

# R É S U M É

## de la thèse de doctorat

### RECHERCHES ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR L'INFECTION PAR *Anaplasma phagocytophilum* CHEZ LES CHEVAUX EN ROUMANIE

**Doctorant: BOGDAN Andreea-Monica**

**Coordinateur scientifique: Prof. univ. Dr. IONIȚĂ Mariana  
Dipl. EVPC**

**MOTS-CLÉS: *Anaplasma phagocytophilum*, équine, agents pathogènes transmis par les tiques, anaplasmose granulocytaire, épidémiologie, zoonoses, Roumanie**

*Anaplasma phagocytophilum* est une bactérie Gram-négative transmise par les tiques, provoquant une maladie de nature zoonotique. Cet agent pathogène est connu depuis plus de 80 ans en médecine vétérinaire, et depuis 1994, il a également été reconnu dans la pathologie humaine (Chen et al., 1994; Gordon et al., 1940). L'infection par *A. phagocytophilum* provoque la fièvre des tiques chez les ruminants et l'anaplasmose granulocytaire chez les animaux (chevaux, chiens et chats) et chez l'homme (Heikkilä et al., 2010; Stuen et al., 2013). Ainsi, compte tenu du fait que cette infection présente un potentiel zoonotique, il est nécessaire et important d'examiner son apparition chez les équidés, qui ont un contact fréquent avec les humains.

L'anaplasmose granulocytaire chez les équidés peut évoluer d'une maladie avec des signes cliniques non spécifiques à une maladie avec des complications fatales, entraînant des pertes économiques dues aux investigations et traitements complexes (Boni et al., 2009; Nowicka et al., 2022). Les recherches sur cette infection chez les équidés dans différentes régions géographiques et différents systèmes d'élevage revêtent une grande importance en pratique vétérinaire, car elles permettraient un diagnostic approprié des cas présentant des symptômes non spécifiques, afin d'administrer un traitement adéquat pour éviter les complications.

En Roumanie, *A. phagocytophilum* a été détectée au niveau moléculaire dans des tiques ainsi que chez certains animaux domestiques et sauvages. Jusqu'à présent, aucune étude n'a été rapportée concernant l'infection par *A. phagocytophilum* chez les équidés en Roumanie. Celles-ci revêtent une grande importance économique, étant élevées tant dans les exploitations agricoles des gens (pour les travaux agricoles, la

traction et comme moyen de transport) dans tous les départements du pays, que dans des haras (cours et concours d'équitation, équithérapie ou la thérapie assistée par le cheval). Ainsi, les chevaux ont une relation étroite avec les humains, et en surveillant les infections zoonotiques chez ces espèces animales, on pourrait également surveiller une partie des maladies rapportées dans la pathologie humaine.

Dans ce contexte, les objectifs spécifiques de la présente thèse de doctorat ont porté sur des contributions à l'étude de l'épidémiologie de l'infection par *A. phagocytophilum* chez les équidés en Roumanie, à travers: le dépistage sérologique des animaux provenant de différentes régions géographiques et de différents systèmes d'élevage, avec identification des facteurs de risque associés; la réalisation d'une étude sur le tableau clinique, les modifications pathologiques, les techniques de diagnostic et la gestion thérapeutique des formes cliniques d'anaplasmose granulocytaire chez les équidés; l'optimisation et le test par des méthodes de biologie moléculaire basées sur la technique PCR, pour la confirmation de l'infection par *A. phagocytophilum* chez les équidés en Roumanie.

La thèse de doctorat est structurée conformément aux Normes de rédaction de l'École Doctorale, comprenant sept chapitres répartis en deux parties: Partie I – *Étude bibliographique*, composée de trois chapitres (représentant environ 25 %) et Partie II – *Recherches personnelles*, présentées en quatre chapitres (représentant environ 75 %). La liste bibliographique contient 256 titres pertinents pour la thèse, tandis que les annexes de la thèse comprennent 23 tableaux et 40 figures.

