,4	99,7	100	100,0	97,8	97,8	100,0	97,8	97,8	100,0	97,4	97,8	97,8
Italia 6	99,4	98,5	98,5	98,4	99,1	99,3	99,6	99,9	100	97,8	97,8	100,0	97,8	97,8	100,0	97,4	97,8	97,8
Italia 8	97,8	97,5	97,8	97,7	97,8	97,7	98,2	98,2	98,1	100	99,1	97,8	100,0	99,1	97,8	99,6	99,1	99,1
Italia 10	97,8	97,8	98,1	98,2	98,1	97,7	98,2	98,2	98,1	99,4	100	97,8	99,1	100,0	97,8	99,6	100,0	100,0
LF252	99,6	98,7	98,7	98,5	99,3	99,4	99,7	99,7	99,6	97,9	97,9	100	97,8	97,8	100,0	97,4	97,8	97,8
Africa	97,7	97,4	97,7	97,5	97,7	97,5	98,1	98,1	97,9	99,9	99,3	97,8	100	99,1	97,8	99,6	99,1	99,1
sucbgv1	97,5	98,4	98,7	98,8	98,1	98,2	97,9	97,7	97,5	98,8	99,4	97,7	98,7	100	97,8	99,6	100,0	100,0
sucbgv2	99,7	98,8	98,8	98,7	99,4	99,6	99,9	99,9	99,7	98,1	98,1	99,9	97,9	97,8	100	97,4	97,8	97,8
sucbgv3	97,2	98,1	98,4	98,5	97,8	97,9	97,7	97,4	97,2	99,1	99,1	97,4	99,0	99,7	97,5	100	99,6	99,6
sucbgv4	97,4	98,2	98,5	98,7	97,9	98,1	97,8	97,5	97,4	98,7	99,3	97,5	98,5	99,9	97,7	99,6	100	100,0
sucBTunGv1	97,5	98,4	98,7	98,8	98,1	98,2	97,9	97,7	97,5	98,8	99,4	97,7	98,7	100,0	97,8	99,7	99,9	100

[1] : Nom du variant, du génotype ou de l'isolat.

Figure 22 : Différences nucléotidiques (A) et d'acides aminés (B) entre les différents variants génétiques du gène *sucB* jusqu'à cette étude

(A)

```
LH917           ACCAGGGGCCAGGTTTTGGCGATCATCAGCAAGCATGAAGGTGCCCCTCAGGATGCCGCAGCGCGTGAGCACAAGCAAGCTGAAGTTGCAACTCCAGATG    100
Mer_2_May13     ---------------------------------g-------------------------------------------------------------    100
Florida         ------------------------------------------------------------------------------------------------    100
Tamaulipas 6    ------------------------------------------------------------------------------------------------    100
LA802           ---------------------------------g-------------------------------------------------------------    100
Oklahoma        ------------------------------------------------------------------------------------------------    100
LM3             ------------------------------------------------------------------------------------g---------    100
COB14           ------------------------------------------------------------------------------------------------    100
Italia 6        ------------------------------------------------------------------------------------------------    100
Italia 8        ------------------------------------------------------------------------------------g----g----    100
Italia 10       ------------------------------------------------------------------------------------g----g----    100
LF252           ------------------------------------------------------------------------------------g----------    100
Africa          ------------------------------------------------------------------------------------g----g----    100
sucBGv1         ------------------------------------------------------------------------------------g----g----    100
sucBGv2         ------------------------------------------------------------------------------------------------    100
sucBGv3         ------------------------------------------------------------------------------------g----g----    100
sucBGv4         ------------------------------------------------------------------------------------g----g----    100
sucBTunGv1      ------------------------------------------------------------------------------------g----g----    100
```

```
LH917           CCGAATTAGCACCGCAGGTTGAGCAACGTGATGCGCAAGCTCAAGTTGCTGACAAGGAAAAGCCGGTTAAGCCGGTCACTGGCCCACGCATTCCTGGTAT  200
Mer_2_May13     ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
Florida         ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
Tamaulipas 6    ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
LA802           ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
Oklahoma        ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
LM3             ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
COB14           ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
Italia 6        ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
Italia 8        --------------------------------t-----t---------------------------------a-c------------------c-----  200
Italia 10       --------------------------------t-----t---------------------------------a-c------------------c-----  200
LF252           ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
Africa          --------------------------------t-----t---------------------------------a-c------------------c-----  200
sucBGv1         --------------------------------t-----t---------------------------------a-c------------------c-----  200
sucBGv2         ----------------------------------------------------------------------------------------------------  200
sucBGv3         --------------------------------t-----t---------------------------------a-c------------------c-----  200
sucBGv4         --------------------------------t-----t---------------------------------a-c------------------c-----  200
sucBTunGv1      --------------------------------t-----t---------------------------------a-c------------------c-----  200
```

```
LH917           AGACGAGTTCGTCGCTGGTGGGTGTTCCTCACCTGCTGATAGGGCGGCTGGTAAAATCACCAAGCCTGTGGGCGATGTGGGCAAGAGCCCCGTCCCGCAG    300
Mer_2_May13     ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
Florida         ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
Tamaulipas 6    ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
LA802           ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
Oklahoma        ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
LM3             ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
COB14           ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
Italia 6        ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
Italia 8        ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
Italia 10       ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
LF252           ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
Africa          ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
sucBGv1         ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
sucBGv2         ------------------------------------------------------------------------------------------------------    300
sucBGv3         ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
sucBGv4         ---------t-----c--------------------------------------------------------------------------------------    300
sucBTunGv1      ---------------c--------------------------------------------------------------------------------------    300
```

```
LH917           CAACGCGTGTATGATGAGGTTGACGGCGTCATAAGCGTGCCAGGAGAAAGGCGCGTTAAGATGAGCAAAATCCGCCAGGTGATCGCGTCACGGCTGAAAG    400
Mer_2_May13     ----------------------------------------------------------------------------------------------------g-    400
Florida         ----------------------------------------------------------------------------------------------------g-    400
Tamaulipas 6    ------------------------------------------------------------g---------------------------------------g-    400
LA802           ----------------------------------------------------------------------------------------------------    400
Oklahoma        ----------------------------------------------------------------------------------------------------    400
LM3             ----------------------------------------------------------------------------------------------------    400
COB14           ----------------------------------------------------------------------------------------------------    400
Italia 6        ------------------------------------------------------------------------------------t-----------------    400
Italia 8        --------------------------a----------------g----------------------------------------------------g-    400
Italia 10       ------------------------------------------------------------g---------------------------------------g-    400
LF252           ----------------------------------------------------------------------------------------------------    400
Africa          --------------------------a----------------g----------------------------------------------------g-    400
sucBGv1         ------------------------------------------------------------g---------------------------------------g-    400
sucBGv2         ----------------------------------------------------------------------------------------------------    400
sucBGv3         --------------------------a----------------g--------------------g---------------------------------g-    400
sucBGv4         ------------------------------------------------------------g---------------------------------------g-    400
sucBTunGv1      ------------------------------------------------------------g---------------------------------------g-    400
```

```
LH917           AATCGCAAAATACCGCAGCCACGCTCAGCACTTTTAATGAGGTGGATATGAGTGCTGTTATGGCGCTCAGGGGGAAATATAAGGAAGGCTTTGAGAAGAA    500
Mer_2_May13     ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
Florida         ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
Tamaulipas 6    ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
LA802           ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
Oklahoma        ----------------------------------------------------------------------------------------------------    500
LM3             ----------------------------------------------------------------------------------------------------    500
COB14           ----------------------------------------------------------------------------------------------------    500
Italia 6        ----------------------------------------------------------------------------------------------------    500
Italia 8        ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
Italia 10       ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
LF252           ----------------------------------------------------------------------------------------------------    500
Africa          ----------c--------------t--------------------------------------------------------------------------    500
sucBGv1         ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
sucBGv2         ----------------------------------------------------------------------------------------------------    500
sucBGv3         ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
sucBGv4         ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
sucBTunGv1      ----------c----------------------------------------------------------------------------------------    500
```

```
LH917           GTATGAGGTGAAACTGGGGTTCATGTCGTTCTTCATCAGGGCCGTGGTGCTGGCTCTCAGAGAGATACCGGTGATTAATGCTGAGATTTCCGGGGATGAG    600
Mer_2_May13     ---------a----------------------------a-------------------------------------------------------    600
Florida         -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
Tamaulipas 6    -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
LA802           -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
Oklahoma        ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
LM3             ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
COB14           ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
Italia 6        ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
Italia 8        ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
Italia 10       -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
LF252           ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
Africa          ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
sucBGv1         -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
sucBGv2         ---------------------------------------------------------------------------------------------    600
sucBGv3         -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
sucBGv4         -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
sucBTunGv1      -------------------------------------a-------------------------------------------------------    600
```

```
LH917           ATAATATACCGCGACTACTGCAACATCGGGGTCGCGGTTGGCGGGGATAAGGGGTTAGTAGTTCCGGTGATACGCGGGGCC  681
Mer_2_May13     ----------------------t--------t-----c---ac-----------------------------------  681
Florida         ----------------------t--------t-----c---ac------------------g------------------  681
Tamaulipas 6    ----------------------t--------t-----c---ac------------------g------------------  681
LA802           ---------------------------------------c---ac-----------------------------------  681
Oklahoma        ----------------------t--------t-----c---ac-----------------------------------  681
LM3             -------------------------------------------ac-----------------------------------  681
COB14           -----------t------------------------------ac-----------------------------------  681
Italia 6        -----------t------------------------------ac-----------------------------------  681
Italia 8        -----------t------------------------------ac-----------------------------------  681
Italia 10       -----------t------------------------------ac-----------------------------------  681
LF252           -------------------------------------------ac-----------------------------------  681
Africa          -----------t------------------------------ac-----------------------------------  681
sucBGv1         ----------------------t--------t-----c---ac-----------------------------------  681
sucBGv2         -------------------------------------------ac-----------------------------------  681
sucBGv3         ----------------------t--------t-----c---ac-----------------------------------  681
sucBGv4         ----------------------t--------t-----c---ac-----------------------------------  681
sucBTunGv1      ----------------------t--------t-----c---ac-----------------------------------  681
```

