



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 10879

To cite this version :

Renard, Marine. *Ecologie de la borréliose de Lyme : étude dans des populations de tiques du genre ixodes dans le centre de la Grande-Bretagne*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 146 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ECOLOGIE DE LA BORRELIOSE DE LYME : ETUDE DANS DES POPULATIONS DE TIQUES DU GENRE *IXODES* DANS LE CENTRE DE LA GRANDE-BRETAGNE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

RENARD Marine

Née, le 28 décembre 1987 à RUEIL-MALMAISON (92)

Directeur de thèse : M. FRANC Michel

JURY

PRESIDENT :
M. Antoine BERRY

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
M. Michel FRANC
M. Emmanuel LIENARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. A. MILON

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre jury de thèse

A Monsieur le Professeur Antoine BERRY

Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université Paul Sabatier de Toulouse,

Parasitologie - Mycologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Michel FRANC

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Parasitologie et Maladies parasitaires

Qui nous a fait l'honneur de diriger et corriger ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A Monsieur le Docteur Emmanuel LIENARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Parasitologie et Maladies parasitaires

Pour l'attention qu'il a porté à l'examen de ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de nos sincères remerciements.

A mes parents,

pour votre amour, votre précieux soutien, vos encouragements, vos conseils... mille mercis.

A Julie, pour ton cœur gros comme ça et pour ton énergie, et à Julien,
je serai toujours enthousiasmée par vos projets,

A Manon, pour ta douceur, les rêves que j'aime imaginer avec toi et que tu concrétises,

A Mamy Momone et Papy Pierre, pour votre amour et votre soutien sur la terre et dans le ciel,

A Mamy Marcelle et Papy Eugène, pour ce que vous m'avez transmis,

A ma famille,

A Lauren, pour notre belle amitié, nos déjeuners philosophes, nos aventures équestres. Café ?

A Marion, Lisa, Nathalie, Emilie, Milène, Boris, Fanny, Audrey, Florianne, Cécile, Léa, Laure,
et tous mes amis vétérinaires,

ces 5 années m'ont paru bien courtes à vos côtés. C'est ici que nos routes semblent se diviser
comme autant de rayons de soleil. Merci pour votre amitié.

Au Centre Equestre de l'ENVT, sweet home,

A tous les amis que j'y ai rencontrés,

pour tous les beaux moments vécus tous ensemble. Je ne vous oublierai jamais.

A mes co-internes nantais et à mes colocs,

l'internat n'est pas un long fleuve tranquille mais il est infiniment plus coloré grâce à vous,

**A l'équipe du « Infectious Diseases Ecology Research Group » à la Faculté Vétérinaire de
Liverpool, à Richard Birtles et à Judy Bettridge,**

pour la réalisation de ce travail de thèse, votre accueil et la passion pour votre pays qui m'a
envahie,

A tous les sourires dont j'ai pu croiser la route,

A tous les petits quatre-pattes qui ont égayé ma vie, et toujours Frimousse la « tornade rouge »,

A tous les chevaux qui ont bien voulu de moi sur leur dos et qui m'ont tant appris, avec une
pensée spéciale pour Insight, Idéfix et Oscar, certains épisodes me marqueront pour toujours.
A Barok... c'est bien l'air du paradis qui souffle entre les oreilles d'un cheval...

*And this our life exempt from public haunt,
Finds tongues in trees, books in the running brooks,
Sermons in stones, and good in everything.*

William Shakespeare, *As You Like It*

Table des matières

Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
Liste des annexes	14
Liste des abbréviations	15
Introduction	16
PREMIERE PARTIE : Aspects cliniques et épidémiologiques de la maladie de Lyme chez l'homme et l'animal	17
1. Historique de la maladie de Lyme	18
1.1. Une nouvelle entité clinique	18
1.2. Découverte de l'agent pathogène	18
2. Répartition géographique et épidémiologie	19
2.1. Une large distribution dans le monde	19
2.2. Deux exemples de distributions nationales hétérogènes	20
2.2.1. Aux Etats-Unis	20
2.2.2. En France	21
2.3. Une maladie émergente dans l'hémisphère nord ?	22
2.4. Saisonnalité	23
3. Signes cliniques chez l'homme	24
3.1. Manifestations cutanées	24
3.1.1. <i>Erythema migrans</i>	24
3.1.2. Lymphocytome borrélien	25
3.1.3. <i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i>	26
3.2. Arthrites	27
3.3. Atteinte du système nerveux	28
4. Importance vétérinaire de la maladie de Lyme	29
4.1. Une zoonose à transmission vectorielle	29
4.2. Une maladie peu fréquente chez l'animal domestique	29
4.3. Symptomatologie et diagnostic différentiel	30
4.3.1. Chez le chien	30
4.3.1.1. Premiers symptômes	30
4.3.1.2. Boiterie et arthropathie	30
4.3.1.3. Néphropathie	31
4.3.1.4. Autres manifestations	31
4.3.2. Chez le chat	31
4.3.3. Chez le cheval	32
4.3.3.1. Boiterie	32
4.3.3.2. Signes neurologiques : méningo-encéphalite	32
4.3.3.3. Signes ophtalmologiques : uvéite	33
4.3.4. Chez les ruminants	34
4.4. Diagnostic de laboratoire	35
4.4.1. Intérêts et limites de la sérologie	35
4.4.2. Méthodes de détection directe	36
4.4.2.1. Culture bactérienne	36
4.4.2.2. Microscopie	36
4.4.2.3. Polymerase Chain Reaction	37
5. Traitement	37
5.1. Antibiothérapie	37
5.2. Prise en charge des boiteries	38
6. Prévention de la maladie de Lyme	38
6.1. Lutte contre les tiques et antiparasitaires externes	38
6.2. Vaccination	39
6.3. Antibio prophylaxie	41

DEUXIEME PARTIE : Interactions entre agent pathogène, vecteur et hôte...43

1. Le complexe d'espèces <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	44
1.1. Le spirochète	44
1.2. Complexe d'espèces et espèces génomiques	45
1.2.1. Définitions	45
1.2.2. Les 19 espèces de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	45
1.3. Espèces pathogènes	47
2. Le vecteur tique	48
2.1. Les tiques du genre <i>Ixodes</i>	48
2.1.1. Espèces impliquées	48
2.1.2. Morphologie et anatomie interne	49
2.1.3. Particularités biologiques	50
2.2. Cycle de développement d' <i>Ixodes</i>	51
2.2.1. Superposition au cycle enzootique de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	51
2.2.2. Activité saisonnière des <i>Ixodes</i>	52
2.2.3. Recherche de l'hôte et fixation de la tique avant son repas	53
2.3. L'interface <i>Borrelia</i> – <i>Ixodes</i> : adaptations moléculaires	53
2.3.1. Acquisition du spirochète par la larve <i>Ixodes</i>	53
2.3.2. Survie trans-stadiale et persistance du spirochète dans la tique	54
3. Dynamiques de transmission aux hôtes vertébrés	55
3.1. Transmission de <i>Borrelia</i> de la tique à l'hôte	55
3.1.1. Passage des spirochètes du tube digestif aux glandes salivaires de la tique	55
3.1.2. Une transmission assistée par la salive de tique	56
3.2. Stratégie de survie de <i>Borrelia</i> dans l'hôte immuno-compétent	56
3.2.1. Recombinaison au locus du gène <i>vls</i>	56
3.2.2. Inhibition du complément de l'hôte	57
3.3. Hôtes vertébrés impliqués et spécialisation des espèces de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	57
3.3.1. Pattern d'association entre espèces de <i>B.b.</i> s.l. et groupes de vertébrés	57
3.3.2. Le rôle clé du système complément de l'hôte	59
3.4. Agrégats de tiques et implications du « co-feeding »	60

TROISIEME PARTIE : Facteurs écologiques influençant le risque d'infection pour l'homme..... 61

1. L'écologie rencontre l'épidémiologie	62
2. La distribution et la densité en tiques	63
2.1. Influence du type de végétation d'un habitat	63
2.2. Effet multiplicateur des populations de cervidés	63
2.3. Influence du climat	64
2.3.1. Effet de la température et de l'hygrométrie sur la biologie d' <i>Ixodes</i>	64
2.3.2. Effet du climat sur la distribution des tiques en altitude	65
2.3.3. Effet du climat sur la distribution des tiques dans les hautes latitudes	66
3. Les fluctuations de composition des communautés d'hôtes	66
3.1. Débat autour de l'effet de la biodiversité : dilution contre amplification	67
3.2. Effet du climat et des interactions trophiques	68
3.3. Impact des migrations	68
3.4. Impact de la modification des habitats	69
3.4.1. Effet de la fragmentation des habitats	69
3.4.2. Des habitats-mosaïques en reconnexion	69
4. Stratégies d'adaptation de <i>Borrelia</i> et dynamiques de propagation	70
4.1. Diversité des spirochètes	70
4.2. La spécialisation des espèces de <i>Borrelia</i> en Europe	70
4.3. La stratégie généraliste de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	71

QUATRIEME PARTIE : Etude éco-épidémiologique de la borréliose dans des populations de tiques *Ixodes* du centre de la Grande-Bretagne73

1. Contexte de l'étude	74
1.1. Objectifs	75
1.2. Sites visités pour le prélèvement des tiques	75
2. Matériel et méthodes	76
2.1. Technique de prélèvement des tiques dans le milieu naturel : méthode dite « du drapeau »	76
2.2. Extraction de l'ADN présent dans les tiques	77
2.3. Détection de l'ADN borrelieen dans chaque tique par PCR en temps réel	78
2.4. Typage des espèces de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato présentes dans les tiques nymphes et adultes positives	78
2.4.1. Par Reverse Line Blotting	78
2.4.2. Par séquençage	81
2.5. Analyse des repas de sang des tiques par Reverse Line Blotting	81
3. Résultats	82
3.1. Prévalence de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato dans les populations d' <i>Ixodes</i> des sites prélevés	82
3.2. Typage des espèces de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. dans les groupes d' <i>Ixodes</i> positifs	84
3.3. Distribution des espèces vertébrées sources de repas de sang pour les nymphes <i>Ixodes</i> prélevées	85
4. Discussion	86
Conclusion	91
Bibliographie	94
Annexes	106