Dans **la première partie** de la thèse de doctorat (chapitres I-III), des informations actualisées concernant l'espèce *A. phagocytophilum* et l'infection par cet agent pathogène chez les animaux domestiques sont synthétisées. Ainsi, dans les chapitres I et II, des données concernant la taxonomie et les caractéristiques morpho-biologiques de l'espèce *A. phagocytophilum* sont présentées, incluant également un bref aperçu de la prévalence de cet agent pathogène chez les vecteurs et les animaux sauvages en Roumanie. Dans le chapitre III, des informations actuelles sont synthétisées concernant l'épidémiologie, la pathogénèse et l'évolution clinique de l'infection à *A. phagocytophilum* chez les animaux domestiques, incluant des données générales et des caractéristiques épidémio-cliniques de cette infection chez les équidés, les bovins, les ovins, les canidés et les félins. Ces informations contenues dans l'étude bibliographique ont fondé le plan de recherche lié à la thèse de doctorat, servant de base à la réalisation des études, ainsi qu'à l'analyse et à l'interprétation des résultats obtenus.

Dans **la deuxième partie**, les **recherches propres** sont présentées en quatre chapitres (IV-VII) qui décrivent les études réalisées conformément au plan de recherche et aux objectifs proposés. Ainsi, pour chaque étude, sont décrits les matériaux et méthodes de travail, les résultats obtenus, les discussions, ainsi que les conclusions partielles et générales, qui seront présentées de manière synthétique par chapitres.

Le **chapitre IV** présente les investigations sérologiques réalisées en vue d'évaluer l'épidémiologie de l'infection par *Anaplasma phagocytophilum* et d'autres agents pathogènes transmis par les tiques chez les équidés provenant de différentes régions géographiques de la Roumanie (Nord, Centre et Sud-Est) et de différents systèmes d'élevage. L'étude a inclus 223 de chevaux provenant de cinq départements (Bistrița-Năsăud - au Nord; Brașov, Sibiu - au Centre; Buzău, Călărași - au Sud-Est), élevés dans des haras (n=118) et dans des exploitations agricoles (n=105). Les animaux avaient des âges compris entre 8 mois et 26 ans (moyenne 9 ans; DS = 5,4); répartis en 3 catégories d'âge, comme suit: <5 ans (n=65); 5-10 ans (n=81); >10 ans (n=77). En ce qui concerne le sexe et la race, le dépistage sérologique a été effectué à la fois chez les femelles (n=135) et chez les mâles (n=88), de race pure (n=113) et métis (n=110).

Les investigations sérologiques ont été réalisées à l'aide d'un kit ELISA (IDEXX Laboratories, Inc.), qui permet la détection simultanée des anticorps anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato et anti-*Ehrlichia* spp. - agents pathogènes transmis par les tiques. Les résultats des tests sérologiques ont révélé une séroprévalence totale de 26,0% (58/223 équidés étaient positifs pour au moins un des pathogènes testés; IC 95 %: 20,38-32,29%); 22,9% ont présenté des infections uniques, tandis que 3,1% ont eu des infections mixtes, dont 2,7% avec 2 pathogènes (*A. phagocytophilum* et *B. burgdorferi* s.l.), et 0,5% (un cheval) avec les 3 pathogènes testés.

En ce qui concerne *A. phagocytophilum*, 10,3% (23/223; IC 95%: 6,7-15,1%) des chevaux étaient séropositifs, dont 7,2% (n=16) ont présenté des infections uniques, et 3,1% (n=7) - des infections mixtes. Les valeurs moyennes de séroprévalence enregistrées chez les animaux des trois régions ont varié de 5,0% (dans le Nord) à 11,7% (dans le Sud-Est). Les chevaux de ferme ont montré une séropositivité plus élevée (14,3%; 15/105), par rapport à ceux des haras (6,8%; 8/118). De plus, les taux d'infection étaient plus élevés chez les chevaux de plus de 10 ans (13,0%), par rapport aux jeunes chevaux (7,7% pour les chevaux de moins de 5 ans), chez les mâles par rapport aux femelles (13,6% contre 8,1%) et chez les chevaux croisés par rapport aux chevaux de race (13,6% contre 7,1%), mais avec des différences statistiquement non significatives.

De plus, 18,8% (42/223; IC 95%: 13,92-24,6%) des chevaux testés étaient séropositifs pour *B. burgdorferi* s.l. et 0,5% (1/223; IC 95%: 0,01-2,5 %) pour *Ehrlichia* spp. La séropositivité des chevaux face à l'infection par *B. burgdorferi* s.l. a été corrélée avec le système d'élevage, le sexe et la race, des taux d'infection plus élevés ayant été enregistrés chez les chevaux de trait, chez les mâles (29,5% contre 11,9% chez les femelles) et chez les chevaux croisés (27,3% contre 10,6% chez les chevaux de race), probablement en raison d'une exposition plus prolongée aux tiques et aux pathogènes qu'elles transmettent.