(B)

```
LH917           TRGQVLAIISKHEGAPQDAAAREHKQAEVATPDAELAPQVEQRDAQAQVADKEKPVKPVTGPRIPGIDEFVAGGCSSPADRAAGKITKPVGDVGKSPVPQ    100
Mer_2_May13     ----------r----------------------------------------------------------------------------------------    100
Florida         ----------------------------------------------------------------------------------------------------    100
Tamaulipas 6    ----------------------------------------------------------------------------------------------------    100
La802           ----------r----------------------------------------------------------------------------------------    100
Oklahoma        ----------------------------------------------------------------------------------------------------    100
LM3             ----------------------------a----------------------------------------------------------------------    100
CoB14           ----------------------------------------------------------------------------------------------------    100
Italia 6        ----------------------------------------------------------------------------------------------------    100
Italia 8        ----------------------------a----------v-v----------a----------------------------------------------    100
Italia 10       ----------------------------a----------v-v----------a----------------------------------------------    100
LF252           ----------------------------------------------------------------------------------------------------    100
Africa          ----------------------------a----------v-v----------a----------------------------------------------    100
sucBGv1         ----------------------------a----------v-v----------a----------------------------------------------    100
sucBGv2         ----------------------------------------------------------------------------------------------------    100
sucBGv3         ----------------------------a----------v-v----------a----------------------------------------------    100
sucBGv4         ----------------------------a----------v-v----------a----------------------------------------------    100
sucBTunGv1      ----------------------------a----------v-v----------a----------------------------------------------    100
```

```
LH917           QRVYDEVDGVISVPGERRVKMSKIRQVIASRLKESQNTAATLSTFNEVDMSAVMALRGKYKEGFEKKYEVKLGFMSFFIRAVVLALREIPVINAEISGDE    200
Mer_2_May13     ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
Florida         ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
Tamaulipas 6    ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
La802           ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
Oklahoma        ------------------------------------------------------------------------------------------------------    200
LM3             ------------------------------------------------------------------------------------------------------    200
CoB14           ------------------------------------------------------------------------------------------------------    200
Italia 6        ------------------------------------------------------------------------------------------------------    200
Italia 8        ---------i--------------------------------------------------------------------------------------------    200
Italia 10       ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
LF252           ------------------------------------------------------------------------------------------------------    200
Africa          ---------i--------------------------------------------------------------------------------------------    200
sucBGv1         ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
sucBGv2         ------------------------------------------------------------------------------------------------------    200
sucBGv3         ---------i----------------------------------------------------------------------k---------------------    200
sucBGv4         ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
sucBTunGv1      ----------------------------------------------------------------------------k---------------------    200
```

```
LH917           IIYRDYCNIGVAVGGDKGLVVPVIRGA                                227
Mer_2_May13     --------------t------------                                227
Florida         --------------t------------                                227
Tamaulipas 6    --------------t------------                                227
La802           --------------t------------                                227
Oklahoma        --------------t------------                                227
LM3             --------------t------------                                227
CoB14           --------------t------------                                227
Italia 6        --------------t------------                                227
Italia 8        --------------t------------                                227
Italia 10       --------------t------------                                227
LF252           --------------t------------                                227
Africa          --------------t------------                                227
sucBGv1         --------------t------------                                227
sucBGv2         --------------t------------                                227
sucBGv3         --------------t------------                                227
sucBGv4         --------------t------------                                227
sucBTunGv1      --------------t------------                                227
```

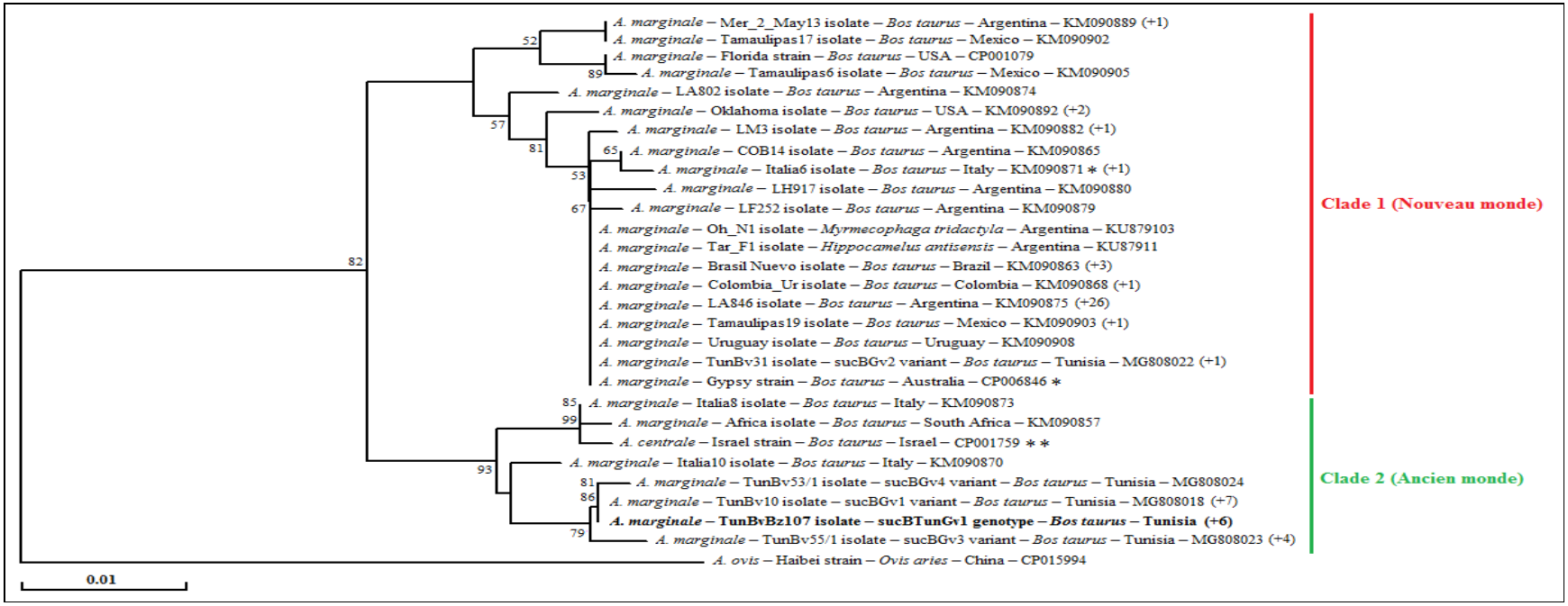

Figure 23 : Arbre phylogénétique des isolats et souches d'*A. marginale* basé sur l'alignement multiple des séquences nucléotidiques partielles (681 pb) du gène *sucB* en utilisant la méthode 'Neighbor-Joining'

Notes : Les nombres liés aux nœuds représentent le pourcentage de robustesse sur 1000 itérations soutenant les nœuds (seulement les pourcentages supérieurs à 50% sont représentés). L'hôte, la souche ou l'isolat, le pays d'origine et le numéro d'accès à GenBank sont indiqués. Les séquences d'*A. marginale* nouvellement obtenues dans cette étude sont en gras. *: Séquences non classées dans leurs régions géographiques appropriées représentées par les clades.