Liste des figures

- Figure 1** : Distribution géographique des vecteurs de *Borrelia burgdorferi*
- Figure 2** : Distribution des cas confirmés de maladie de Lyme aux Etats-Unis en 2011
- Figure 3** : Incidences annuelles régionales estimées en France sur la période 1999-2000
- Figure 4** : Nombre de cas annuels confirmés aux Etats-Unis de 1982 à 2011
- Figure 5** : Nombre de cas annuels confirmés au Royaume-Uni de 2001 à 2011
- Figure 6** : Nombre de cas annuels confirmés aux Etats-Unis sur la période 2001-2010 selon le mois d'apparition de la maladie
- Figure 7** : *Erythema migrans* annulaire en région axillaire
- Figure 8** : *Erythema migrans* maculaire en région de la hanche
- Figure 9** : Lymphocytome borrélien du lobe de l'oreille
- Figure 10** : *Acrodermatitis chronica atrophicans* en région du genou
- Figure 11** : *Acrodermatitis chronica atrophicans* en région dorsale de la main
- Figure 12** : *Acrodermatitis chronica atrophicans* en région du pied
- Figure 13** : Schémas de la structure de *Borrelia burgdorferi*
- Figure 14** : Distribution géographique des espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato
- Figure 15** : Distribution régionale des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en Europe, Asie occidentale et Afrique du Nord
- Figure 16** : Morphologie d'*Ixodes ricinus*
- Figure 17** : Anatomie interne des *Ixodes*
- Figure 18** : Femelle *Ixodes ricinus* à l'affût
- Figure 19** : Cycle enzootique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato superposé au cycle de développement d'*Ixodes*
- Figure 20** : Phénologie des *Ixodes*
- Figure 21** : Colonisation du tube digestif d'*Ixodes scapularis* par *Borrelia burgdorferi*
- Figure 22** : Zone d'étude
- Figure 23** : Sites visités et densité des populations de tiques
- Figure 24** : Récolte de tiques par la méthode « du drapeau »
- Figure 25** : Résultats d'une épreuve de PCR en temps réel pour la détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Figure 26 : Dispositif principal du RLB, le Mini-Blotter® 45

Figure 27 : Principe du Reverse Line Blotting

Figure 28 : Résultat sur film radiographique du typage de *Borrelia burgdorferi* sensu lato par RLB

Figure 29 : Résultat sur film radiographique d'une analyse de repas de sang par RLB

Figure 30 : Prévalences locales de l'infection des nymphes par *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Figure 31 : Illustration des 4 types d'habitats étudiés

Figure 32 : Distribution des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato d'après les résultats du typage par RLB

Figure 33 : Distribution des espèces sources de repas de sang pour les nymphes *Ixodes ricinus* s'étant nourries sur un seul hôte.

Figure 34 : Prévalence de l'infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les populations de tiques des sites étudiés en Grande-Bretagne.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Stades et manifestations de la maladie de Lyme chez l'homme

Tableau 2 : Formes cliniques de la maladie de Lyme chez l'homme, le chien et le cheval

Tableau 3 : Topiques acaricides avec indication pour le chien en France

Tableau 4 : Espèces connues du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, leurs vecteurs et leurs hôtes

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des différents stades d'*Ixodes ricinus*

Tableau 6 : Pattern de résistance de *Borrelia burgdorferi* sensu lato à la voie alterne du complément de certaines espèces de vertébrés

Tableau 7 : Caractéristiques écologiques des sites visités et infection des tiques prélevées par *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Liste des annexes

Annexe 1 : Détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato par PCR quantitative – Protocole suivi

Annexe 2 : Reverse Line Blotting (RLB) pour le typage des géoespèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et l'analyse des repas de sang – Protocole suivi

Annexe 3 : Article publié dans *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* en 2013 : Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* populations across Central Britain

Liste des abréviations

ACA : *Acrodermatitis chronica atrophicans*

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARNr : Acide Ribo-nucléique ribosomique

ATP : Adénoside Tri-Phosphate

BID : *bis in die* (deux fois par jour)

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CI : Confidence Interval (intervalle de confiance)

CO₂ : Dioxyde de Carbone

Dps : DNA-binding proteins from starved cells

ELISA : Enzyme Like Immuno-Sorbent Assay

EM : *Erythema migrans*

FDA : Food and Drugs Administration

IgG : Immunoglobuline de type G

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

NH₃ : ammoniac

PCR : Polymerase Chain Reaction

RLB : Reverse Line Blot

s.l. : *sensu lato*

s.s. : *sensu stricto*

TID : *ter in die* (trois fois par jour)

TROSPA : Tick-Receptor for OspA

UI : Unité Internationale

INTRODUCTION

De nombreuses maladies émergentes ont une source zoonotique, souvent issues de la faune sauvage et transmises par des vecteurs arthropodes. C'est le cas de la maladie de Lyme, causée par *Borrelia burgdorferi*, une bactérie transmise par les tiques du genre *Ixodes*. Les maladies transmises par les tiques ont longtemps été, pour le grand public, dans l'ombre des maladies transmises par les insectes telles que le paludisme ou la dengue. Elles gagnent pourtant une importance significative, du fait de leur circulation dans l'hémisphère nord, notamment pour la maladie de Lyme, et parce qu'elles constituent une problématique tant médicale que vétérinaire et qu'elles rentrent ainsi dans le cadre du concept « one world, one health » (un seul monde, une seule santé).

Dans le contexte actuel de changement climatique couplé à des mutations écologiques et agricoles profondes, la dynamique de ces agents pathogènes montre des signes de transformation. Pour comprendre puis prédire cette dynamique à l'origine des épidémies humaines, nous devons avoir une connaissance précise de leur écologie et de leur cycle de développement et de transmission. Ils survivent dans la nature selon des cycles enzootiques faisant intervenir des réservoirs animaux, l'homme constituant le plus souvent un hôte accidentel. Sans cette clef, notre capacité à se préparer, réagir et réduire les effets de ces pathogènes est entravée. Le point de vue écologique, au sens scientifique du terme, permet d'éclairer la dynamique complexe d'une maladie infectieuse et d'identifier les points faibles à exploiter dans la rupture d'un cycle de transmission, au service de la santé publique.

Ce travail s'est donné pour objectif de synthétiser les connaissances actuelles sur l'écologie de la borréliose de Lyme, tant à travers les relations qu'entretiennent les différents acteurs de la triade hôte-vecteur-pathogène qu'à travers les effets de facteurs environnementaux sur le risque d'infection pour l'homme, après avoir rappelé quelques éléments cliniques et épidémiologiques sur la maladie chez l'homme et l'animal. Cette synthèse bibliographique est ensuite illustrée par un travail de terrain réalisé en 2010 sur des populations de tiques *Ixodes ricinus* dans le centre de la Grande-Bretagne.

PREMIERE PARTIE

Aspects cliniques et épidémiologiques de la maladie de Lyme chez l'homme et l'animal

1. Historique de la maladie de Lyme

1.1. Une nouvelle entité clinique

Dans les années 1970, une épidémie de polyarthrites touchant principalement des enfants de communautés rurales regroupées autour de la petite ville de Lyme, dans le sud-est du Connecticut aux Etats-Unis a donné lieu à la première description de cas d'arthrite de Lyme. Cette maladie de fréquence plus élevée que les arthrites rhumatoïdes juvéniles et apparemment saisonnière fut en effet reconnue comme une entité clinique nouvelle par une équipe de l'Université de Yale (Connecticut, Etats-Unis) menée par Steere (Steere *et al.* 1977). Un certain nombre de patients rapportaient également avoir constaté une éruption cutanée environ 4 semaines avant le début de l'arthrite. Cette lésion était compatible avec l'*erythema migrans* décrit en Suède par Afzelius en 1910 (Steere *et al.* 1978) et dont l'origine avait déjà été associée à une morsure de tique du genre *Ixodes*. Dans les années qui ont suivi, des patients présentant un *erythema migrans* ont reçu un suivi médical à Yale. Beaucoup ont développé des arthrites, et quelques-uns des troubles neurologiques ou cardiaques. L'arthrite de Lyme se révéla donc être un trouble multi-systémique et devint la maladie de Lyme, dénomination plus générale.

1.2. Découverte de l'agent pathogène

Burgdorfer publia en 1982 les travaux qui ont permis de mettre en évidence l'étiologie de la maladie de Lyme. Des spirochètes, bactéries à gram négatif et de forme hélicoïdale, avaient été isolés à partir de tiques *Ixodes scapularis*, vecteur de la maladie déjà identifié aux Etats-Unis, et réagissaient avec le sérum de patients ayant développé la maladie de Lyme dans des tests à immunofluorescence indirecte (Burgdorfer *et al.* 1982).

Peu de temps après, le spirochète fut isolé à partir du sang, de biopsies cutanées et de liquide céphalo-rachidien de patients présentant un *erythema migrans* (Steere *et al.* 1983).

L'étude de l'ADN de la bactérie révéla par la suite qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce au sein du genre *Borrelia*, appelée *Borrelia burgdorferi* d'après le nom de son co-découvreur.

2. Répartition géographique et épidémiologie

2.1. Une large distribution dans le monde

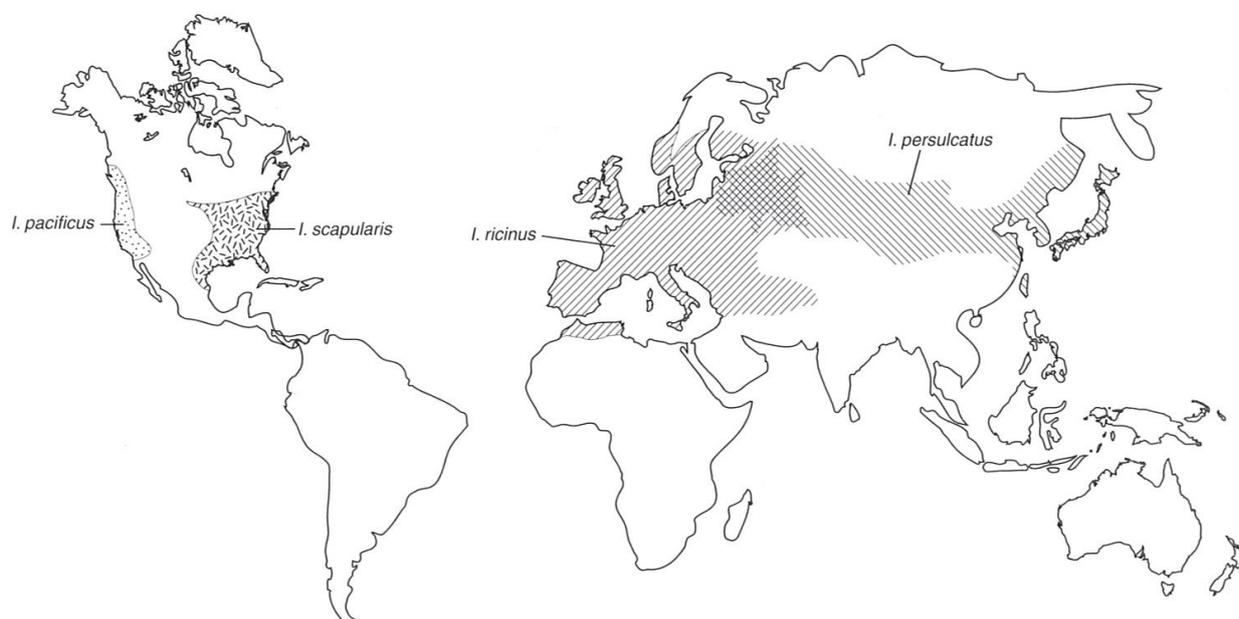


Fig. 1 : Distribution géographique des vecteurs de *Borrelia burgdorferi*

Source : Gray et al., *Lyme borreliosis : biology, epidemiology and control*, CABI Publishing 2002, p.95

La distribution des cas de maladie de Lyme dans le monde correspond étroitement à la distribution géographique des tiques du genre *Ixodes*, vecteurs du spirochète (fig. 1), et se limite à l'hémisphère nord. En effet le climat tempéré pose les limites en latitude et en altitude à la distribution géographique du vecteur *Ixodes* (milieux de vie favorables exposés dans la deuxième partie), donc de la maladie.

