

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES AGRICOLES

FICHE TECHNIQUE

Bactéries de la famille des anaplasmataceae dans deux zones écologiques (Niayes et Ziguinchor) du Sénégal.

INTRODUCTION

Les maladies du bétail transmises par les tiques sont variées, parmi lesquelles la cowdriose et l'anaplasmose. La cowdriose, est introduite aussi à Madagascar (**Uilenberg, 1971**) et aux Antilles, lors d'importations de bétail africain porteur de la tique vectrice. Les études menées sur *Amblyomma variegatum* et la cowdriose aux Antilles ont contribué à en évaluer le danger potentiel pour le continent américain (**Camus & Barre, 1987, 1989**).

Au Sénégal, dans la zone des Niayes, afin de développer la production laitière dans cette zone périurbaine, une lutte a été menée contre les rickettsioses animales et les vecteurs dont *Amblyomma variegatum* durant plusieurs années consécutives (**Fabricius, 1794**). Les adultes d'*Amblyomma variegatum* infestent les bovins principalement, mais aussi les petits ruminants, les équidés, les porcins et les ruminants sauvages (**Chartier et al., 2000**).

Amblyomma variegatum est très présent au Sénégal (**Sylla et al., 2007**). Les pertes enregistrées sur le bétail importé et la suspicion des ehrlichioses comme cause de mortalité ont conduit à un suivi plus attentif de cette affection diagnostiquée auparavant dans la zone.

Les anaplasmoses sont des infections non contagieuses, maladies des ruminants causées par la rickettsie intra érythrocytaire, *Anaplasma* spp.

La transmission est assurée par les tiques telles *Dermacentor andersoni*. Les anaplasmoses dues à certaines espèces d'*Anaplasma* spp peuvent être identifiées actuellement grâce aux progrès réalisés par l'outil moléculaire.

Nord USA, *Dermacentor andersoni* infecté peut transmettre la maladie aux animaux domestiques (**Stiller et al., 1989**). L'infection des animaux domestiques par *Anaplasma* spp, peut être caractérisée par l'anémie, la dépression, l'anorexie et même la mort (**Weinman & Ristic, 1968**).

En Europe, *Anaplasma ovis* a été identifié pour la première dans des populations de rennes en Mongolie en 2005 (Haigh *et al.*, 2008). *Anaplasma ovis* est aussi isolé chez les moutons et les chèvres sauvages dans cette même région.

Au Sénégal, Epizooties d'anaplasmose bovine ont été notées dans la zone sahélienne (Louga). L'isolements de ces rickettsies ont été réalisés à partir de prélèvements de sang de moutons suspects (Gueye *et al.*, 1984). L'Outil moléculaire jamais utilisé dans l'identification des ces bactéries pourrait être une opportunité.

L'Objectif de cette étude est une caractérisation par les méthodes classiques moléculaires de différentes souches bactériennes de la famille des Anaplasmataceae dans deux zones écologiques du Sénégal (Niayes et Nord guinéenne) afin d'en préciser la variabilité spatiale pour une meilleure maîtrise de la biodiversité phénotype et une meilleure connaissance identité de ces souches.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le matériel utilisé au cours de cette étude est très diversifié et comprend :

Matériel biologique

- Les animaux

Les animaux sur lesquels cette étude est réalisée sont des petits ruminants (ovins) au nombre de 140 qui proviennent de la zone des Niayes (Villages de Niague, Pout et de Keur Mbir Ndao), et de la zone nord guinéenne (Village de Badiouré à Ziguinchor) où les tiques vectrices connaissent une distribution géographique importante. Ces ovins avaient une moyenne d'âge de 3 ans. Le tableau suivant donne l'effectif des animaux et leur répartition.