**: Séquence *sucB* partielle de la souche de référence d'*A. centrale* (CP001759) classée dans le deuxième clade avec les séquences d'*A. marginale* isolées à partir des pays de l'ancien monde. Les nombres entre parenthèses à la fin de certaines séquences représentent le nombre de séquences des isolats ou des souches qui sont identiques à celle de l'isolat ou de la souche présente dans l'arbre.

IV. DISCUSSION

L'anaplasmose bovine causée par *Anaplasma marginale*, transmise essentiellement par les tiques mais également par les insectes hématophages, est considérée comme l'une des principales contraintes aux programmes d'amélioration de la production animale étant donné qu'elle est responsable d'une diminution de la productivité des animaux, provoquant ainsi des pertes économiques importantes dans le monde entier (Kocan *et al.*, 2008). En effet, à titre d'exemple, le coût estimatif de l'anaplasmose pour les producteurs laitiers américains est de 100 millions de dollars par année et ce chiffre est sans doute sous-estimé en raison des infections chroniques non diagnostiquées (www.omafra.gov.on.ca). Par conséquent, elle constitue un risque réel et mobilise l'attention des vétérinaires dans le monde entier.

Le dépistage de cette maladie chez les bovins a augmenté sensiblement dans le monde entier, d'où un plus grand nombre de travaux cherchant à révéler et caractériser les différents isolats d'*A. marginale* sur le plan phylogéographique afin de contribuer aux programmes de lutte contre cette maladie.

En Tunisie, différentes enquêtes transversales et longitudinales sur l'anaplasmose bovine en utilisant des méthodes moléculaires ont été menées chez des bovins. Cependant, ces études étaient principalement axées sur les bovins du nord du pays. En revanche, la répartition géographique de l'infection et la diversité génétique de l'agent causal restent largement inconnues et très peu étudiées dans les fermes localisées principalement dans le centre et le sud du pays.

La présente étude est le premier rapport épidémiologique sur l'infection à *A. marginale* chez les bovins couvrant plusieurs zones géographiques et bioclimatiques s'étendant du nord au sud de la Tunisie.

Dans cette étude, le taux global d'infection par *A. marginale* était de 2,57%. Comparé à d'autres travaux effectués en Tunisie et d'autres pays, ce taux est similaire à celui observé en Turquie (2,3%) (Aktas *et al.*, 2011), Soudan (6,1%) (Awad *et al.*, 2011), Kenya (7,8%) (Adjou Moumouni *et al.*, 2015), Mongolie (8,7%) (Ybañez *et al.*, 2012), et Iraq (9,09%) (Ameen *et al.*, 2012).

Cependant, ce taux est inférieur à celui rapporté en Algérie (11,1%) (Rjeibi *et al.*, 2017), Pakistan (16,3%) (Zeb *et al.*, 2020), Maroc (21,9%) (Ait Hamou *et al.*, 2012), Sénégal (19,4%) (Dahmani *et al.*, 2019), ainsi que dans d'autres régions de la Tunisie rapportés par Belkahia et ses collaborateurs en 2015a (25,4%).

Par rapport à d'autres études menées dans d'autres pays africains, les taux de prévalence d'*A. marginale* étaient significativement plus élevés chez les bovins d'Angola (38%) (Kubelová *et al*., 2010), Kenya (31% à 96,2%) (Peter *et al*., 2020), Ouganda (82,9%) (Byaruhanga *et al*., 2018), Madagascar (89,7%) (Pothmann *et al*., 2016), Afrique du sud (57%) (Hove *et al*., 2018), et Mozambique (97,3%) (Fernandes *et al*., 2019).

En effet, ces variations de prévalence de l'espèce *A. marginale* entre les différents pays et régions d'un même pays pourraient être dues à plusieurs facteurs, notamment le type d'essai moléculaire et les marqueurs utilisés, la présence et l'abondance des tiques potentiellement vectrices et/ou d'autres vecteurs incriminés, les programmes de lutte contre ces vecteurs, les pratiques de gestion agricole et d'élevage, les saisons d'échantillonnage et/ou d'autres facteurs bioclimatiques ou écologiques, la susceptibilité des races animales et la présence de réservoirs fauniques (M'ghirbi et al., 2016; Ben Said et al., 2018a).

Dans cette étude, *Anaplasma marginale* a été identifiée dans quatre étages bioclimatiques, qui sont le sub-humide, l'humide supérieur, le semi-aride supérieur, et l'aride supérieur. L'analyse de ce facteur a montré une différence statistiquement significative entre les différentes zones bioclimatiques avec une valeur de *P* estimée à 0,014.

En effet, les bovins appartenant à l'étage sub-humide étaient statistiquement les plus infectés par *A. marginale*. Cette constatation a été signalée précédemment dans des études réalisées par Belkahia et ses collaborateurs (2015a) dans le Nord de la Tunisie ainsi que M'ghirbi et ses collaborateurs (2016). Celle-ci est probablement expliquée par l'effet des conditions bioclimatiques sur la phénologie et la distribution des vecteurs notamment les tiques.

La connaissance des relations phylogéographiques entre les isolats d'*A. marginale* est cruciale pour mieux prévenir et contrôler les infections à travers le monde, et pour cette raison plusieurs méthodes et marqueurs ont été développés afin d'étudier la phylogéographie des différents isolats d'*A. marginale* dans le monde durant ces deux dernières décennies.

La majeure partie des analyses phylogénétiques des souches d'*A. marginale* ont été réalisées à l'aide de séquences partielles des gènes qui codent pour les protéines de surface (MSP) principalement *msp4* et *msp1* alpha. D'une part, en raison du degré élevé de variations de séquences dans une zone endémique, le gène *msp4* n'a pas fourni d'informations phylo-géographiques à l'échelle mondiale, mais ce dernier pourrait être utile dans des comparaisons de souches au niveau régional et pourrait fournir des informations importantes sur la coévolution hôte-pathogène et les relations vecteurs-pathogène. D'autre part, les séquences

d'ADN partielles du gène *msp1* alpha, n'ont pas fourni une bonne résolution phylogéographique puisque ce dernier est soumis à une pression de sélection positive et que les séquences *msp1* alpha, semblent évoluer rapidement (Kocan *et al*., 2003; Belkahia *et al*., 2015a).

Cependant, une approche différente appelée Typage par les séquences multi-loci (*Multi-Loci Sequence Typing,* MLST) a été utilisée et ce afin d'acquérir des connaissances complètes sur l'évolution et la diversité génétique des souches d'*Anaplasma marginale*. Cette méthode de typage constitue théoriquement une bonne alternative, principalement en raison de sa puissance multi-loci. En plus, l'avantage de cet outil est que la sélection de loci cibles ne nécessite pas une connaissance complète du génome de la souche analysée, étant donné qu'une focalisation est faite généralement sur sept gènes de ménage de l'espèce étudiée. Cette méthode est de plus en plus reconnue comme une méthode phylogénétique standard, car ces gènes de ménage, possédant une horloge moléculaire lente, peuvent représenter d'excellents marqueurs phylogénétiques.

De ce fait, Guillemi et ses collaborateurs (2015a) ont développé et appliqué cette méthode sur l'espèce *A. marginale*, mais en étudiant les séquences concaténaires, ces auteurs n'ont pas réussi à trouver une association évidente entre les régions phylogéographiques et les variants génétiques isolés à partir de différents isolats provenant de plusieurs régions du monde. Pour cette raison, Ben Said et ses collaborateurs (2018b) ont examiné chaque gène appartenant à ce schéma multi-loci, indépendamment, selon la méthode d'analyse de locus unique. L'analyse phylogénétique des différents loci séparément a révélé que sur les sept gènes analysés, le marqueur *lipA* s'est montré plus intéressant que le schéma multi-loci sur le plan phylogéographique et a permis la classification de nos séquences et celles trouvées dans GenBank selon différents continents et régions du monde. De même, le gène *sucB* s'est montré très intéressant sur le plan phylogéographique et a permis de classer les souches selon le nouveau et l'ancien monde. Par conséquent, dans cette étude, nous avons choisi d'évaluer la phylogéographie de nos isolats d'*A. marginale* révélés par l'analyse des marqueurs *lipA* et *sucB*.