Dans le **chapitre V**, une étude (de type méta-analyse) est présentée concernant le tableau clinique, les modifications pathologiques, les techniques de diagnostic et la gestion thérapeutique des formes cliniques d'anaplasmose

granulocytaire décrites chez les équidés. Ainsi, 189 cas cliniques (rapportés entre 1994 et 2022, dans 31 publications) ont été étudiés, pour lesquels l'infection par *A. phagocytophilum* a été confirmée par différentes méthodes de diagnostic. Les cas cliniques d'anaplasmose granulocytaire chez les équidés ont été diagnostiqués en Europe (67,20%), en Asie (15,34%), en Amérique (12,70%) et en Afrique (4,76%). Les cas les plus nombreux ont été rapportés en Suède (23,81%), suivie des États-Unis (11,11%), de l'Espagne (9,52%), de l'Allemagne et du Pakistan (8,47% chacun).

Des formes cliniques d'anaplasmose granulocytaire ont été rapportées chez des chevaux (94,71%; n=179), des ânes (3,17%; n=6) et des mulets (2,12%; n=4), chez des animaux âgés de 4 mois à 30 ans (94/189). En ce qui concerne le sexe et la race, tant les mâles (55/83; 66,27%) que les femelles (28/83; 33,73%), de race pure (33/38; 86,84%) et métis (5/38; 13,16%), ont présenté des formes cliniques d'infection par *A. phagocytophilum*.

Les animaux ont manifesté une symptomatologie complexe lors de l'infection par *A. phagocytophilum*. Les signes cliniques les plus fréquemment rapportés étaient la fièvre (90,30%; 121/134), l'œdème des membres (48,51%), l'anorexie (41,79%), l'apathie (32,84%), l'ictère (22,39%), l'ataxie (17,91%), la tachycardie (16,42%) et la léthargie (15,67%). La rhabdomyolyse et les épanchements cavitaires ont été observés dans un cas et, respectivement, dans deux cas, tandis qu'un décès de cheval a été rapporté suite à une anaplasmose cérébrale chronique. Les principales modifications mises en évidence par les investigations paracliniques ont inclus une thrombocytopénie (90,32%; 84/93), une anémie (75,00%; 30/40), un hématoците bas (70,59%; 24/34), une leucopénie (55,88%; 19/34), une lymphopénie (58,14%; 25/43), une neutropénie (41,67%; 10/24), une hyperbilirubinémie (68,97%; 20/29), une hyperfibrinogénémié (13/15; 86,67%) et une hyponatrémie (10/10; 100,00%). Dans le cas de la rhabdomyolyse, on a observé de la myoglobininurie et de la protéinurie.

L'infection par *A. phagocytophilum* dans les cas avec formes cliniques a été confirmée par examen microscopique, tests sérologiques, isolement et méthodes moléculaires. À la suite de l'examen microscopique, 88,44% (153/173) des échantillons se sont révélés positifs, les morules ayant été observées principalement dans les frottis sanguins (75,16%) et le concentré leucocytaire (20,92%), colorés le plus souvent par la méthode de Giemsa (58,17%). Les tests sérologiques ont révélé des anticorps anti-*A. phagocytophilum* chez 66,67% (56/84) des cas cliniques, tant au stade aigu de la maladie – 60,71% (62,75% par IFAT, 23,53% par IFAT plus Western Blot, 5,88% par ELISA et 5,88% par ELISA plus IFAT) que dans la phase chronique – 5,95% (2/5 positifs par IFAT). L'agent pathogène a été isolé dans un seul cas (1/189; 0,53%). Grâce aux techniques moléculaires, 98,36% (120/122) des échantillons positifs ont été rapportés, par: PCR conventionnelle (77,50%), PCR en temps réel (17,50%) et PCR-RLB (5,00%); les marqueurs génétiques étaient principalement les gènes *16S rRNA* et *msp2*.