En Amérique, la maladie est endémique dans certaines régions tempérées des Etats-Unis et du Canada, et est transmise par *Ixodes scapularis*. En Europe, la maladie est transmise par *Ixodes ricinus* et est présente dans toute l'Europe continentale avec une fréquence particulièrement élevée dans le sud de la Scandinavie, en dessous d'une latitude de 65° Nord en Suède, les Pays-Bas, l'Allemagne et les Pays de l'Est (Lindgren *et* Jaenson 2006). Les tiques peuvent aujourd'hui survivre jusqu'à des altitudes de 1300 m, comme cela a été montré dans les Alpes italiennes (Rizzoli *et al.* 2002).

Des populations d'*Ixodes* existent en Afrique du Nord et au Proche-Orient (Gray *et al.* 2002), mais aucun cas humain de borréliose n'a jamais été rapporté.

Toutefois, il existe de grandes différences de prévalence de la maladie de Lyme chez l'homme à l'intérieur d'une même zone, expliquées par une grande hétérogénéité de la prévalence de l'infection dans les populations de tiques, elle-même influencée par différents facteurs écologiques (cf. Deuxième Partie). On parle de distribution focale au sein d'une même région endémique.

2.2. Deux exemples de distributions nationales hétérogènes

2.2.1. Aux Etats-Unis

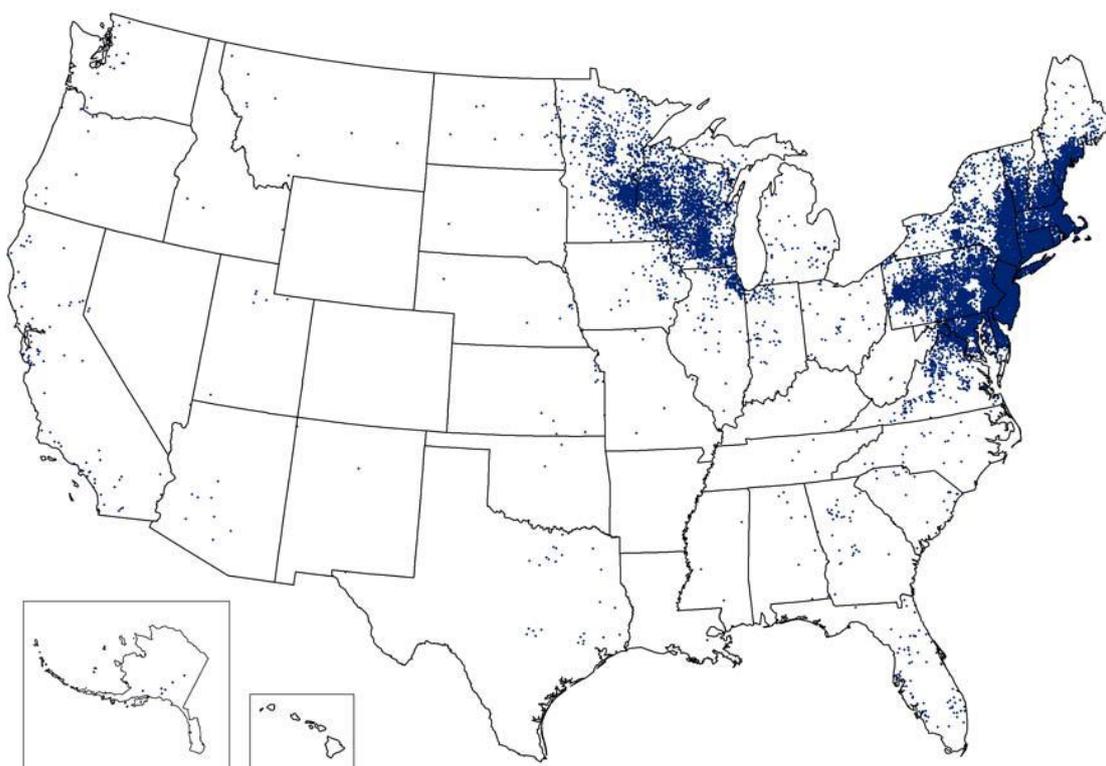


Fig. 2 : Distribution des cas confirmés de maladie de Lyme aux Etats-Unis en 2011
Un point est placé au hasard dans le comté de résidence de chaque cas confirmé
Source : Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Deux grandes régions d'endémie existent aux Etats-Unis (fig. 2) : le Nord-Est (du Maine au Maryland) et le Centre-Nord (Wisconsin et Minnesota). Ces régions présentent des combinaisons d'habitats (forêts et clairières) et de conditions climatiques (humide et tempéré) favorables à la fois aux populations de tiques, de cervidés et de rongeurs, dont les caractéristiques et l'importance sont décrites dans la deuxième partie.

Le système de surveillance nationale de la maladie de Lyme, centralisé au CDC (Centers for Disease Control and Prevention), est très organisé aux Etats-Unis. Il existe depuis les années 1980 et a été standardisé en 1991 par une définition précise des critères cliniques pris en compte pour la déclaration des cas et l'utilisation des tests sérologiques (Dennis 2005).

2.2.2. En France

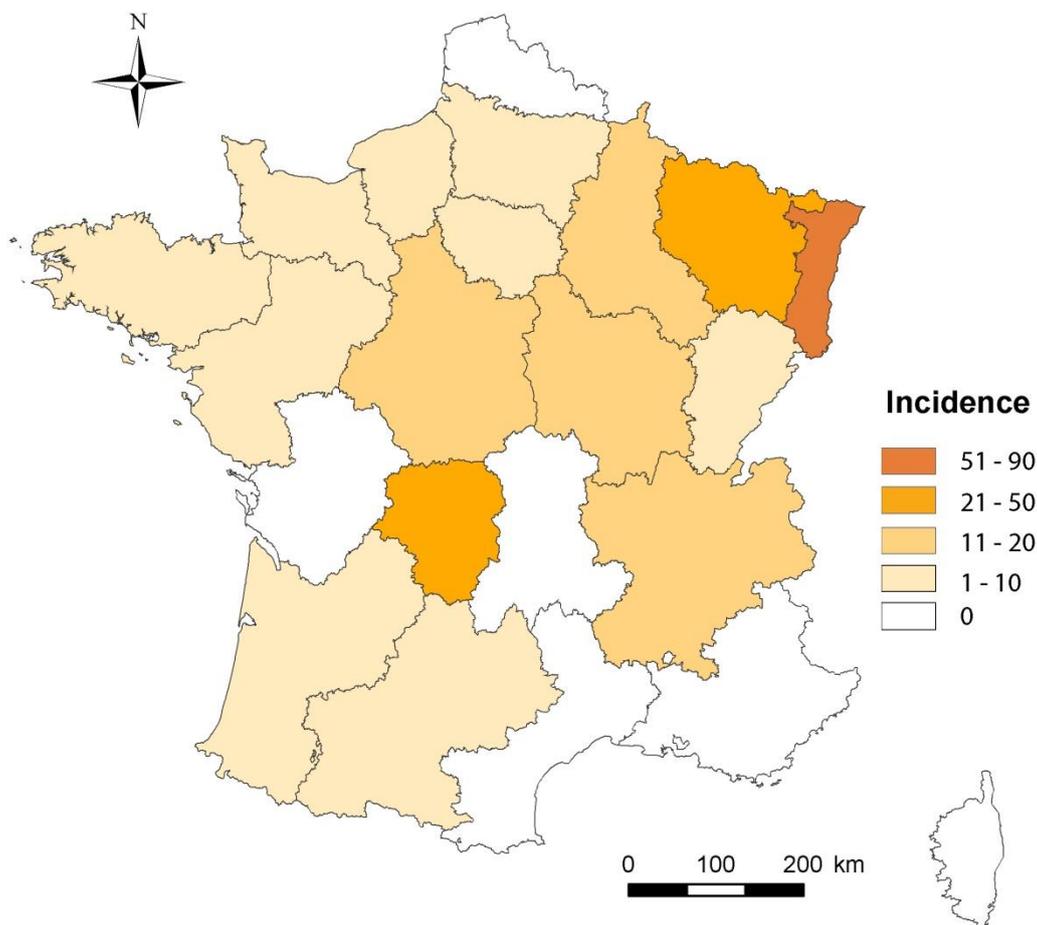


Fig. 3 : Incidences annuelles régionales estimées en France sur la période 1999-2000
Chiffres pour 100 000 habitants - D'après Letrilliat *et al.* 2005

Des foyers sont présents principalement dans l'Est de la France (Alsace, Lorraine, Alpes) et par ordre décroissant : dans le Limousin, dans les forêts du Centre et d'Ile-de-France et notamment celle de Rambouillet, dans l'Ouest (Bretagne et Normandie) et dans la région Midi-Pyrénées (fig. 3). Ces régions recensent les plus forts taux de prévalence dans les tiques, de même que les plus forts taux d'incidence français.

De même que dans le reste de l'Europe, le système d'épidémiologie français est peu développé et très inégal selon les régions, très peu d'informations récentes sont disponibles quant au nombre de cas annuels pour l'ensemble du pays. Des études datant du milieu des

années 1990 rapportent une moyenne de 7 000 à 10 000 cas par an, et une séroprévalence moyenne de 15% dans la population française en 1997 (Zhioua *et al.* 1997). Le réseau Sentinelles a mis en place une surveillance de la maladie de Lyme chez l'homme en France depuis 2009 grâce à une collaboration entre médecins généralistes (2,2% des médecins généralistes y étaient inscrits au 1^{er} janvier 2012), l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et chercheurs de l'INSERM et de l'Université Pierre et Marie Curie (UMPC) (Réseau *Sentinelles*, rapport annuel 2011).