L'étude moléculaire basée sur l'analyse des séquences partielles du gène *lipA* a permis de révéler que, sur les 14 isolats analysés, cinq génotypes différents (lipATunGv1 à lipATunGv5) dont deux nouveaux (lipATunGv2 et lipATunGv3) ont été identifiés. Cette hétérogénéité relativement importante par rapport au faible nombre de bovins infectés reflète probablement des mouvements de bovins entre différentes régions du pays. Des résultats similaires ont été observés en analysant des isolats italiens (Guillemi *et al*., 2015a) et tunisiens (Ben Said *et al*., 2018b).

L'analyse phylogénétique a permis la classification des variants du gène *lipA* selon cinq principaux clades, permettant ainsi une bonne différenciation entre les souches. En particulier, ce marqueur différencie clairement les souches des pays sud-africains (clade1), nord-américains (clade 2), méditerranéens (clades 3), latino-américains (clade 4) et nord-africains (clade 5). Les isolats tunisiens ont été affectés aux trois derniers clades (un génotype aux troisième et quatrième clades et trois au cinquième) confirmant le pouvoir discriminant du gène *lipA* et une plus grande hétérogénéité de nos isolats par rapport à ceux trouvés dans d'autres pays comme suggéré précédemment par Ben Said et ses collaborateurs (2018b) (**Figure 21**).

D'autre part, la séquence partielle du gène *sucB* a permis également de classer les souches selon les régions géographiques. Cependant, cette classification n'est pas faite selon les continents comme pour le gène *lipA*, mais selon le Nouveau (clade 1) et l'Ancien Monde (clade 2) (**Figure 23**) comme suggéré récemment par Ben Said et al. (2018b). Cette découverte était fortement étayée par une valeur de robustesse des nœuds élevée estimée à 82% et la classification de 79 (98,53%) séquences partielles *sucB* sur 81 dans leurs régions géographiques appropriées (**Figure 23**). Toutefois, l'analyse des séquences a montré que la séquence partielle du gène *sucB* était conservée au sein des isolats tunisiens d'*A. marginale*. En effet, un seul génotype (sucBTunGv1) a été révélé dans sept échantillons séquencés. Ceci est en accord avec les résultats de Guillemi et al. (2015a) qui ont montré une faible diversité étant donné qu'un seul génotype a été enregistré dans 39 isolats d'Amérique latine. En plus des génotypes sucBGv2, sucBGv3 et sucBGv4 précédemment rapportés par Ben Said et al. (2018b), le génotype sucBTunGv1 révélé précédemment décrit en Tunisie (sucBGv1) a également été détecté chez sept bovins infectés provenant de cinq régions étudiées différentes et, par conséquent, semble être prédominant dans notre pays.

En résumé, la présente étude nous a permis de confirmer la présence de différentes et nouvelles souches d'*A. marginale* chez des bovins localisés dans différentes zones bioclimatiques de la Tunisie et que l'approche de l'analyse de locus unique, des mêmes gènes employés récemment dans la méthode MLST est très intéressante et fournit de nouveaux marqueurs génétiques tels que les gènes *lipA* et *sucB*, qui s'avèrent pertinents dans la recherche de la phylogéographie des souches analysées.

En conclusion, l'analyse du marqueur phylogéographique *lipA* a indiqué une plus grande diversité d'isolats tunisiens d'*A. marginale* par rapport aux autres isolats et souches disponibles dans le monde, probablement en raison d'introductions multiples de bovins infectés d'origines différentes.

CONCLUSION

Notre étude avait pour objectifs d'estimer la prévalence moléculaire de l'infection par *A. marginale* chez des bovins appartenant à différents étages bioclimatiques répartis du nord au sud de la Tunisie et de présenter quelques données épidémiologiques sur l'anaplasmose bovine.

Au terme de cette étude, il ressort que le taux global de prévalence moléculaire par l'espèce *A. marginale* chez 545 bovins, en utilisant une PCR conventionnelle spécifique basée sur le gène *msp4*, est estimé à 2,57%. Cette étude nous a permis également de faire le point sur l'état actuel de l'infection par *A. marginale* et de déterminer le statut de nos élevages bovins vis-à-vis de l'anaplasmose.

De plus, la caractérisation des isolats tunisiens d'*A. marginale* révélés en se basant sur le pouvoir discriminatif du marqueur *lipA* a montré une grande diversité de ces derniers, suggérant une introduction multiple de bovins infectés à partir de différents pays.

La caractérisation génétique effectuée dans cette étude nous a permis de confirmer que l'approche de l'analyse de locus unique, des mêmes gènes employés récemment dans la méthode MLST, fournit de nouveaux marqueurs génétiques utiles sur le plan phylogéographique.

En Tunisie, l'anaplasmose est peu maitrisée par manque de données épidémiologiques, bien qu'elle puisse être la source de pertes économiques non négligeables. Etant donné l'impact de cette maladie à tiques sur le plan économique, il est donc important d'accentuer encore plus la lutte contre les tiques, et pour cela nous suggérons :

- ✓ Une sensibilisation des éleveurs par rapport au risque de maladies qu'encourt le bétail au contact des tiques.
- ✓ Un suivi rigoureux des animaux par les vétérinaires.
- ✓ Un contrôle des transhumances transfrontalières et des importations de bétail.
- ✓ Le développement de vaccins contre les tiques qui constituent une alternative écologique pour se protéger contre les maladies transmises par les tiques.

En outre, d'autres études à plus large échelle sont aussi nécessaires afin de surveiller la dynamique de transmission de l'infection à *A. marginale* et de la maladie clinique qu'elle cause en identifiant, en plus, les vecteurs potentiellement incriminés et les réservoirs impliqués dans la circulation d'*A. marginale* dans le pays.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adjou Moumouni, P. F., Aboge, G. O., Terkawi, M. A., Masatani, T., Cao, S., Kamyingkird, K., Jirapattharasate, C., Zhou, M., Wang, G., Liu, M., Iguchi, A., Vudriko, P., Ybanez, A. P., Inokuma, H., Shirafuji-umemiya, R., Suzuki, H., & Xuan, X. (2015). Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. *Parasites & Vectors*, 1–14. https://doi.org/10.1186/s13071-015-1106-9
2. Ait Hamou, A., Rahali, T., Sahibi, H., Belghyti, D., Losson, B., Goff, W., & Rhalem, A. (2012). Research in Veterinary Science Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle of North Central Morocco. *Research in Veterinary Science*, **93**(3), 1318–1323. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.02.016
3. Ait Lbacha, H., Alali, S., Zouagui, Z., Mamoun, L. El, Rhalem, A., Petit, E., Haddad, N., Gandoin, C., Boulouis, H. J., & Maillard, R. (2015). High Prevalence of *Anaplasma spp* . in Small Ruminants in Morocco. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–14. https://doi.org/10.1111/tbed.12366
4. Aktas, M., Altay, K., & Dumanli, N. (2011). Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **2**(1), 62–65. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.11.002
5. Aktas, M., & Çolak, S. (2020). Molecular detection and phylogeny of *Anaplasma spp*. in cattle reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Turkey. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1–25. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101604
6. Aktas, M., & Ozubek, S. (2020). Genetic diversity of major surface protein 1a of *Anaplasma marginale* in dairy cattle. *Infection, Genetics and Evolution*, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104608
7. Aktas, M., & Özübek, S. (2017). Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of Anaplasma marginale in a dairy cattle. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **54**(July), 20–26. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.07.008
8. AL Hosary, A., Răileanu, C., Tauchmann, O., Fischer, S., Nijhof, A. M., & Silaghi, C. (2020). Epidemiology and genotyping of *Anaplasma marginale* and coinfection with piroplasms and other Anaplasmataceae in cattle and buffaloes from Egypt. *Parasites & Vectors*, 1–11. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04372-z
9. Alonso, B. I., Ventura, E. S., Esteves, E., Galletti, G. F. B. M., Dall'Agnol, B., Martins, R., Klafke, G., Reck, J., Fogaça, A. C., & Daffre, S. (2020). A tick cell line as a powerful tool to screen the antimicrobial susceptibility of the tick-borne pathogen *Anaplasma marginale*. *Experimental Parasitology*, 1–25. https://doi.org/10.21203/rs.2.9604/v1

10. Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V. H., Cordoves, C. O., Guglielmone, A. A., Kessler, R., Mangold, A. ., Nari, A., Patarroyo, J. ., Solari, M. A., Vega, C. A., Vizcaino, O., & Camus, E. (1992). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean *. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, **11**(3), 713–733. https://doi.org/10.20506/rst.11.3.623.