En ce qui concerne la gestion thérapeutique, 77,01% (67/87) des cas ont été traités pour anaplasmose, 12,64% ont reçu un traitement non spécifique avant le diagnostic, et 10,34% se sont rétablis sans thérapie. Pour le traitement, l'oxytétracycline a été administrée le plus fréquemment (52,24%; 35/67) ainsi que la tétracycline (14,93%). L'amélioration des signes cliniques a été observée à 10-12 heures après le traitement (16/45; 34,56%), dans les 24-48 heures (19/45; 42,22%) et à/ après 3 jours (2/45; 4,44%). La récupération complète a été rapportée pour 54,55% (24/44) des cas, de 12 heures à 8 mois après le traitement.

Le **chapitre VI** décrit l'optimisation et le test d'une méthode de biologie moléculaire basée sur la technique de PCR en temps réel pour la détection moléculaire de l'ADN d'*A. phagocytophilum* dans des échantillons de sang de chevaux (Roumanie). Pour cela, les échantillons d'ADN génomique extraits et purifiés à partir de sang total de chevaux ont été testés par la technique de PCR en temps réel pour la détection moléculaire des trois biovariantes d'*A. phagocytophilum* (*phagocytophilum*, *equi* et l'agent causal de l'anaplasmose granulocytaire humaine). Dans une première étape, on a procédé à l'optimisation de la méthode. Suite à l'application consécutive du protocole d'amplification (s1 x 1 : 50°C - 2 min ; s2 x 1 : 95°C - 10 min ; s3 x 45 : 60°C - 1 min), des courbes d'amplification ont été obtenues pour les deux contrôles positifs, avec une valeur Ct-CP1 = 26,9092 et Ct-CP2 = 27,4285, tandis que pour les deux contrôles négatifs, aucune courbe d'amplification n'a été obtenue. Ces résultats ont permis la validation de la méthode, car pour les deux contrôles positifs, la valeur Ct<45, conformément aux recommandations du fabricant pour la validation de la méthode.

Ulérieurement, la méthode a été utilisée pour tester 23 échantillons de chevaux séropositifs pour l'infection par *A. phagocytophilum* ; suite à la réaction RT-PCR, une amplification a été obtenue, dans une première étape, sur un échantillon, l'amplitude de la courbe d'amplification étant cependant inférieure à celle du CP. Pour confirmation, une analyse génétique est nécessaire, c'est pourquoi une amplification par PCR conventionnelle et un séquençage seront réalisés à une étape ultérieure, en utilisant des marqueurs génétiques spécifiques. La méthode ainsi optimisée peut être utile dans de futures études cliniques pour confirmer l'infection par *A. phagocytophilum*, en particulier dans les infections aiguës chez les animaux présentant des signes cliniques de suspicion.

Le **chapitre VII** comprend les conclusions générales et les recommandations formulées à la suite de l'analyse des résultats obtenus à l'issue des études incluses dans cette thèse de doctorat. Ainsi, l'exposition naturelle des chevaux à l'espèce *A. phagocytophilum* dans les zones étudiées en Roumanie est confirmée, soulignant l'importance des études de dépistage sérologique concernant les infections par des agents pathogènes transmis par les tiques, ainsi que l'importance de la mise en œuvre de programmes adéquats de surveillance et de contrôle pour les maladies qui en découlent. De plus, étant donné que les équidés peuvent développer une symptomatologie et des

modifications pathologiques variées lors d'une infection naturelle par *A. phagocytophilum*, il est souligné l'importance d'une bonne connaissance du tableau clinique, des modifications pathologiques, du diagnostic et de la gestion thérapeutique dans l'anaplasmose granulocytaire chez les équidés, la nécessité de l'inclure dans le diagnostic différentiel chez les animaux présentant une symptomatologie suspecte et l'application de mesures appropriées de thérapie et de prévention.

En conclusion, par les résultats des études liées à cette thèse de doctorat, des contributions sont apportées à la connaissance scientifique concernant l'éco-épidémiologie de l'infection par *A. phagocytophilum* chez les équidés en Roumanie - une étude en première mondiale - ainsi que des contributions à valeur pratique pour les vétérinaires praticiens, notamment en offrant des solutions fondées pour les défis liés à la confirmation du diagnostic, à l'approche thérapeutique et aux mesures appropriées de contrôle dans l'anaplasmose granulocytaire chez les équidés. De plus, ces résultats contribuent au développement de nouvelles directions de recherche dans le domaine des maladies transmises par les tiques chez les équidés en Roumanie, un domaine de grande pertinence nationale et internationale, en accord avec le contexte actuel des changements climatiques qui influencent la propagation des vecteurs et des agents pathogènes qu'ils transmettent.