2.3. Une maladie émergente dans l'hémisphère nord ?

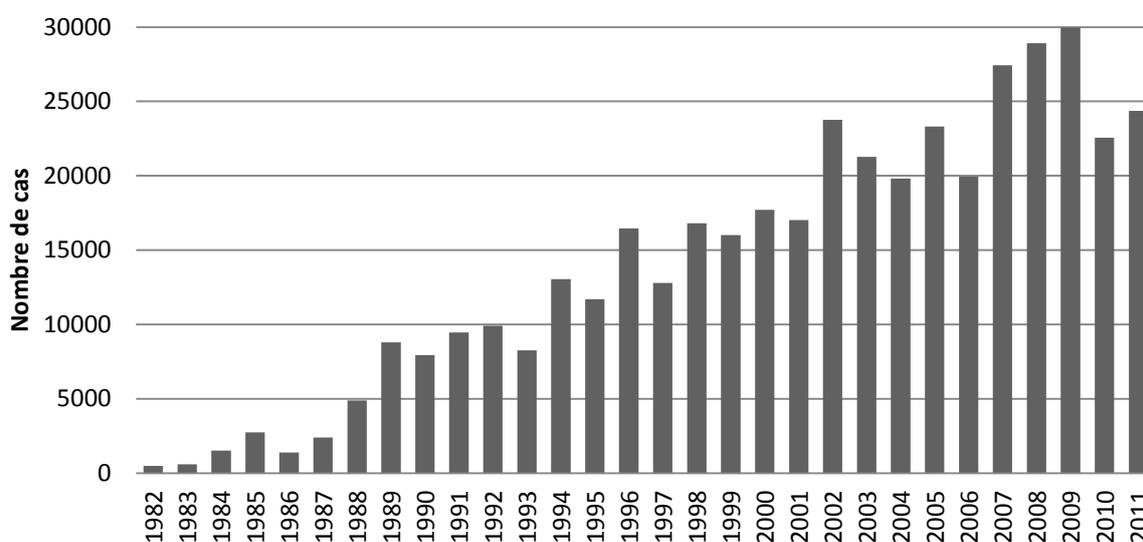


Fig. 4 : Nombre de cas annuels confirmés aux Etats-Unis de 1982 à 2011
Chiffres : Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

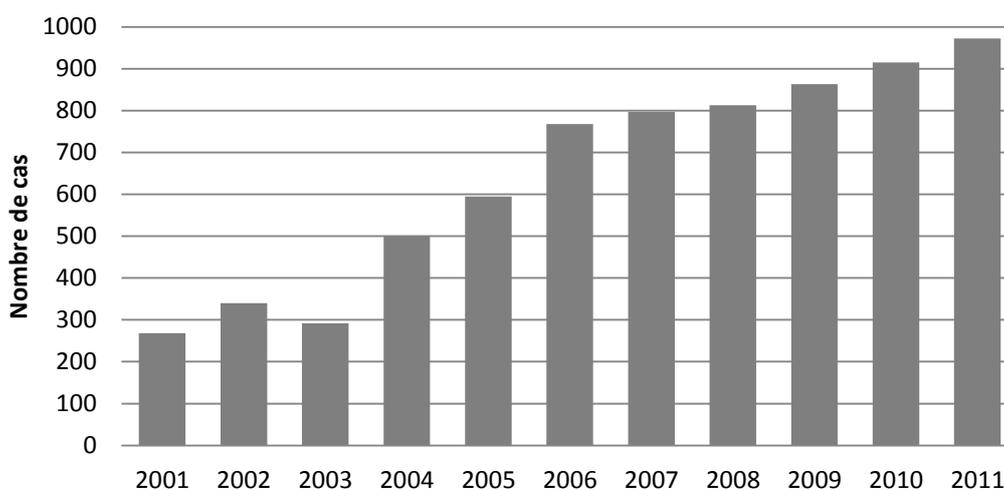


Fig. 5 : Nombre de cas annuels confirmés au Royaume-Uni de 2001 à 2011
Chiffres : Public Health England

La borréliose de Lyme est aujourd'hui considérée comme la maladie vectorielle la plus prévalente de l'hémisphère nord. Le nombre annuel de cas humains n'a cessé d'augmenter depuis la découverte de l'agent pathogène et la reconnaissance de l'entité clinique, à la fois en Amérique du Nord (exemple des Etats-Unis, fig.4) et en Europe (fig. 5).

Si cette augmentation a pu s'expliquer par une amélioration de la détection et du signalement de la maladie jusque dans les années 2000, elle est par ailleurs le signe d'une émergence globale depuis une décennie. Cette tendance paraît coïncider avec les fluctuations climatiques excessives connues depuis les années 1970. Du fait de son caractère vectoriel, la maladie est sensible aux conditions climatiques. La relation de causalité est en cours d'exploration et l'étude de l'écologie de la maladie s'attache à comprendre les raisons de cette émergence et à déterminer les facteurs environnementaux qui provoquent des variations dans les populations de tiques et influencent de façon synergique le risque d'infection pour l'homme (cf. Troisième Partie). Des phénomènes socio-économiques sont également à prendre en compte. La transition socio-économique qui a suivi la chute du bloc soviétique aurait amené les populations humaines en contact plus étroit avec les populations de tiques : réformes de l'agriculture et transformation des habitats, augmentation du chômage et de la pauvreté, augmentation du temps de loisirs pour les travailleurs (visites de zones rurales) (Randolph, 2010).

2.4. Saisonnalité

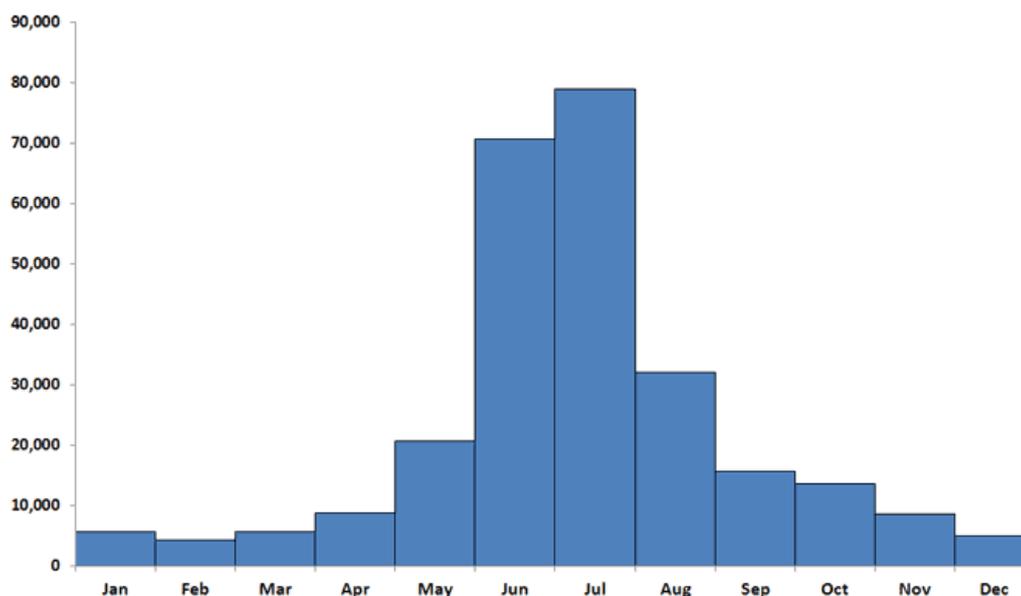


Fig. 6 : Nombre de cas annuels confirmés aux Etats-Unis sur la période 2001-2010 selon le mois d'apparition de la maladie

Chiffres : Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Le pattern saisonnier de la maladie est très similaire entre l'Europe et les Etats-Unis (Gray *et al.* 2002). Un pic d'incidence est clairement établi entre mai et septembre, mais des cas sont déclarés toute l'année (fig. 6). Ce pic d'incidence correspond à la fois à une période d'activité favorable dans le cycle biologique des tiques avec notamment des températures plus clémentes (cf. Deuxième Partie) et à la période vacancière estivale, propice à la visite d'aires rurales (notamment forestières) infestées (Lindgren *et Jaenson* 2006).

3. Signes cliniques chez l'homme

L'évolution naturelle de la maladie de Lyme chez l'homme peut être décomposée en trois stades. Elle commence par une éruption cutanée, l'*erythema chronicum migrans*, initiée au point de fixation de la tique infectée sur la peau (stade I). La dissémination de *Borrelia burgdorferi* à divers organes donne lieu à un stade de manifestations précoces de la maladie (stade II), associées ou non à un syndrome fébrile, quelques jours à quelques semaines après l'infection. Un stade chronique progressif et de degré d'irréversibilité variable peut être atteint ensuite en quelques semaines à quelques mois (stade III). Ces manifestations incluent des troubles neurologiques, musculo-squelettiques et cardiaques.

3.1. Manifestations cutanées (Gray *et al.* 2002, Müllegger 2004, Stanek *et al.* 2012)

3.1.1. *Erythema migrans* (EM)

La manifestation la plus fréquente de la maladie de Lyme chez l'homme est l'*erythema (chronicum) migrans*. Il se développe au niveau du site de fixation de la tique vectrice sur la peau et est pathognomonique du premier stade de la maladie. Cette lésion caractéristique est causée par la réponse inflammatoire développée pour limiter la dissémination des spirochètes. La période d'incubation peut varier de quelques jours à un mois, avec une moyenne de 10 jours. L'*erythema migrans* initial est une éruption cutanée homogène rouge de type érythémateuse, de 10 à 15 cm de diamètre. S'il persiste en l'absence de rémission spontanée ou de réponse au traitement, il peut s'étendre de façon centrifuge et s'éclaircir ou non en son centre (forme annulaire ou maculaire, fig. 7 et 8). Les localisations communes de l'EM correspondent aux sites de morsures de tiques les plus fréquents : creux poplité, mollets, aine, cuisses, fesses, aisselles. Des symptômes locaux (prurit, douleur modérée) sont rapportés dans 50% des cas.



Fig. 7 : *Erythema migrans* annulaire en région axillaire
Source : CDC Public Health Image Library
<http://phil.cdc.gov/>



Fig. 8 : *Erythema migrans* maculaire en région de la hanche
Source : Dermnet Skin Disease Atlas – <http://www.dermnet.com>
Dartmouth Medical School, New Hampshire, Etats-Unis

Le développement simultané de plusieurs EM est possible. Le mécanisme sous-jacent suspecté est la dissémination hémotogène des spirochètes, bien que des lésions multiples dues à plusieurs morsures de tiques infectées ne puissent pas être exclues.

3.1.2. Lymphocytome borrélien

Il s'agit d'une prolifération bénigne de cellules lymphoïdes de type B dans le derme ou le tissu sous-cutané se présentant comme une petite tumeur cutanée (plaque ou nodule rouge) de quelques millimètres de diamètre. Il s'agit d'une réaction immunologique en réponse au stimulus antigénique créé par la présence de *Borrelia burgdorferi* dans la peau. Cette lésion peut se développer plusieurs semaines à plusieurs mois après l'infection (généralement deuxième stade de la maladie, après dissémination des *Borrelia*).

Les régions les plus touchées sont le lobe (fig. 9) et le pavillon de l'oreille, le mamelon, et le scrotum chez les enfants. C'est une lésion qui n'a été observée qu'en Europe à ce jour, elle ne serait donc pas induite par *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, seule espèce génomique pathogène en Amérique.