11. Ameen, K. A. H., Abdullah, B. A., & Abdul-Razaq, R. . (2012). Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil, Iraq. *Iraqi Journal Of Veterinary Sciences*, **26**, 109–114.

12. Andolsi, R. (2020). Dépistage moléculaire d'Anaplasma marginale chez les bovins et leurs tiques associées du nord de la Tunisie, caractérisation phylogéographique des isolats révélés et évaluation de la conservation de la protéine ompA candidate au vaccin. Mémoire de Mastère de Recherche, Institut de biotechnologie de Sidi Thabet.

13. Araújo, F. R., Melo, V. S. P., Ramos, C. A. N., Madruga, C. R., Soares, C. O., Kessler, R. H., Almeida, N. F., Araújo, G. S., Alves, L. C., Torres Junior, R. A., Fragoso, S. P., Arauco, P. R. C., Bacanelli, G., Oliveira, M. B., & Santos, L. R. (2005). Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**(7), 765–769. https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000700016

14. Araújo, T. R., Junior, M. A. L. M., Vilela, T. S., Bittecourt, A. J., Santos, H. A., & Fampa, P. (2020). First report of the presence of *Anaplasma marginale* in different tissues of the stable-fly *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) in Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **23**(November). https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100515

15. Atif, F A, Khan, M. S., Muhammad, F., & Ahmad, B. (2013). Sero-epidemiological study of *Anaplasma marginale* among cattle. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **23**(3), 740–744.

16. Atif, Farhan Ahmad. (2015). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Journal of Parasitology Research*. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2

17. Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, **58**, 1–30. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x

18. Awad, H., Antunes, S., Galindo, R. C., do Rosario, V. E., De la Fuente, J., Domingos, A., & El Hussein, A. M. (2011). Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Veterinary Parasitology*, **181**(2–4), 146–152. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.007

19. Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., & Duvallet, G. (2013). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. https://doi.org/10.1051/parasite/2013026

20. Barbosa da Silva, J., Da Fonseca, H. A., & Barbosa, J. D. (2015). Molecular characterization of *Anaplasma marginale* in ticks naturally feeding on buffaloes. *Infection, Genetics and Evolution*, **35**, 38–41. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.027

21. Battilani, M., Arcangeli, S. De, Balboni, A., & Dondi, F. (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution*. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.021

22. Belkahia, H., Ben Said, M., Alberti, A., Abdi, K., Issaoui, Z., Hattab, D., Gharbi, M., & Messadi, L. (2015 a). First molecular survey and novel genetic variants ' identification of *Anaplasma marginale*, *A. centrale* and *A. bovis* in cattle from Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, **34**, 361–371. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.06.017

23. Belkahia, H., Ben Said, M., El Hamdi, S., Yahiaoui, M., Gharbi, M., Daaloul-Jedidi, M., Mhadhbi, M., Jedidi, M., Aziz, D. M., Klabi, I., Zribi, L., & Messadi, L. (2014). First molecular identification and genetic characterization of *Anaplasma ovis* in sheep from Tunisia. *Small Ruminant Research*. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.07.009

24. Belkahia, H., Ben Said, M., Sayahi, L., Alberti, A., & Messadi, L. (2015 b). Detection of novel strains genetically related to *Anaplasma platys* in Tunisian one-humped camels (Camelus dromedarius). *The Journal of Infection in Developing Countries*, **10**(9), 1117–1125. https://doi.org/10.3855/jidc.6950

25. Belkahia, H., Ben Said, M., El Mabrouk, N., Saidani, M., Cherni, C., Ben Hassen, M., Bouattour, A & Messadi, L. (2017). First longitudinal field study reveals spatio-temporal variations and genetic diversity of *Anaplasma spp*. in cattle from the North of Tunisia *Veterinary Microbiology* **208** (223-230). doi: 10.1016/j.vetmic.2017.08.004

26. Bell-sakyi, L., Palomar, A. M., Bradford, E. L., & Shkap, V. (2015). Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Veterinary Microbiology*, **179**(3–4), 270–276. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.008

27. Ben Said, M., Belkahia, H., & Messadi, L. (2018a). *Anaplasma spp* . in North Africa : A review on molecular epidemiology, associated risk factors and genetic characteristics. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **9**(3), 543–555. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.003

28. Ben Said, M., Belkahia, H., Selmi, R., & Messadi, L. (2019). Computational selection of minimum length groESL operon required for *Anaplasma* species attribution and strain diversity analysis. *Molecular and Cellular Probes*. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101467

29. Ben Said, M., Ben Asker, A., Belkahia, H., Ghribi, R., Selmi, R., & Messadi, L. (2018b). Genetic characterization of *Anaplasma marginale* strains from Tunisia using single and multiple gene typing reveals novel variants with an extensive genetic diversity. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.008

30. Ben Said, M., Hanène, B., El Mabrouk, N., Saidani, M., Ben Hassen, M., Zobba, R., Bouattour, S., Bouattour, A., & Messadi, L. (2017). Molecular typing and diagnosis of *Anaplasma spp*. closely related to A. phagocytophilum in ruminants from Tunisia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.01.005

31. Bilgiç, H. B., Karagenç, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., & Weir, W. (2013). Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Experimental Parasitology*, **133**, 222–229. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.005

32. Boularias, G., Azzag, N., Galon, C., Šimo, L., Boulouis, H., & Moutailler, S. (2021). High-Throughput Microfluidic Real-Time PCR for the Detection of Multiple Microorganisms in Ixodid Cattle Ticks in Northeast Algeria. *Pathogens*, **10**.

33. Boulouis, H., Lagrée, A., Dugat, T., & Haddad, N. (2015). Les animaux vertébrés et les maladies dues à des bactéries vectorisées par les tiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 77–87.

34. Brayton, K. A., Kappmeyer, L. S., Herndon, D. R., Dark, M. J., Tibbals, D. L., Palmer, G. H., Mcguire, T. C., & Knowles, D. P. (2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(3), 844–849.

35. Byaruhanga, C., Collins, N. E., Knobel, D. L., Khumalo, Z. T. H., Chaisi, M. E., & Oosthuizen, M. C. (2018). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* amongst transhumant cattle in north-eastern Uganda. *Tick and Tick Born Diseases*.

36. Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E., Mari, V., Ceci, L., & Buonavoglia, C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, **124**, 107–114. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.022

37. Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L., & Sykes, J. E. (2009). Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **23**, 1129–1141. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x

38. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2008). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *The Journal of Microbiological Methods*, **69**(2), 330–339. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005.A

39. Coetzee, J. F., Schmidt, P. L., Apley, M. D., Reinbold, J. B., & Kocan, K. M. (2007). Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. *American Journal of Veterinary Research*, **68** (8). https://doi.org/10.2460/ajvr.68.8.872

40. Costa, S. C. L., De Magalhaes, V. C. S., De oliveira, U. V., Carvalho, F. S., De almeida, C. P., Machado, R. Z., & Munhoz, A. D. (2016). Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens : Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **7**(2), 270–275. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.001

41. Curtis, A. K., & Coetzee, J. F. (2021). Assessment of within-herd seroprevalence of *Anaplasma marginale* antibodies and associated decreased milk production in an Iowa dairy herd. *Applied Animal Science*, **37**(2), 126–131. https://doi.org/10.15232/aas.2020-02110

42. Curtis, A. K., Reif, K. E., & Kleinhenz, M. D. (2019). Development of a subcutaneous ear implant to deliver an anaplasmosis vaccine to dairy steers. *Journal of Animal Science*. https://doi.org/10.1093/jas/skz392.

43. Dahmani, M., Davoust, B., Sambou, M., Bassene, H., Scandola, P., Ameur, T., Raoult, D., Fenollar, F., & Mediannikov, O. (2019). Molecular investigation and phylogeny of species of the *Anaplasmataceae* infecting animals and ticks in Senegal. *Parasites & Vectors*, 1–15. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3742-y

44. Dahmani, M., Davoust, B., Tahir, D., Raoult, D., Fenollar, F., & Mediannikov, O. (2017). Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasmataceae* species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. *Parasites & Vectors*, 1–12. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2233-2

45. Dantas-torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). A One Health perspective. *Trends in Parsitology*, **28**(10), 437–446. https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003

46. de la Fuente, J, Garcia-Garcia, J. ., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2001a). Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *International Journal for Parasitology*, **31**(2), 145–153. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00162-4.