Tableau 1. Répartition et effectif des ovins dans la zone d'étude

Sites	Localités	Nombre d'éleveurs	Nombre d'animaux	Age moyen des animaux
Niayes	Niague	2	60	3 ans
	Keur Mbir Ndao	1	30	3 ans
	Pout	1	20	3 ans
Ziguinchor	Badiouré	2	30	3 ans

Ces animaux sont identifiés par une boucle fixée à l'oreille. Les animaux sont conduits au pâturage durant la journée.

- Souches bactériennes de la famille des Anaplasmataceae

Les souches qui ont fait l'objet des recherches sont originaires de deux zones écologiques (Niayes et Ziguinchor). Ces souches ont été récoltées à partir de sang d'animaux infectés à la phase d'hyperthermie, puis conservées dans l'azote liquide à très basse température (-196°C). Ces souches sont destinées à des fins d'analyses de caractérisation en biologie moléculaire (PCR).

- Tiques

Les tiques ont été récoltées sur l'effectif constitué par les ovins des deux zones d'étude. Sur chaque individu, la totalité des tiques présente sur le corps de l'animal a été prélevée à chaque suivi. Après récolte, les tiques au nombre de 335 pour les nymphes et de 150 pour les imagos, sont conservées dans de l'alcool 70°, à des fins d'identification d'une part et de détermination du taux d'infection et de transmission d'autre part.

- Sang

Des prélèvements de sang suspecté infecté ont porté sur un effectif de 52 animaux en phase d'hyperthermie, au niveau des deux zones, respectivement 30 pour la zone des Niayes et 22 pour la zone de Ziguinchor.

Méthodologie

- Identification des tiques

Les différentes tiques récoltées ont été identifiées à partir de la clé de détermination définie par **Estrada-Pena *et al.* (2004)** et du Logiciel ICTTD.

Etude des caractéristiques morphologiques et moléculaires des bactéries de la famille des Anaplasmataceae

- Caractéristiques morphologiques

Des frottis sanguins sont réalisés sur plusieurs ovins suspects présentant une hyperthermie. La technique de coloration utilisée est la méthode avec le Kit-RAL 555. Les frottis sont ensuite observés au microscope photonique. Les caractères morphologiques des différentes espèces sont définis en vue de leur identification.

- Caractéristiques moléculaires

Les souches supposées présentes dans le sang sont conservées dans l'azote liquide. Avant leur utilisation pour la PCR, le sang infecté est mélangé avec de l'alcool 70° à volume égal dans des tubes de Nunc stériles de 5 ml.

- Extraction de l'ADN

Dans des conditions stériles, extraction de l'ADN génomique. L'ADN de l'échantillon a été élué dans 200 µl de tampon TE et conservé à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

- Amplification

Amplification ADN a été faite par des amorces: ARN 16 S et GroEl. Amplification génique a été effectuée dans les conditions standard. Un contrôle négatif et un contrôle positif constitué de l'ADN isolé à partir d'*Anaplasma phagocytophilum* et d'*Ehrlichia canis*.

Les Produits PCR ont été résolus par électrophorèse sur un gel d'agarose, colorés avec du bromure d'éthidium, photographiés et analysés.

- Séquençage des produits PCR

Il a été réalisé avec différents ensembles d'oligonucléotides et le séquençage de l'ADN. Chaque réaction de séquençage a été répétée au moins trois fois dans les deux directions avant et arrière avant d'être acceptés pour analyse.

- Construction de l'arbre phylogénétique

Arbre phylogénétique a été construit par la technique la méthode PhylML sur la base d'un alignement sur pb de GroEl à partir de séquences disponibles dans Genbank.

Arbre phylogénétique a permis le classement par la méthode PhylML et la comparaison avec d'autres bases utilisées dans le Genbank. Les séquences de GroEL et RRS (16S) amplicons ont été alignés. Les séquences obtenues ont été assemblées à l'aide ChromasPro 1,49 bêta.