Fig. 9 : Lymphocytome borrélien du lobe de l'oreille
Source : Palmen C. *et al.*, 2010

3.1.3. *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA)

L'acrodermatite est un signe de chronicité de la maladie de Lyme (stade III) et démarre en général à la surface des extenseurs des extrémités (dos des mains (fig.11) et des pieds (fig.12), genoux (fig.10) et coudes principalement). La paume de la main et la plante des pieds peut être atteintes. Dans de rares cas, l'ACA peut aussi se développer sur le tronc. La lésion peut persister durant une longue période et s'étendre, il n'y a pas de guérison spontanée. Les premiers signes impliquent un gonflement de la région associé à une rougeur de la peau. En l'absence de traitement, un épaissement fibreux s'installe et donne lieu après plusieurs années à une atrophie cutanée laissant apparaître les vaisseaux sanguins (aspect de la peau « en papier de cigarette »), associée à une hyperpigmentation ou une dépigmentation. Cela peut donner lieu à une ulcération chronique et initier un carcinome épidermoïde (cellules squameuses de la peau) ou baso-cellulaire (cellules basales de la peau). L'ACA touche 10% des cas de borréliose en Europe (elle n'a été que très rarement décrite en Amérique) et a été associée à l'infection par *Borrelia afzelii*.

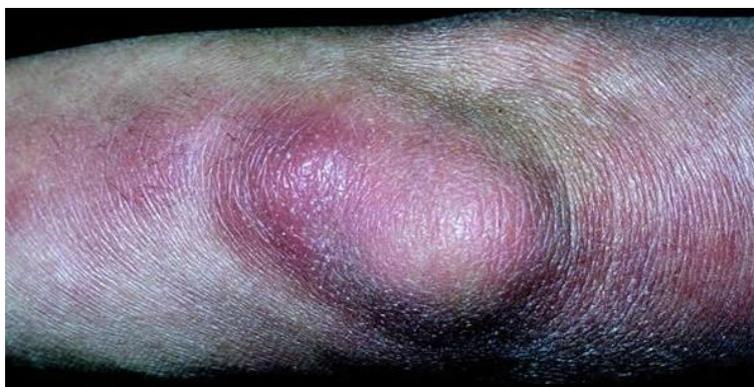


Fig. 10 : *Acrodermatitis chronica atrophicans* en région du genou
Source : Mülleger R.R. 2004

Environ 60% des patients atteints d'ACA présentent également une neuropathie périphérique affectant le plus souvent des fibres nerveuses sensibles de même distribution que les lésions cutanées et occasionnant douleur, dysesthésie, crampes et faiblesse musculaires. Les articulations situées en regard des lésions d'ACA peuvent également être touchées par progression locale de la bactérie depuis la peau.

L'ACA est souvent sous-diagnostiqué en raison de son évolution au long cours, et peut être confondu avec des troubles vasculaires et le vieillissement de la peau (un part importante des patients sont des personnes âgées).



Fig. 11 et 12 : *Acrodermatitis chronica atrophicans* en région dorsale de la main et du pied
Source : Stanek G. *et al.* 2012

3.2. Arthrites (Gray *et al.* 2002, Nardelli *et al.* 2008, Stanek *et al.* 2012)

En Amérique du Nord, le stade II de la maladie de Lyme se manifeste principalement par des arthrites (chez 60% des personnes infectées par *Borrelia burgdorferi*), présentation clinique qui a d'ailleurs conduit à la découverte de l'agent pathogène (cf. 1.). La principale caractéristique de ces arthrites réside dans leur récurrence, elles disparaissent puis reviennent en conséquence de la réactivation de la réponse pro-inflammatoire au cours de l'infection, pendant plusieurs années parfois. Le genou est l'articulation la plus touchée. Dans les cas sévères, la forte inflammation articulaire peut conduire à une érosion du cartilage irréversible. L'arthrite persiste chez 10% des patients malgré l'éradication du pathogène par un traitement antibiotique adapté (cf. 5.1.). Les espèces génomiques présentes en Europe provoquent plus rarement des arthrites.

3.3. Atteinte du système nerveux (Gray *et al.* 2002, Blanc *et al.* 2008, Hildenbrand *et al.* 2009, Stanek *et al.* 2012)

La neuroborréliose résulte de l'affection du système nerveux et survient chez 10 à 15% des patients atteints de maladie de Lyme non traitée. Les manifestations de la neuroborréliose semblent différer selon l'espèce génomique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato impliquée (*Borrelia garinii* aurait un meilleur neurotropisme). La maladie en Europe se présente à 85% par une méningo-radiculite (inflammation des méninges et des racines de nerfs crâniens et spinaux) douloureuse, autrement connue sous le nom de syndrome de Bannwarth. Cette atteinte du système nerveux périphérique correspond au stade II de maladie de Lyme. La période d'incubation est d'environ 7 semaines chez l'adulte, 4 semaines chez l'enfant bien que plus rare. Le syndrome de Bannwarth se présente classiquement comme une triade composée de radiculalgies qui ne rétrocedent pas aux doses normales d'analgésiques, de parésies périphériques (paralysie faciale le plus souvent) qui apparaissent 1 à 2 semaines plus tard et d'une pléiocytose lymphoplasmocytaire (présence de lymphocytes et plasmocytes en abondance) dans le liquide céphalorachidien. La douleur et l'hyperesthésie cutanée causées par les névrites conduisent environ un tiers des patients vers un état agité, anxieux, déprimé voire un comportement agressif. Par dissémination rétrograde le long des nerfs périphériques, le système nerveux central peut être atteint dans le stade III de la maladie, donnant lieu à une encéphalite. La neuroborréliose européenne n'est pas toujours précédée d'*erythema migrans*. La maladie en Amérique du Nord est une méningite qui survient généralement à la suite d'un *erythema migrans*. Elle se manifeste le plus souvent par une paralysie de nerfs crâniens unilatérale, plus rarement bilatérale. C'est le nerf VII qui est le plus touché, occasionnant une paralysie faciale. Une dissémination du pathogène par voie hématogène peut également conduire à une méningo-encéphalite dans une forme plus chronique.

Tableau 1 : Stades et manifestations de la maladie de Lyme chez l'homme

Organe atteint	Stade précoce localisé (I)	Stade précoce disséminé (II)	Stade chronique
Peau	<i>Erythema migrans</i>	<i>Erythema migrans</i> Lymphocytome	<i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i>
Articulations	-	Arthrite	Arthrite chronique
Système nerveux	-	Méningo-radiculite (Europe) Méningite (Etats-Unis)	Encéphalomyélite (Europe) Méningo-encéphalite (Etats-Unis)

4. Importance vétérinaire de la maladie de Lyme

4.1. Une zoonose à transmission vectorielle

La borréliose de Lyme est considérée comme une zoonose, maladie transmissible naturellement entre les animaux vertébrés et l'homme, car l'infection est maintenue dans par des réservoirs animaux. La transmission de la bactérie d'un hôte à un autre se fait strictement par un vecteur invertébré, on parle de métazoonose (Savey *et al.* 2004) : les tiques du genre *Ixodes*. L'homme est infecté accidentellement et constitue un cul-de-sac épidémiologique. La faune sauvage qui héberge la bactérie ne semble pas montrer se signes cliniques traduisant l'infection, mais les animaux domestiques, qui ne sont pas des hôtes habituels pour le spirochète, sont victimes d'une relation hôte-pathogène anormale et peuvent développer des symptômes semblables à ceux rencontrés chez l'homme (Gray *et al.* 2002).

4.2. Une maladie peu fréquente chez l'animal domestique (Krupka *et* Straubinger 2010, Divers 2007).

L'infection des animaux par *Borrelia burgdorferi* est souvent asymptomatique. Cependant certaines espèces domestiques peuvent occasionnellement présenter une forme clinique de borréliose, en particulier le chien et le cheval, si leur réponse immunitaire n'a pas éliminé de façon efficace les spirochètes. Il a notamment été montré qu'un animal victime d'une co-infection avec *Anaplasma phagocytophilum* est plus susceptible de déclencher des signes cliniques qu'un animal atteint d'une seule infection. L'*erythema migrans* n'est pas décrit chez les animaux. Les symptômes rencontrés sont variés et peu spécifiques, ce qui rend le diagnostic peu aisé. Quatre critères sont à évaluer avec attention pour pouvoir établir un diagnostic de borréliose de Lyme chez un animal :

- **Diagnostic clinique** : les signes cliniques observés peuvent-ils être associés à une borréliose ? (cf. 4.3)
- **Diagnostic épidémiologique** : l'animal a-t-il pu être exposé à des tiques du genre *Ixodes* ? Il convient de savoir si l'animal vit ou a séjourné dans une région endémique, s'il est passé dans des habitats à risque (cf. Partie 3), et de connaître l'état de sa protection antiparasitaire (cf. 6.2)
- **Diagnostic de laboratoire** : une sérologie et/ou une PCR sont-elles en faveur d'une borréliose ? (cf. 4.4)
- **Diagnostic thérapeutique** : une antibiothérapie appropriée permet-elle d'améliorer l'état de l'animal ? (cf. 5.1)

4.3. Symptomatologie et diagnostic différentiel

4.3.1. Chez le chien

L'utilisation du chien comme sentinelle du risque de maladie de Lyme pour l'homme a été proposée étant donné le large partage de leur environnement avec leurs propriétaires (Smith *et al.* 2011). Une étude sérologique nationale aux Etats-Unis a permis de dresser une carte de séroprévalence chez les chiens (Bowman *et al.* 2008). Les régions de plus forte séroprévalence (pouvant atteindre 20%) correspondent aux régions aux plus forts taux de cas humains. Peu d'études sérologiques ont été menées en Europe mais elles révèlent également que l'infection des chiens varie fortement d'une région à l'autre et même d'un lieu à un autre séparés de quelques kilomètres seulement, respectant les zones de fortes populations de tiques infectées. Au début des années 90, 10 à 30% (selon les régions) de la population canine française était infectée et environ 5% de ces chiens développaient des symptômes (Halos 2005). Le chien reste l'animal domestique le plus sensible à la maladie de Lyme (Krupka *et Straubinger* 2010).

4.3.1.1. Premiers symptômes

Les premiers signes cliniques chez le chien sont non spécifiques et peu constants : syndrome fébrile (fièvre, abattement, anorexie), boiterie et parfois hypertrophie de nœuds lymphatiques (Krupka *et Straubinger* 2010). Ces symptômes disparaissent généralement au bout de quelques jours. Ils peuvent laisser place à des formes chroniques si la bactérie persiste dans l'organisme.