47. de la Fuente, J, Garcia-garcia, J. C., Blouin, E. F., Rodriguez, S. D., García, M. A., & Kocan, K. M. (2001b). Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Animal Health Research Reviews*, **2**(2), 163–173. https://doi.org/10.1079/AHRR200132

48. de la Fuente, J, & Merino, O. (2013). Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine*, *31*(50), 5923–5929. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.049

49. Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P. J., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. (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 co. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(6), 2145–2165. https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145

50. Durrani, A. Z., & Goyal, S. M. (2012). A retrospective study of *Anaplasma* in Minnesota cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **36**(2), 131–136. https://doi.org/10.3906/vet-1012-632

51. Ekici, O. D., & Sevinc, F. (2011). Comparison of cELISA and IFA tests in the serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. *African Journal of Microbiology Research*, **5**(10), 1188–1191. https://doi.org/10.5897/AJMR11.007

52. El-ashker, M., Hotzel, H., Gwida, M., El-beskawy, M., Silaghi, C., & Tomaso, H. (2015). Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Veterinary Parasitology*, **207**(3–4), 329–334. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.025

53. Estrada-peña, A., Naranjo, V., Acevedo-whitehouse, K., Mangold, A. J., Kocan, K. M., & De la Fuente, J. (2009). pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC Biology*, **13**, 1–13. https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-57

54. Fernandes, S. D. J., Matos, C. A., Freschi, C. R., Ramos, I. A. D. S., Machado, R. Z., & André, M. R. (2019). Diversity of *Anaplasma* species in cattle in Mozambique. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **10**(3), 651–664. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.012

55. Futse, J. E., Ueti, M. W., Knowles, D. P., & Palmer, G. H. (2003). Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of Vector Competence in the Absence of Vector-Pathogen Interaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(8), 3829–3834. https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3829

56. Gasquet, C. (2014). Etude d'un foyer d'Anaplasmose bovine dans le département de la Loire. *Thése Vétérinaire*.

57. George, N., Bhandari, V., & Sharma, P. (2016). Phylogenetic relationship and genotypic variability in *Anaplasma marginale* strains causing anaplasmosis in India. *Infection, Genetics and Evolution*. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.028

58. Giglioti, R., Bassetto, C. C., Okino, C. H., De Oliveira, H. N., & Oliveira, M. C. de S. (2018). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Anaplasma marginale*. *Experimental and Applied Acarology*. https://doi.org/10.1007/s10493-018-0327-y

59. Gioia, G. V, Vinueza, R. ., Marsot, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., Boulouis, H.-J., Moutailler, S., Coello, M. A., Gondard, M., Bournez, L., Haddad, N., & Zanella, G. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transboundary and Emerging Diseases*. https://doi.org/10.1111/tbed.12866

60. Guillemi, E. C., DE la Fourniere, S., Orozco, M., Pena Martinez, J., Correa, E., Fernandez, J., Arias, L. L., Paoletta, M., Corona, B., Pinarello, V., Wilkowsky, S. E., & Farber, M. D. (2016). Molecular identification of *Anaplasma marginale* in two autochthonous South American wild species revealed an identical new genotype and its phylogenetic relationship with those of bovines. *Parasites & Vectors*, 1–9. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1555-9

61. Guillemi, E. C., Ruybal, P., Lia, V., Gonzalez, S., Lew, S., Zimmer, P., Lopez, L., Rodriguez, J. L., Rodriguez, S. Y., Frutos, R., Wilkowsky, S. E., & Farber, M. D. (2015a). Development of a Multilocus Sequence Typing scheme for the study of *Anaplasma marginale* population structure over space and time. *Infection, Genetics and Evolution*, **30**, 186–194. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.027

62. Guillemi, E. C., Tomassone, L., & Farber, M. D. (2015b). Tick-borne Rickettsiales : Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, **119**, 87–97. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.009

63. Hebert, K., Seidman, D., Oki, A., Jerilyn, I., Emani, S., Oliver, L. D., Miller, D. P., Tegels, B. K., Kannagi, R., Marconi, R. T., & Carlyon, J. A. (2017). *Anaplasma marginale* Outer Membrane Protein A Is an Adhesin That Recognizes Sialylated and Fucosylated Glycans and Functionally Depends on an Essential Binding Domain. *Inf. Immun.*, **85**(3), 1–16.

64. Hornok, S, Micsutka, A., Mera, I. G. F. De, Meli, M. L., Gönczi, E., Tánczos, B., Mangold, A. J., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann-Lehman, R., & De la fuente, J. (2012). Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Research in Veterinary Science*, **92**, 30–35. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.011

65. Hornok, Sandor, Foldvari, G., Elek, V., Naranjo, V., Farkas, R., & De la Fuente, J. (2008). Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera : Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari : Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, **154**, 354–359. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.019

66. Hove, P., Brayton, K. A., Liebenberg, J., Pretorius, A., Oosthuizen, M. C., Noh, S. M., & Collins, N. E. (2020). Diseases *Anaplasma marginale* outer membrane protein vaccine candidates are conserved in North American and South African strains. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101444

67. Hove, P., Chaisi, M. E., Brayton, K. A., Ganesan, H., Catanese, H. N., Mtshali, M. S., Mutshembele, A. M., Oosthuizen, M. C., & Collins, N. E. (2018). Co-infections with multiple genotypes of *Anaplasma marginale* in cattle indicate pathogen diversity. *Parasites & Vectors*. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2595-5

68. Jaimes-dueñez, J., Triana-chávez, O., & Mejía-jaramillo, A. M. (2018). Genetic, host and environmental factors associated with a high prevalence of *Anaplasma marginale*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **52**, 1286–1295. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.009

69. Knowles, D., Torioni, S., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D., & McELWAIN, T. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 Epitope Common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently Infected Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(9), 2225–2230.

70. Kocan, K M, De la Fuente, J. osé, Blouin, E. F., & Garcia-Garcia, J. . (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) : recent advances in defining host – pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, **129**, 285–300. https://doi.org/10.1017/S0031182003004700

71. Kocan, K M, Blouin, E. F., & Barbet, A. F. (2006). Anaplasmosis Control Past, Present and Future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 501–509. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05329.x.

72. Kocan, K M, De la fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2008). The Natural History of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012

73. Kocan, K M, De la Fuente, J., Guglielmone, A., & Melendez, R. D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**(4), 698–712. https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698

74. Kocan, K M, Goff, W. L., Stiller, D., Claypool, P. L., Edwards, W., Ewing, S. A., Hair, J. A., & Barron, S. J. (1992). Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in Male Dermacentor andersoni (Acari : Ixodidae) Transferred Successively from Infected to Susceptible Calves. *Annals of the Entomological Society of America*, **29**(4), 657–668.

75. Kubelová, M., Mazancová, J., & Široký, P. (2010). *Theileria*, *Babesia*, and *Anaplasma* detected by PCR in ruminant herds at Bié Province, Angola. *Parasite*, **19**, 417–422. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2012194417

76. Kuttler, K. L. (1984). Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: A review. *Journal of Wildlife Diseases*, **20**(1), 12–20. https://doi.org/10.7589/0090-3558-20.1.12.

77. Liu, Z., Ma, M., Wang, Z., Wang, J., Peng, Y., Li, Y., Guan, G., Luo, J., & Yin, H. (2012). Molecular Survey and Genetic Identification of *Anaplasma* Species in Goats from Central and Southern China. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(2), 464–470. https://doi.org/10.1128/AEM.06848-11

78. M'ghirbi, Y., Bèji, M., Oporto, B., Khrouf, F., Hurtado, A., & Bouattour, A. (2016). *Anaplasma marginale* and *A . phagocytophilum* in cattle in Tunisia. *Parasites & Vectors*, 1–8. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1840-7

79. M'ghirbi, Y., Yaïch, H., Ghorbel, A., & Bouattour, A. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Tunisia. *Parasites & Vectors*, 1–7. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-180

80. Madruga, C. R., Marques, A. P. C., Leal, C. R. B., Carvalho, C. M. E., Araújo, F. R., & Kessler, R. H. (2000). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, **20**(3), 109–112. https://doi.org/:10.1590/S0100-736X2000000300004

81. Maiden, M. C. J. (2006). Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **60**, 561–588. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325

82. Molad, T., Mazuz, M. L., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitsky, I., Krigel, Y., Leibovitz, B., Molloy, J., Jongejan, F., & Shkap, V. (2006). Molecular and serological detection of *A . centrale* - and *A . marginale* -infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinary Microbiology*, **113**, 55–62. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.026

83. Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Hofle, U., De mera, I. G. F., Villanua, D., Almazan, C., Kocan, K. M., Gortazar, C., & De la Fuente, J. (2006). Molecular Epidemiology of Human and Bovine Anaplasmosis in Southern Europe Molecular Epidemiology of Human and Bovine Anaplasmosis in Southern Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1078**, 95–99. https://doi.org/10.1196/annals.1374.013

84. Nguyen, A. H. L., Tiawsirisup, S., & Kaewthamasorn, M. (2020). Molecular detection and genetic characterization of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys -like* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in water buffalo from eight provinces of Thailand. *BMC Veterinary Research*, 1–12. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12917-020-02585-z

85. Noaman, V., & Shayan, P. (2010). A new PCR-RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S rRNA A new PCR-RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on *16S rRNA*. *Veterinary Research Communications*, **34**, 43–50. https://doi.org/10.1007/s11259-009-9331-3

86. Obsomer, V., Wirtgen, M., Linden, A., Claerebout, E., Heyman, P., Heylen, D., Madder, M., Maris, J., Lebrun, M., Tack, W., Lempereur, L., Hance, T., & Impe, G. Van. (2013). Spatial disaggregation of tick occurrence and ecology at a local scale as a preliminary step for spatial surveillance of tick-borne diseases : general framework and health implications in Belgium. *Parasites & Vectors*, 1–19. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-190

87. Parola, P., Roux, V., Camicas, J.-L., Baradji, I., Brouqui, P., & Raoult, D. (2000). Detection of *ehrlichiae* in African by polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**, 707–708. https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90243-8.

88. Passos, L. M. F. (2012). In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A . phagocytophilum* in tick cell lines : a review. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, **21**(2), 81–86. https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200002

89. Peter, S. G., Aboge, G. O., Kariuki, H. W., Kanduma, E. G., Gakuya, D. W., Maingi, N., Mulei, C. M., & Mainga, A. O. (2020). Molecular prevalence of emerging *Anaplasma* and *Ehrlichia* pathogens in apparently healthy dairy cattle in peri- urban Nairobi, Kenya. *BMC Veterinary Research*, 1–12. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12917-020-02584-0

90. Pothmann, D., Poppert, S., Rakotozandrindrainy, R., Hogan, B., Mastropaolo, M., Thiel, C., & Silaghi, C. (2016). Prevalence and genetic characterization of *Anaplasma marginale* in zebu cattle (*Bos indicus*) and their ticks (*Amblyomma variegatum*, Rhipicephalus *microplus*) from Madagascar. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.013

91. Radwan, M. E. ., Ali, A. F., & Abd el Hamied, O. (2013). Epidemiological studies and Molecular Diagnosis of *Anaplasma marginale* in Cattle and Biochemical Changes Associated with it in Kaliobia Governorate. *American Journal of Research Communication*, **1**(4), 247–260. https://doi.org/10.12691/ajidm-1-3-2

92. Rajput, Z. I., Song-hua, H. U., Arijo, A. G., Habib, M., & Khalid, M. (2005). Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, **11**, 1057–1062. https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1057

93. Rjeibi, M. R., O, A., Rekik, M., & Gharbi, M. (2017). Molecular survey and genetic characterization of *Anaplasma centrale*, *A . marginale* and *A . bovis* in cattle from Algeria. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–9. https://doi.org/10.1111/tbed.12725

94. Rodriguez, K., Garcia, M. V., Bonatte Junior, P., Oliveira, P., Souza de Higa, L. oliveira, Csordas, B. G., Barros, J. C., & Andreotti, R. (2020). Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, **81**(4), 585–598. https://doi.org/10.1007/s10493-020-00514-1

95. Rogério, M., Calchi, A. C., Herrera, H. M., Zanatto, D. carlos de souza, Horta, B. de carvalho le sénéchal, Tasso, J. B., Ramos, I. A. de souza, De mello, V. valente califre, & Machado, R. Z. (2020). The co-infection with *Ehrlichia minasensis*, *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys* is not associated with anemia in beef cattle in the Brazilian Pantanal. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, **21**. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100437

96. Saetiew, N., Simking, P., Saengow, S., Morand, S., Desquesnes, M., Stich, R. W., & Jittapalapong, S. (2020). Spatial and seasonal variation in the prevalence of *Anaplasma marginale* among beef cattle in previously flooded regions of Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, **54**(4), 355–362.

97. Said, Y., Lahmar, S., Dhibi, M., Rjeibi, M. R., Jdidi, M., & Gharbi, M. (2021). First survey of ticks, tick-borne pathogens (*Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia*) and Trypanosoma evansi in protected areas for threatened wild ruminants in Tunisia Parasitology International First survey of ticks, tick-borne pathogens (*Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia*) and *Trypanosoma evansi* in protected areas for threatened wild ruminants in Tunisia. *Parasitology International*, **81**(February), 102275. https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102275

98. Sarli, M., Novoa, M. B., Mazzucco, M. N., Morel, N., Primo, M. E., De Echaide, S. T., & Echaide, I. E. (2021). Regional Studies and Reports Efficacy of long-acting oxytetracycline and imidocarb dipropionate for the chemosterilization of *Anaplasma marginale* in experimentally infected carrier cattle in Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, **23**. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100513

99. Sarli, M., Thompson, C. S., Novoa, M. B., Valentini, B. S., Mastropaolo, M., Echaide, I. E., De Echaide, S. T., & Primo, M. E. (2020). Development and evaluation of a double-antigen sandwich ELISA to identify *Anaplasma marginale* – infected and *A. centrale* – vaccinated cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **32**(1), 70–76. https://doi.org/10.1177/1040638719892953

100. Scoles, G. A., Broce, A. B., & Lysyk, T. J. (2005). *Relative Efficiency of Biological Transmission of Anaplasma marginale (Rickettsiales : Anaplasmataceae) by Dermacentor andersoni (Acari : Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by Stomoxys calcitrans (Diptera : Muscidae)*. *Journal of Medical Entomology,* **42***(4), 668*–675. http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0668:REOBTO]2.0.CO;2

101. Selmi, R., Dhibi, M., Ben Said, M., & Mhadhbi, M. (2019). Evidence of natural infections with *Trypanosoma*, *Anaplasma* and *Babesia spp* . in military livestock from Tunisia Evidence of natural infections with *Trypanosoma*, *Anaplasma* and *Babesia spp* . in military livestock from. *Tropical Biomedicine*, **36**(3), 742–757.

102. Sharma, A., Singla, L. Das, Kaur, P., Bal, M. S., Batth, K., & Juyal, P. D. (2013). Prevalence and haemato-biochemical profile of *Anaplasma marginale* infection in dairy animals of Punjab (India). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **6**(2), 139–144. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60010-3

103. Shebish, E., Vemulapalli, R., & Oseto, C. (2012). Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, **188**(1–2), 164–167. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.009

104. Shen, Z., Zhang, M. Z., Stich, R. W., Mitchell, W. J., & Zhang, S. (2018). Development of a tick-borne pathogen QPCR panel for detection of *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* and Lyme disease *Borrelia* in animals. *Journal of Microbiological Methods*, **151**(March), 83–89. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.05.019

105. Silaghi, C., Santos, A. S., Gomes, J., Christova, I., Matei, I. A., Walder, G., Domingos, A., Bell-sakyi, L., Sprong, H., Loewenich, F. D. Von, Oteo, josé A., De la Fuente, J., & Dumler, J. S. (2017). Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma spp* . *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **17**(1). https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1960

106. Silva, J. B., Cabezas-cruz, A., Fonseca, A. H., Barbosa, J. D., & De la Fuente, J. (2014). Infection of water buffalo in Rio de Janeiro Brazil with *Anaplasma marginale* strains also reported in cattle. *Veterinary Parasitology*. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.009

107. Sisson, D., Hufschmid, J., Jolles, A., Beechler, B., & Jabbar, A. (2017). Molecular characterisation of *Anaplasma* species from African buffalo (Syncerus caffer) in Kruger National Park, South Africa. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.01.003

108. Soledad, M., López Arias, L., De la Fournière, S., Guillemi, E. C., Luciani, C., Sarmiento, N. F., Mosqueda, J., Farber, M. D., Wilkowsky, S. E., & Elizabeth, S. (2017). Epidemiology of *Babesia*, *Anaplasma* and *Trypanosoma* species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.011

109. Tana-hernández, L., Navarrete-arroyo, K., Ron-román, J., Reyna-bello, A., & Chávez-larrea, M. A. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*, 1–7. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1311-1

110. Theiler, A. (1910). Gall-sickness of South Africa. (Anaplasmosis of Cattle.). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, **23**, 98–115. https://doi.org/10.1016/S0368-1742(10)80028-1

111. Torina, A., Agnone, A., Blanda, V., Alongi, A., D'Agostino, R., Caracappa, S., Marino, A. M. F., Di Marco, V., & De la Fuente, J. (2012). Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **3**, 282–286. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.033

112. Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-pen, A., Vicente, J., Scimeca, S., Marino, A. M. F., Salina, F., & Caracappa, S. (2008). *Prevalence and Genotypes of Anaplasma Species and Habitat Suitability for Ticks in a Mediterranean Ecosystem*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(24), 7578–7584. https://doi.org/10.1128/AEM.01625-08

113. Torioni De Echaide, S., Knowles, D. P., Guire, T. C. M. C., Palmer, G. U. Y. H., Suarez, C. E., & Elwain, T. F. M. C. (1998). Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(3), 777–782.