RESULTATS

- Tiques identifiées

La récolte des tiques a permis d'identifier quatre espèces. L'espèce dominante est *Amblyomma variegatum* avec 92,9% des tiques récoltées. *Hyalomma truncatum* représente 3,9% des espèces. *Rhipicephalus bursa* et *Ixodes ricinus* sont faiblement représentées avec chacune 1,6%.

- Examen des frottis sanguins colorés par le RAL 555 (Méthode classique)

L'examen microscopique des frottis de sang des moutons, a montré à l'intérieur de quelques érythrocytes des éléments sphériques (taille inférieure à 1µm) légèrement colorés en noir suspectant ainsi une infection à *Anaplasma* spp. Les résultats sont rapportés sur la figure



Figure 1: Inclusions intra érythrocytaires observées sur frottis du sang de mouton de la région des Niayes (localité de Niague)



Figure 2: Amas d'*Ehrlichia ruminantium* près des noyaux des cellules endothéliales dans des capillaires cérébraux

- Etude moléculaire

. Caractérisation moléculaire



Figure 3 : Résultats de la détection de produits avec les amorces *Ehrlichia* R 16S et GroEl (électrophorèse)

Pour R 16S, 6 signaux pour *Ehrlichia ruminantium* (1481 paires de bases (pb)). Pour GroEl, 43 signaux: 28 pour *Anaplasma ovis* (698 paires de bases (pb)), 11 pour *Anaplasma marginale* (1482 pb), 2 pour *Anaplasma phagocytophilum* (443 pb), 1 pour *Anaplasma platys* (443 pb) et 1 pour *Anaplasma* sp (443 pb) et est identique à 99% à celle d'*Anaplasma phagocytophilum*

. Identification moléculaire (amorces universelle *Ehrlichia* 16S RNA et spécifique GroEl)

Le **tableau 2** montre les résultats sur la détection de produits avec les amorces *Ehrlichia* R 16S et GroEl.

Tableau 2. Identification moléculaire de quelques espèces de la famille des Anaplasmataceae

Numéro animal	Villages	Maximum d'identité de 305 bps de la portion 16S rRNA gene	Maximum d'identité de 456 bps de la portion <i>groEL</i> gene
2	KMND	<i>Anaplasma ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>Anaplasma ovis</i> 100%
3	KMND	<i>Ehrlichia ruminantium</i> 100% (U03776)	NA (Non Analysé)
4	KMND	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>Anaplasma ovis</i> 100%
5	KMND	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>Anaplasma ovis</i> 100%
6	KMND	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>Anaplasma ovis</i> 100%
7	KMND	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>Anaplasma ovis</i> 100%
8	KMND	<i>E. ruminantium</i> 100% (U03776)	Non Analysé (NA)
9	KMND	<i>E. ruminantium</i> 100% (U03776)	NA
10	KMND	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
11	KMND	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
12	KMNDs	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
1'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
2'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
3'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
4'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
5'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
6'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
7'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
8'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
9'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
10'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
11'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
12'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
13'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
14'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
15'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
16'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
17'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
19'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
20'	Niague	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
1"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
2"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
3"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
5"	Badiouré	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> 100%	NA
6"	Badiouré	<i>Anaplasma</i> sp. 100% (GU556622)	NA
7"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
8"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
9"	Badiouré	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> 100%	NA
10"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
11"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
12"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
13"	Badiouré	<i>E. ruminantium</i> 100% (U03776)	NA
14"	Badiouré	<i>E. ruminantium</i> 100% (U03776)	NA
15"	Badiouré	<i>Anaplasma platys</i> 100% (HQ585879)	NA
16"	Badiouré	<i>E. ruminantium</i> 100% (U03776)	NA
17"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
18"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%
19"	Badiouré	<i>A. ovis/marginale/centrale</i> 100%	<i>A. ovis</i> 100%

. L'analyse des résultats de l'arbre phylogénétique est obtenue sur la base d'un alignement sur 305 pb d'*Ehrlichia* 16S, à partir de séquences disponibles dans Genbank.