4.3.1.2. Boiterie et arthropathie

L'arthrite de Lyme est la forme clinique la plus commune de la maladie chez le chien. La dissémination des spirochètes de la peau aux tissus adjacents et jusqu'aux articulations à partir du point d'attache de la tique sur le chien donne lieu à une ou plusieurs articulations gonflées, douloureuses et chaudes. C'est le carpe qui est touché dans de nombreux cas, mais les autres articulations du système locomoteur (phalanges, tarse, coude, épaule, grasset) peuvent également être atteintes (Halos 2005). Il s'agit de mono- ou poly-arthrites occasionnant une boiterie qui peut durer jusqu'à 6 mois après le début de l'infection dans le cas de chiens infectés de façon expérimentale (Krupka *et Straubinger* 2010), ou être intermittente avec des rechutes sur le même membre ou un autre membre (on parle d'arthrite

récurrente) dans 30 à 50 % des cas (Halos 2005). Une ponction de liquide synovial dans l'articulation touchée permet d'effectuer un comptage cellulaire qui montre généralement une infiltration neutrophilique et une Polymerase Chain Reaction (PCR) sur ce liquide synovial peut mettre en évidence de l'ADN du spirochète (cf 4.4). Il est ainsi possible de diagnostiquer l'arthrite de Lyme parmi d'autres arthropathies causant les mêmes troubles : arthrite septique ou à médiation immune, arthrose, traumatisme. Il est également important de faire le diagnostic différentiel avec une arthropathie causée par la rupture du ligament croisé crânial lorsque l'articulation du grasset est concernée.

4.3.1.3. Néphropathie

La maladie de Lyme peut causer chez le chien une glomérulonéphrite par perte de protéines. Les immuns-complexes circulants qui se sont formés par neutralisation des antigènes bactériens par des anticorps spécifiques sont piégés dans le filtre glomérulaire et l'endommagent. Les cas décrits présentaient une insuffisance rénale le plus souvent fatale en quelques semaines, avec oedèmes périphériques, azotémie, urémie, protéinurie, épanchement thoracique ou abdominal, vomissements (Krupka et al. 2010). 30% des cas présentaient des commémoratifs de boiterie. Les motifs de consultation comprenaient vomissements, abattement, anorexie et amaigrissement. La plupart des cas rapportés de néphrite de Lyme concernent des Labradors et Golden Retrievers (Littman 2003) mais la cause de cette apparente prédisposition n'est pas connue.

4.3.1.4. Autres manifestations

Des signes nerveux liés à une borreliose n'ont jamais été clairement identifiés chez le chien. Des troubles cardiaques tels qu'une myocardite et des blocs atrio-ventriculaires ont été décrits (Littman 2003) chez un chien atteint de borreliose en 1988 sans que le lien avec la maladie soit établi.

4.3.2. Chez le chat (Krupka et Straubinger 2010)

Aucun cas d'infection naturelle chez le chat n'a été rapporté à ce jour. Dans les régions endémiques des Etats-Unis, 13 à 47% des chats sont séropositifs. Les chats développeraient une forte réponse immunitaire qui neutraliserait les bactéries avant que des signes cliniques puissent s'installer. Quelques infections expérimentales ont donné lieu soit à une séroconversion sans manifestation clinique, soit à une symptomatologie qui comprend

boiterie, anorexie et amaigrissement associés à des arthrites ou des méningites. Cette affection reste ainsi peu significative chez le chat.

4.3.3. Chez le cheval

La séroprévalence de la maladie de Lyme atteint 40% chez les chevaux des régions endémiques du Nord-Est des Etats-Unis (Priest *et al.* 2012). Les chevaux vivant au pâturage sont exposés à un plus grand risque d'infestation par des tiques.

4.3.3.1. Boiterie

De même que chez le chien, *Borrelia burgdorferi* migre dans les tissus à partir de la peau jusque dans les fascias musculaires et les membranes synoviales. Cela se traduit par des signes d'atteinte de l'appareil musculo-squelettique, communément décrits dans les cas de borréliose équine, et souvent associés à de la fièvre, de l'abattement, de l'anorexie voire un amaigrissement chronique : raideur, boiterie de plusieurs membres, myosite, douleur et amyotrophie en région thoraco-lombaire. On peut noter un gonflement des membres diffus, plus rarement localisé aux articulations (Divers 2001).

Un examen clinique et locomoteur complet avec radiographies est nécessaire afin d'éliminer d'autres troubles communs :

- Boiterie d'origine articulaire : ostéochondrose (boulets, jarrets, grassets), éparvin (jarrets), arthrite septique, traumatisme (entorse)
- Douleur thoraco-lombaire : conflits de processus épineux de vertèbres thoraciques et/ou lombaires
- Raideur et signes de myosite : myopathie par surcharge en polysaccharides ou rhabdomyolyse d'effort récidivante, diagnostiquées par histopathologie sur une biopsie musculaire.
- Gonflement des membres : lymphangite, piroplasmose

4.3.3.2. Signes neurologiques : méningo-encéphalite

Des manifestations neurologiques de la maladie de Lyme existent chez le cheval et semblent similaires d'un cas à l'autre décrits dans la littérature (Imai *et al.* 2011, Burgess *et Mattison* 1987). Ce sont généralement des troubles qui évoluent depuis plusieurs mois et traduisent une encéphalite : ataxie ou troubles de la démarche, hyperesthésie ou paralysie faciale, déficits

proprioceptifs, hypermétrie des antérieurs, atrophie musculaire neurogénique. Aucun cas décrit n'a été traité avec succès. Le diagnostic est post-mortem par culture bactériologique, immunofluorescence directe, histopathologie associée à une coloration argentique de Steiner ou PCR sur des prélèvements d'encéphale. Un article récent (2011) exposant 2 cas cliniques de neuroborréliose équine présentés à l'Université de Davis en Californie (Etats-Unis) montre que la distribution des spirochètes dans les tissus du système nerveux central se concentre dans les leptoméniges et la dure-mère, de même que chez l'homme ou les modèles primates (Imai et al. 2011). Il est suggéré que l'implication du parenchyme de l'encéphale se ferait, comme dans les autres formes de borréliose, par dissémination centripète des spirochètes depuis les tissus périphériques plutôt que par voie hématogène.

La neuroborréliose entre ainsi dans le diagnostic différentiel des encéphalites équines, à adapter selon la zone géographique considérée (par exemple, la maladie de Lyme n'est pas endémique en méditerranée tandis que sévit la maladie du West Nile) :

- Amérique du Nord : Rage, encéphalite à Togavirus, encéphalomyélite à protozoaires, encéphalomyélite dégénérative.
- Europe : Rage, encéphalomyélite parasitaire, encéphalomyélite dégénérative.

On peut ajouter d'autres causes d'ataxie ou de troubles de la démarche : syndrome de Wobbler, maladie du neurone moteur, néoplasie touchant le système nerveux central.

4.3.3.3 Signes ophtalmologiques : uvéite

Parmi les agents infectieux responsables d'uvéites chez le cheval, *Leptospira* spp., autre représentant des spirochètes, est le plus souvent identifié. Cependant, cinq cas cliniques rapportent des uvéites associées à une borréliose équine. Chez le plus ancien, un poney Shetland présenté à l'Université du Wisconsin (Etats-Unis) en 1985 pour des arthrites et une panuvéite unilatérale, *Borrelia burgdorferi* a été identifiée dans la chambre antérieure de l'œil atteint par histopathologie des tissus oculaires associée à une coloration argentique et à une immunofluorescence directe (Burgess *et al.* 1986). En 1995, un Pur-Sang anglais pour lequel une borréliose multisystémique avait été diagnostiquée à Newmarket en Angleterre présentait une uvéite bilatérale. La culture bactérienne et la PCR effectuées à partir d'humeur aqueuse étaient positives pour *Borrelia burgdorferi* (Hahn *et al.* 1996). Plus récemment, un cas clinique de l'Université de Davis en Californie (Etats-Unis) décrit un autre Pur-Sang présentant une neuroborréliose et ayant développé une uvéite unilatérale plusieurs mois après les premiers signes nerveux, mais le lien entre les lésions oculaires et la borréliose n'est pas clairement établi car non investigué (Imai *et al.* 2011). Enfin, une équipe de l'Université de

Cornell (Etats-Unis), chez deux cas décrits dans une publication de 2012, parviennent pour la première fois à diagnostiquer des uvéites dues à *Borrelia burgdorferi* grâce à une cytologie de l'humeur aqueuse et du corps vitré associée à une coloration argentique de Steiner et confirmée par PCR sur ces liquides oculaires (Priest *et al.* 2012).

Le rôle de la bactérie dans la pathogénie de ces uvéites reste à déterminer. Elle pourrait être un facteur d'initiation ou de complication de l'inflammation intra-oculaire selon les cas. Des taux non négligeables d'anticorps dirigés contre les protéines de surface du spirochète, mesurés dans la chambre antérieure des yeux des chevaux atteints, suggèrent un mécanisme à médiation immune avec production locale d'anticorps dans l'œil (Priest *et al.*, 2012).

Tableau 2 : Formes cliniques de la maladie de Lyme chez l'homme, le chien et le cheval

	Homme	Chien	Cheval
<i>Erythema migrans</i> et signes cutanés	√		
Arthrites et atteinte de l'appareil locomoteur	√	√	√
Atteinte du système nerveux	√		√
Néphropathie		√	
Uvéite			√

4.3.3. Chez les Ruminants

La maladie de Lyme clinique paraît rare chez les ruminants. Bien qu'il existe dans la littérature quelques cas de bovins séropositifs présentant des arthrites, il est difficile d'en attribuer la cause à *Borrelia burgdorferi*. *Borrelia burgdorferi* a fait partie pendant un temps des agents étiologiques suspectés dans la dermatite digitée (ou maladie de Mortellaro) des bovins avant que des études histologiques de biopsies cutanées prélevées sur des bovins laitiers atteints ne soient parvenues à identifier d'autres spirochètes, du genre *Treponema*, parmi les causes de cette affection. Les ovins auraient développé une résistance à la bactérie, grâce à une activité « borrelicide » du complément dans leur réponse immunitaire (cf. Deuxième Partie), mais l'hypothèse d'une adaptation de certaines souches non pathogènes de *Borrelia burgdorferi* aux bovins, lui permettant de passer inaperçue dans l'organisme hôte, est également avancée (Gray *et al.* 2002).

4.4. Diagnostic de laboratoire

4.4.1. Intérêts et limites de la sérologie

Un test sérologique révèle l'exposition de l'animal à *Borrelia burgdorferi* sensu lato mais pas le lien entre la bactérie et les symptômes observés. Les immunoglobulines de type G (IgG) sont détectables 4 à 6 semaines post-infection chez le chien, 6 à 8 semaines post-infection chez le cheval et sont généralement présents lorsque les signes cliniques s'installent (Krupka et Straubinger 2010, Divers 2007). Ils persistent pendant plusieurs années. Une cinétique d'anticorps avec 2 prélèvements sanguins à 2 ou 3 semaines d'intervalle peut ainsi apporter plus d'informations qu'une sérologie unique du fait de l'élévation du titre d'IgG en cas d'exposition récente à *Borrelia*.

L'immunofluorescence indirecte n'est pas une méthode recommandée car sa spécificité est basse, des réactions croisées avec d'autres anticorps conduisent souvent à des résultats faux-positifs.