114. Uilenberg, G., & Gharbi, M. (2004). Les Rickettsioses des ruminants domestiques transmises par les tiques: elements taxonomiques et diagnostic de laboratoire. *Archives de l'institut Pasteur de Tunis*, **81**, 1–4.

115. Yang, J., Han, R., Liu, Z., Niu, Q., Guan, G., Liu, G., Luo, J., & Yin, H. (2017). Insight into the genetic diversity of *Anaplasma marginale* in cattle from ten provinces of China. *Parasites & Vectors*, 1–7. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2485-x

116. Ybañez, A. P., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Battur, B., Altangerel, K., Matsumoto, K., Yokoyama, N., & Inokuma, H. (2012). Specific Molecular Detection and Characterization of *Anaplasma marginale* in Mongolian Cattle. *Journal of Veterinary Science*, **4**, 399–406. https://doi.org/10.1292/jvms.12-0361

117. Ybañez, A. P., Ybañez, R. H. D., Claveria, F. G., Cruz-flores, M. J., Xuenan, X., Yokoyama, N., & Inokuma, H. (2014). High Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* Detected from Philippine Cattle. *Journal of Veterinary Science*, **76**(7), 1009–1014. https://doi.org/10.1292/jvms.13-0405

118. Zeb, J., Shams, S., Din, I. U., Ayaz, S., Khan, A., Nasreen, N., Khan, H., Khan, M. A., & Senbill, H. (2020). Veterinary Parasitology Molecular epidemiology and associated risk factors of *Anaplasma marginale* and *Theileria annulata* in cattle from North-western Pakistan. *Veterinary Parasitology*, **279**. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109044

119. Zivkovic, Z., Esteves, E., Almazán, C., Daffre, S., Nijhof, A. M., Kocan, K. M., Jongejan, F., & De la Fuente, J. (2010). Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. *BMC Genomics*, 1–12. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-186

120. Zivkovic, Z., Nijhof, A. M., De la Fuente, J., Kocan, K. M., & Jongejan, F. (2007). Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Veterinary Research*, **6**, 1–6. https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-32

WEBOGRAPHIE

121. http://www.givlait.com.tn/.

122. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

123. http://www.omafra.gov.on.ca/.

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE VETERINAIRE DE SIDI THABET

THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE VETERINAIRE

Titre : Surveillance moléculaire et caractérisation phylogéographique d'*Anaplasma marginale* chez des bovins en Tunisie.

Nom et prénom : Meriem BEN ABDALLAH

Directeur de thèse : Pr. Lilia MESSADI

Co-directeur de thèse : Dr. Mourad BEN SAID

Discipline : Microbiologie et Immunologie

Date de soutenance : 29 /06 /2021

Mots clés : *Anaplasma marginale*, Anaplasmose bovine, Bovins, Surveillance moléculaire, Caractérisation phylogéographique, Tunisie

Références bibliographiques : 123

Résumé :

L'anaplasmose bovine est une maladie à transmission vectorielle due essentiellement à l'infection des érythrocytes par l'espèce *Anaplasma marginale*.

La première partie de cette étude expose les données de la littérature disponibles concernant l'anaplasmose en évoquant les principales caractéristiques d'*A. marginale*, les différents outils de détection et de caractérisation moléculaire, ainsi que les différents moyens de lutte.

La deuxième partie est consacrée à la détection moléculaire d'*A. marginale* chez 545 bovins apparemment sains appartenant à des élevages répartis du nord au sud de la Tunisie. Une PCR spécifique à base du gène *msp4* a permis de confirmer l'infection de quatorze bovins (2,57%) par *A. marginale*. L'analyse du marqueur phylogéographique *lipA* a indiqué une grande diversité des isolats tunisiens d'*A. marginale* par rapport aux autres isolats disponibles dans différents pays du monde, probablement en raison d'introduction multiples de bovins infectés de diverses origines.

Tous ces résultats doivent être pris en considération afin d'optimiser encore plus le programme national de lutte contre les maladies à transmission vectorielle.

NATIONAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE OF SIDI TAHBET

DOCTORAL THESIS IN VETERINARY MEDICINE

Title: Molecular survey and phylogeographic characterization of *Anaplasma marginale* in cattle from Tunisia.

Full Name: Meriem BEN ABDALLAH

Supervisor: Pr. Lilia MESSADI

Co-supervisor: Dr. Mourad BEN SAID

Discipline: Microbiology and Immunology

Defense date: 29 /06 /2021

Key words: *Anaplasma marginale,* Bovine anaplasmosis, Cattle, Molecular survey, Phylogeographic characterization, Tunisia

References: 123

Abstract:

Bovine anaplasmosis is a vector-borne disease caused primarily by infection of erythrocytes with *Anaplasma marginale* species.

The first part of this study presents the main data from the literature concerning anaplasmosis by evoking the main characteristics of *A. marginale* as well as the various tools for its detection, molecular characterization, and control.

The second part is devoted to the molecular detection of *A. marginale* in 545 apparently healthy cattle belonging to farms spread from north to south of Tunisia. A specific PCR based on the *msp4* gene confirmed the infection of fourteen cattle (2,57%) with *A. marginale*. Analysis of the *lipA* phylogeographic marker indicated a great diversity of Tunisian isolates of *A. marginale* compared to other worldwide isolates, possibly due to multiple introductions of infected cattle from different origins.

All of these results must be taken into account in order to further optimize the national vector-borne disease control program.

المدرسة الوطنية للطب البيطري بسيدي ثابت - تونس

أطروحة دكتوراه في الطب البيطري

العنوان: المسح الجزيئي والتوصيف الجغرافي لإنابلازما مرجينالي عند الأبقار في تونس

الاسم الكامل: مريم بن عبد الله

المشرف: الأستاذة ليليا مسعدي

المشرف المساعد: الدكتور مراد بن سعيد

الاختصاص: علم الاحياء الدقيقة والمناعة

التاريخ: 2021/06/29

المفاتيح: أنابلازما مرجينالي، أنابلازما الأبقار، ابقار، المسح الجزيئي، التوصيف الجغرافي، تونس

المراجع: 123

الملخص:

أنابلازما الأبقار هو مرض ينتقل عن طريق القراد والحشرات وينتج بشكل أساسي عن عدوى كريات الدم الحمراء بانابلازما مرجينالي.

يقدم الجزء الأول من هذه الدراسة البيانات الرئيسية من الأدبيات المتعلقة بمرض أنابلازما من خلال استحضار الخصائص الرئيسية لإنابلازما مرجينالي وكذلك الأدوات المختلفة لاكتشافها وتوصيفها الجزيئي، للوصول أخيرًا إلى وسائل الوقاية المختلفة.

الجزء الثاني مخصص للكشف الجزيئي عن أنابلازما مرجينالي عند 545 رأس بقر تبدو بصحة جيدة تنتمي إلى مزارع منتشرة من شمال إلى جنوب تونس. أكد تفاعل البوليميراز المتسلسل المعتمد على جين مسب4 إصابة أربعة عشر رأس بقر (2.57٪) بانابلازما مرجينالي. أشار تحليل الجين ليب أ المعتمد في التوصيف الجغرافي إلى تنوع كبير في السلالات التونسية لإنابلازما مرجينالي مقارنة بالسلالات الأخرى في جميع أنحاء العالم، ربما بسبب الإدخال المتعدد للأبقار المصابة من أصول مختلفة.

يجب أخذ كل هذه النتائج في الاعتبار من أجل زيادة تحسين البرنامج الوطني لمكافحة الأمراض المنقولة عن طريق القراد والحشرات.