Deux genres principaux de la famille Anaplasmataceae, *Ehrlichia* et *Anaplasma*, ont été également démontrés. Nous (*E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. canis*, *E. ewingii* et *E. ruminantium*). Egalement, la plupart des espèces que nous avons obtenues dans l'arbre les plus représentatives du genre *Ehrlichia*, *Anaplasma* sont présentes dans cet arbre.

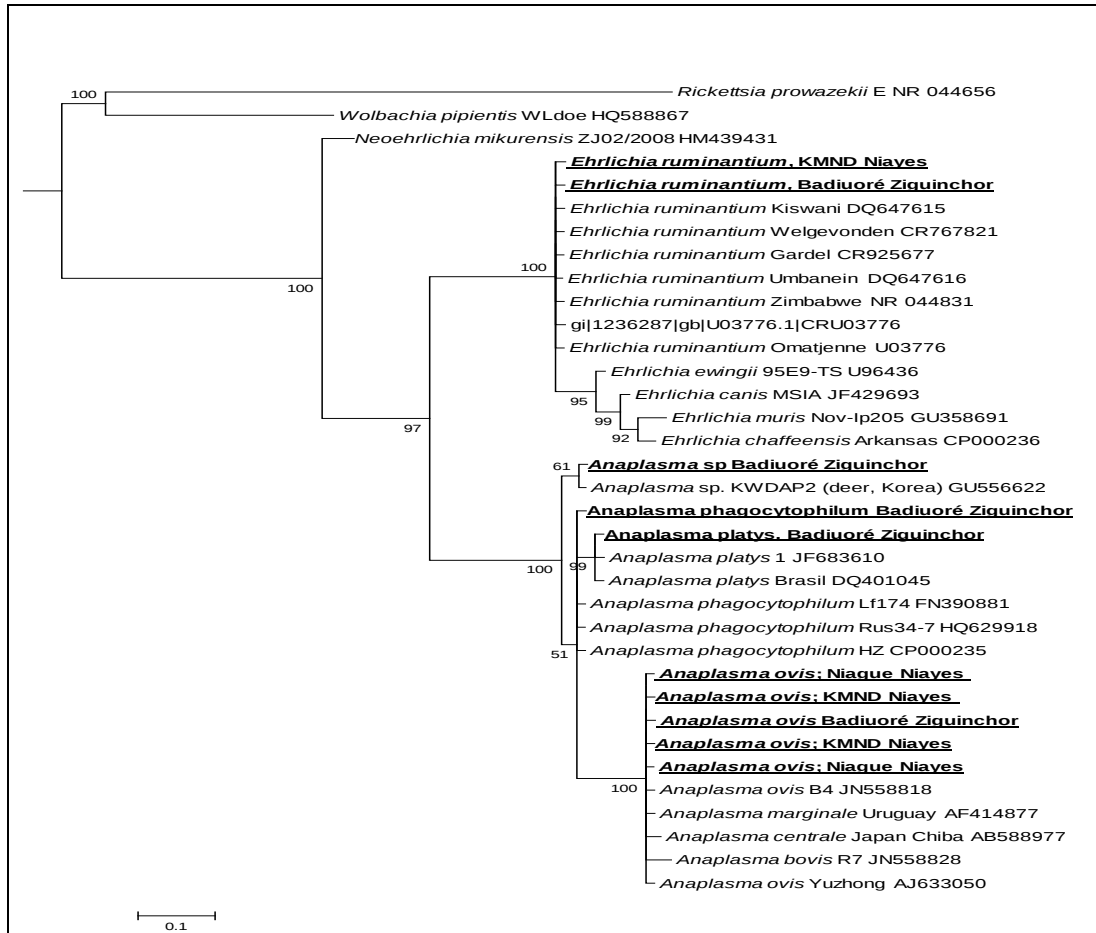


Figure 3: Arbre phylogénétique des bactéries de la famille des Anaplasmataceae

CONCLUSION

L'avènement des progrès importants de la biologie moléculaire ces dernières années, nous a permis de procéder à l'analyse des échantillons par la méthode de PCR. Cela nous a permis d'identifier des espèces du genre *Anaplasma* dont *Anaplasma ovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma* sp et du genre *Ehrlichia* dont *Ehrlichia ruminantium*. La souche d'*Anaplasma* sp. de Badiouré peut être une nouvelle espèce, mais assez proche d'*Anaplasma phagocytophilum*. Elle pourra faire l'objet d'une caractérisation ultérieure pour connaître l'espèce en question trouvée à Badiouré chez les moutons.

Dans l'optique d'une meilleure prise en compte de l'impact des maladies transmises par les tiques au bétail, l'anaplasmose ovine nécessite des études épidémiologiques à grande échelle au Sénégal eu égard au faible nombre d'activités de recherches menées sur cette maladie des ruminants qui pourrait être considérée comme un problème de santé animale voire humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Camus E. (1987).** Contribution à l'étude épidémiologique de la cowdriose (*Cowdria ruminantium*) en Guadeloupe. *Thèse Doct. Sci.*, Université de Paris Sud, Orsay, 202 pp
2. **Chartier C., Itard J., Morel P.C. & Troncy M. (2000).** Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Editions TEC et DOC. Paris, 773 pp.