La méthode de choix pour le diagnostic sérologique de borréliose est un test à deux niveaux mené en laboratoire (Krupka et Straubinger 2010). Le premier niveau consiste en un test ELISA très sensible qui élimine efficacement les échantillons négatifs. Si le résultat est positif, la seconde étape consiste à confirmer ce résultat par Western-blotting, technique plus spécifique qui permet de détecter par électrophorèse tous les anticorps correspondants aux différents antigènes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. L'espèce génomique (cf. Deuxième Partie) en cause peut être précisée, et en Amérique du nord où les animaux peuvent être vaccinés contre la maladie de Lyme, la différence entre des anticorps vaccinaux ou issus d'une infection peut être faite.

Un test rapide pour le dépistage des anticorps anti-*Borrelia* chez le chien est disponible en France pour les praticiens vétérinaires (IDEXX Laboratories SNAP® 4Dx® Plus Test, USA). Ce test est basé sur une technique ELISA utilisant un peptide synthétique analogue au peptide C₆, une des régions constantes d'une protéine de surface de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (VlsE) dont la séquence ADN est exclusivement exprimée une fois que la bactérie se trouve dans l'hôte mammifère (Levy 2002). Le pathogène sélectionne et exprime différentes régions variables du gène VlsE au cours du temps de façon à échapper au système immunitaire et à survivre dans l'hôte. En d'autres termes, le spirochète se « déguise » avec cette protéine de surface variable tant qu'il est actif dans l'hôte. Ce test permet donc la recherche d'anticorps anti-C₆, indicateurs d'une infection naturelle par *Borrelia burgdorferi* sensu lato car le gène VlsE n'est pas exprimé lorsque la bactérie se trouve dans une tique ou lorsqu'elle est mise en

culture pour la production d'un vaccin. De plus, ces anticorps anti-C₆ apparaissent 3 semaines après l'infection, c'est-à-dire une semaine plus tôt que les autres anticorps spécifiques. Ils ne reflètent pas une exposition à *Borrelia burgdorferi* sensu lato mais une infection biologiquement active pour que la protéine VlsE soit produite en quantité suffisante par la bactérie de façon à stimuler une réponse immunitaire. Le taux d'anticorps anti-C₆ décline rapidement après élimination ou inactivation du spirochète car il n'y a plus de production de VlsE changeantes, la production d'anticorps anti-C₆ n'est plus stimulée. En conclusion, le test rapide permet au praticien vétérinaire de valider si les signes cliniques présentés par un chien peuvent être expliqués par une infection à *Borrelia burgdorferi*, sans risque de faux-positif dû à la vaccination.

Le taux d'anticorps anti-C₆ est corrélé à la charge et à la viabilité de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans l'organisme. Un test quantitatif (IDEXX Laboratories, Lyme Quant C6®, USA) basé sur la même technologie permet d'évaluer la réponse au traitement 4 à 6 mois après celui-ci.

4.4.2. Méthodes de détection directe

4.4.2.1. Culture bactérienne

En pratique, la culture de la bactérie *Borrelia* est difficile car celle-ci est présente en faible quantité dans les tissus ou dans le sang. Elle requiert l'utilisation d'un milieu spécial BSK II (milieu liquide de Barbour-Stoenner-Kelly modifié). C'est une technique peu sensible (malgré sa grande spécificité) et longue (6 à 8 semaines de culture) qui n'est jamais utilisée dans un but diagnostique (Krupka et Straubinger 2010).

4.4.2.2. Microscopie

Des spirochètes ont pu être mis en évidence sur des coupes histologiques (peau, encéphale, membrane synoviale, œil) ou des prélèvements cytologiques (humeur aqueuse, corps vitré, liquide synovial, liquide céphalo-rachidien) dans plusieurs cas cliniques de la littérature. La morphologie hélicoïdale caractéristique de cette famille de bactéries (cf. Deuxième Partie) permet de les reconnaître par microscopie après imprégnation argentique, à partir du grossissement 400. Le genre n'est pas identifiable mais cette technique, couplée au diagnostic clinique et à la sérologie pour confirmer la borreliose, permet de préciser la localisation du pathogène. L'immunofluorescence directe est également possible sur les coupes histologiques pour révéler la présence de *Borrelia burgdorferi*.

4.4.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR permet d'amplifier l'ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et produit un résultat en quelques heures seulement. En revanche, elle ne permet pas de distinguer l'ADN issu de spirochètes vivants ou inactivés, et bien qu'étant une technique sensible, les charges bactériennes sont souvent trop basses pour donner lieu à un résultat positif. Cette méthode est toutefois recommandée sur des prélèvements tels que biopsie cutanée, membrane synoviale et liquide synovial. Les résultats sont à interpréter à la lumière des données sérologiques et des signes cliniques. Un avantage de la PCR réside dans sa capacité à différencier les espèces génomiques du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato. La méthode demeure ainsi un outil scientifique précieux, notamment dans un cadre épidémiologique.

5. Traitement

5.1. Antibiothérapie

Les bactéries du genre *Borrelia* sont sensibles aux tétracyclines, bêta-lactamines (pénicillines et céphalosporines) et à l'azithromycine. La durée du traitement est nécessairement longue (environ 1 mois) afin d'éliminer les bactéries séquestrées dans les tissus. Cependant, une amélioration des symptômes en réponse aux antibiotiques est observée en trois à cinq jours si le diagnostic est correct (Krupka *et* Straubinger 2010). Le traitement doit être mis en place le plus rapidement possible étant donné que son taux de succès est plus élevé lorsqu'il est initié tôt dans l'évolution de la maladie. Le traitement des animaux qui présentent des anticorps spécifiques en l'absence de signes cliniques est controversé (Littman 2003).

Le traitement de première intention de l'arthrite de Lyme chez l'homme s'appuie sur l'amoxicilline (500 mg BID) ou la doxycycline (100 mg TID) par voie orale pendant 4 semaines (Steere *et* Angelis 2006). Commercialisée en spécialité vétérinaire sous forme de comprimés, la doxycycline est la molécule la plus couramment utilisée dans le traitement de la maladie de Lyme chez le chien à la dose de 10 mg/kg/j pendant 4 semaines (Krupka *et* Straubinger 2010). Elle confère l'avantage de pouvoir traiter l'animal par voie orale par son propriétaire et reste relativement bon marché. Les possibles co-infections avec *Anaplasma phagocytophilum* sont également traitées grâce à cette molécule.

L'oxytétracycline par voie intra-veineuse s'est montrée plus efficace chez le cheval car des concentrations plus élevées sont obtenues dans les tissus en comparaison avec la doxycycline administrée par voie orale. L'oxytétracycline n'est pas recommandée par voie orale à cause

d'une mauvaise biodisponibilité et du risque d'atteinte du colon (donc de diarrhée) par la molécule active qui n'aurait pas été absorbée (alors que la doxycycline n'est plus sous forme active dans le colon). Un protocole décrit et communément utilisé en pratique aux Etats-Unis recommande l'utilisation de l'oxytétracycline par voie intra-veineuse à la dose de 6,6 mg/kg une ou deux fois par jour pendant 7 à 10 jours puis de la doxycycline par voie orale à la dose de 10 mg/kg BID pendant 1 mois (Divers 2007). Cependant, la doxycycline ne dispose pas d'AMM pour le cheval en France.

Si la maladie se manifeste par une implication du système nerveux, le traitement recommandé chez l'homme requiert la ceftriaxone (céphalosporine) à la dose de 2g/j ou la pénicilline G à 18 000 - 24 000 UI/j, car les bêta-lactamines passent efficacement la barrière hémato-méningée (Blanc *et al.* 2008). Ainsi le traitement recommandé en cas de neuroborréliose équine est la pénicilline procaine par voie intramusculaire à la dose de 30 000 – 45 000 UI/kg/j (Portier *et al.* 2002).

5.2. Prise en charge des boiteries

Il convient d'associer un anti-inflammatoire non stéroïdien à l'antibiothérapie, en début de traitement, de façon à gérer la douleur causée par l'arthrite et responsable de la boiterie, en particulier si celle-ci est sévère. Les doses et la durée de ce traitement doivent rester parcimonieuses pour éviter les effets indésirables de cette classe de molécules (lésions gastro-intestinales et rénales). Les tétracyclines présentent des propriétés anti-inflammatoires en outre de leur activité antibiotique, d'où un double intérêt dans le traitement de l'arthrite de Lyme (Divers *et al.* 2001). L'échec du traitement antibiotique peut être révélateur d'une arthropathie à médiation immune qui peut être secondaire à la borréliose et qui répond généralement à une corticothérapie.

6. Prévention de la maladie de Lyme

6.1. Lutte contre les tiques et antiparasitaires externes

C'est le moyen le plus efficace d'empêcher l'infection par *Borrelia burgdorferi*. Une inspection rigoureuse de la présence de tiques fixées sur la peau et leur retrait dans les 24 heures après passage dans une zone à risque est recommandée. L'utilisation d'alcool ou d'éther est déconseillée car la tique régurgite les bactéries éventuellement hébergées sous l'effet du stress provoqué par ces substances (Halos 2005).

Des topiques répulsifs ou acaricides sont efficaces pour prévenir les infestations de tiques sur les chiens. Plusieurs molécules et formulations sont disponibles sur le marché en France (Tableau 3). Si l'amitraz empêche la fixation des tiques en paralysant leurs pièces buccales, d'autres molécules comme le fipronil ne tue les tiques qu'après 24h à 36h de fixation (par exposition au produit), ce qui est généralement suffisant pour éviter la transmission de *Borrelia burgdorferi*, mais pas nécessairement pour d'autres maladies transmises par les tiques. Ces deux molécules peuvent être utilisées en synergie (comme c'est le cas avec CertifectND).

Les produits contenant de la perméthrine ne doivent en aucun cas être utilisés sur les chats en raison de ses effets toxiques chez cette espèce.

Tableau 3 : Topiques acaricides avec indication pour le chien en France

Source : *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2011*

Molécule	Formulation	Nom déposé	Efficacité
Fipronil	Spot On	Frontline ND , Certifect ND	4 semaines
	Spray (ou spot on)	Effipro ND	
Amitraz	Collier	Préventic ND	4 mois
	Spot On	Certifect ND , Promeris Duo ND	4 semaines
Tétrachlorvinphos	Collier	Tétratic ND	3 mois
Dimpylate	Solution cutanée	Dimpygal ND	?
Pyriprole	Spot on	Prac-Tic ND	4 semaines
Deltaméthrine	Collier	Scalibor ND	5 mois
Perméthrine	Spot on / Shampoing	Advantix ND / Pulvex ND	4 semaines
	Spray	Defendog ND	
Fluméthrine	Collier	Kiltix ND / Seresto ND	7 mois / 8 mois
Tétraméthrine	poudre, shampoing	Laboratoire Omega Pharma	?
Bioalléthrine	Shampoing, spray	Ectoskin ND	?

Deux antiparasitaires externes acaricides de la famille des organophosphorés ont conservé une autorisation de mise sur le marché en France pour le cheval : DimpygalND à base de dimpylate, et SébacilND à base de phoxim, présentés sous forme de solution externe à diluer. SébacilND a une action rémanente pouvant aller jusqu'à 7 semaines.