3. **Djiba M.L., Mediannikov O., Mbengue., Thiongane Y., Molez J.F., Seck M.T., Fenolar F., Raoult D., Ndiaye M: Survey of Anaplasmataceae bacteria in sheep from Senegal. Trop Anim Health Prod 2013 ; DOI 10.1007 / s11250-013-0399-y.**
4. **Estrada-Pena A., Bouattour, Camicas J.L., Walker A.R. (2004).** Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region : a Guide to Identification of Species.
5. **Gueye A., Le Forban Y. (1984).** Notes sur des épizooties d'anaplasmoses chez des zébus indigènes au Sénégal. *Rev. Elev. Méd., Vét., Pays trop.*, **37(4)** : 433-436.
6. **Guèye A., Mbengue Mb. & Diouf A. (1984).** Situation épizootiologique actuelle de la cowdriose des petits ruminants dans les Niayes du Sénégal. *Revue Elev. Méd.vét. Pays trop.*, **37(3)** : 268-271.
7. **Haigh J., Gerwing V., Erdenebaatar J. & Hill J. (2008).** Un syndrome Clinique roman et la detection des *Anaplasma ovis* chez les rennes de la Mongolie (*Flangifer tarandus*). La faune. *J. Dis.*, **44(3)** : 569-577.
8. **Sttler D.W.L; Goff S.P., Shompole L.W., Johnson H., Glimp F.R., Rurangiwa J.R. Gorham & McGuire T.C. (1989).** *Dermacentor andersoni* Stiles. A natural vector of *Anaplasma ovis* Lestoquard on sheep in Idaho. *Proceeding of the Eiglith National Veterinary Hemoparasite Disease Conference, Veterinary Hemoparasite Reseach Workers. Pullman. Washington* . 183 pp.

9. **Sylla M., Molez J.F., Cornet J.P., Monder B. & Camus J.L. (2007).** Les tiques du Sénégal : fréquence des hôtes répertoriés, dynamique saisonnière d'*Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794). *Acarologia*, **47(1-2)** : 13-23.
10. **Uilenberg G. (1971a).** Etude sur la cowdriose à Madagascar (première partie). *Revue Elev. Med. vet. Pays trop.*, **24(2)** : 239-249.
11. **Uilenberg G. (1971b).** Etude sur la cowdriose à Madagascar (deuxième partie). *Revue Elev. Med. vet. Pays trop.*, **24(3)** : 355-364.
12. **Weinman D. & Ristic M. (1968).** Infections blood diseases of man and animals. *Academics. Press. New York*, 507 pp.