6.2. Vaccination

Dans les années 1990, un vaccin humain a été développé et autorisé exclusivement aux Etats-Unis. Il s'agit d'un vaccin recombinant qui utilise la protéine OspA de la bactérie *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, seule géoespèce (cf. Partie 2) pathogène en Amérique. Il était recommandé pour les personnes vivant dans les zones d'endémie et dont les activités les

exposent de façon plus importante aux tiques. Mais plusieurs effets indésirables liés au vaccin, principalement des réactions locales, des symptômes systémiques et des troubles musculo-squelettiques, ont été rapportés après l'autorisation de mise sur le marché, soulevant des questions par les médias et l'opinion publique, et conduisant à une chute des ventes en 2001 malgré le soutien de la Food and Drugs Administration (FDA). Le vaccin a été retiré du marché en 2002 pour raisons économiques, signant la perte d'un puissant moyen de prévention de la maladie de Lyme aux Etats-Unis (Nigrovic *et* Thompson 2007).

Le mode de prévention qui était utilisé consiste à stimuler la production d'anticorps spécifiques anti-OspA qui combattent la bactérie non dans l'organisme de l'hôte mais dans la tique fixée à celui-ci. OspA est une des protéines de surface de l'enveloppe externe de la bactérie (cf. Partie 2), exprimée uniquement lorsque la bactérie se trouve dans la tique. Les anticorps vaccinaux anti-OspA circulent dans le sang du patient et sont ingérés par la tique lors de son repas de sang. Ils neutralisent la bactérie avant sa migration vers les glandes salivaires de la tique et inhibent sa croissance. En revanche, si les *Borrelia* ont déjà infecté le patient, les anticorps anti-OspA ne les affecteront pas car l'expression des protéines de surface change lorsque la bactérie infecte l'hôte mammifère (OspA laisse place à OspC et VlsE). La protection du patient contre l'infection, c'est-à-dire la prévention de la transmission du spirochète de la tique à l'hôte, ne peut avoir lieu que lors de phases où le taux d'anticorps anti-OspA est élevé. C'est pourquoi des rappels de vaccination fréquents sont nécessaires.

De plus, par ce procédé, les anticorps anti-OspA, strictement vaccinaux, sont bien différenciables en sérologie des anticorps produits suite à une infection naturelle.

Chez le chien, en revanche, un vaccin recombinant similaire à celui qui avait été développé pour l'homme est toujours sur le marché (MERIAL, RecombitekND Lyme). Deux autres laboratoires (INTERVET NobivacND Lyme et ZOETIS LymevoxND) ont également développé en Amérique du Nord un vaccin canin contenant deux isolats inactivés de *Borrelia burgdorferi* stimulant chacun la production d'anticorps dirigés contre OspA pour l'un et OspC (une autre protéine de surface) pour l'autre. Cette double action améliorerait le niveau de protection contre la maladie, les anticorps anti-OspC étant efficaces à la fois dans la tique et dans l'organisme du chien (Krupka *et* Straubinger 2010). Le protocole de vaccination recommandé inclut deux injections de primo-vaccination à 2-3 semaines d'intervalle suivies de rappels annuels.

L'essai de vaccination sur des poneys de 1 an avec le vaccin recombinant OspA a montré une protection complète contre l'infection après exposition expérimentale à des tiques *Ixodes scapularis* (espèce américaine) infectées par *Borrelia burgdorferi* (Divers, 2007).

Il n'y a pas de vaccin en Europe ni pour l'homme ni pour l'animal car la prévalence de la maladie est plus faible et il serait nécessaire de protéger les patients contre deux autres génoespèces pathogènes, inexistantes en Amérique : *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*, en incorporant dans le vaccin une combinaison de différents antigènes protéiques appartenant aux différentes génoespèces, ou en développant un vaccin ciblant en amont le vecteur tique lui-même. La piste la plus prometteuse pour ce dernier réside dans l'utilisation d'antigènes des glandes salivaires de la tique qui produiraient des anticorps chez l'hôte, ingérés ensuite par le vecteur lors de son repas de sang (Gray *et al.* 2002).

6.3. Antibioprophylaxie

L'administration d'antibiotiques pour prévenir l'infection après constat de la fixation d'une tique n'est pas une pratique courante, à la fois chez l'homme et chez l'animal. Toutefois, une étude clinique menée chez l'homme dans les régions endémiques du Nord-Est des Etats-Unis a montré qu'une unique dose de 200 mg de doxycycline administrée par voie orale dans les 72 heures suivant la fixation de la tique est efficace à 87% pour la prévention de la maladie de Lyme (Nadelman *et al.* 2001).

DEUXIEME PARTIE

Interactions entre agent pathogène, vecteur et hôte

1. Le complexe d'espèces *Borrelia burgdorferi* sensu lato

1.1. Le spirochète

Parmi les bactéries, le genre *Borrelia* appartient à l'embranchement des Spirochètes (*Spirochaetae*) de même que *Leptospira* (auquel appartient l'agent de la leptospirose) et *Treponema* (auquel appartient l'agent de la syphilis) par exemple (Paster *et* Dewhirst 2000). Les spirochètes ont une forme ondulée ou hélicoïdale caractéristique qui permet de les reconnaître sur la seule base de leur morphologie (fig. 13a). A chaque extrémité de la bactérie, sont ancrés dans la membrane protoplasmique des flagelles, dont le nombre est variable selon les espèces, qui entourent le cylindre cellulaire et se chevauchent au centre de celui-ci. Ces flagelles périplasmiques jouent un rôle de cytosquelette responsable de la forme du spirochète et confèrent à ceux-ci une motilité unique leur permettant de se déplacer efficacement dans des milieux très visqueux, comme le tissu conjonctif dans lequel le mouvement d'autres bactéries est réduit ou inhibé (Tsao 2009).

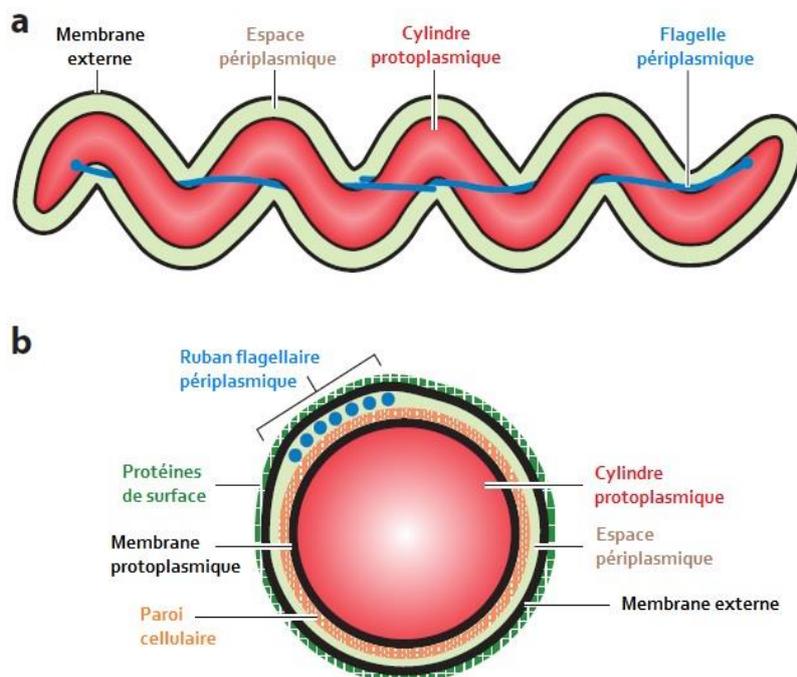


Fig. 13 : Schémas de la structure de *Borrelia burgdorferi*
a. Structure longitudinale
b. Coupe transversale

D'après Charon *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.* 2012, 66, 349-370

Borrelia burgdorferi, d'une longueur de 10 à 20 μm et d'un diamètre de 300 nm, présente une forme d'ondulation plane et périodique de 0,78 μm d'amplitude et de 2,83 μm de longueur d'onde. Elle possède, attachés à chaque extrémité, entre 7 et 11 flagelles selon les espèces, réunis en un ruban occupant l'espace périplasmique (fig. 13b). La rotation de l'ensemble de ces filaments génère une onde rétrograde le long du corps cellulaire qui propulse celui-ci vers l'avant (Charon *et al.* 2012).

1.2. Complexe d'espèces et espèces génomiques

1.2.1. Définitions (Margos *et al.* 2011)

Quand *Borrelia burgdorferi* a été découverte, elle était considérée comme une espèce à part entière. L'évolution des techniques de biologie moléculaire dans l'étude des génomes a permis de montrer qu'il s'agissait en fait de bactéries diverses. *Borrelia burgdorferi* sensu lato est donc un complexe d'espèces, c'est-à-dire un groupe de spirochètes regroupant des espèces très proches génétiquement, appelées espèces génomiques. Une espèce génomique se définit comme le rassemblement de souches ayant des relations ADN-ADN qui se traduisent par des valeurs d'hybridation de plus de 70 %, pourcentage d'hybridation correspondant à une identité de séquence d'au moins 96 %. Lorsqu'une espèce génomique est individualisée, des caractères phénotypiques la distinguant des autres espèces génomiques sont recherchés. En cas de succès, elle reçoit un nom et devient une espèce. *Borrelia burgdorferi* sensu lato compte aujourd'hui 18 espèces (tableau 4).

1.2.2. Les 19 espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Tableau 4 : Espèces connues du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, leurs vecteurs et leurs hôtes

Sources : Rudenko *et al.*, *Ticks tick Borne Dis.*, 2011, 2(3), 123-128

Margos *et al.*, *Infect. Genet. Evol.*, 2011, 11(7), 1545-1563

Espèce (<i>Borrelia</i>)	Vecteur (<i>Ixodes</i>)	Hôtes (réservoirs)	Distribution géographique	Référence de leur description
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> <i>I. hexagonus</i>	Rongeurs	Europe, Asie	Canica <i>et al.</i> 1993
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	Oiseaux	Amérique du Nord	Rudenko <i>et al.</i> 2009a
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	Lapins d'Amérique	Amérique du Nord	Marconi <i>et al.</i> 1995
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Rongeurs	Europe	Margos <i>et al.</i> 2009
<i>B. bissettii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. pacificus</i> <i>I. spinipalpis</i> , <i>I. hexagonus</i>	Rongeurs	Europe Amérique du Nord	Postic <i>et al.</i> 1998
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	<i>I. ricinus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. minor</i> <i>I. scapularis</i> ,	Rongeurs, oiseaux, lézards, grands mammifères	Amérique du Nord Europe	Baranton <i>et al.</i> 1992
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. jellisonii</i> , <i>I. spinipalpis</i>	Rat-kangourou (<i>Dipodomys</i>)	Ouest des Etats-Unis	Postic <i>et al.</i> 2007
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	Rongeurs, oiseaux	Sud-Est des Etats-Unis	Rudenko <i>et al.</i> 2009b
<i>B. finlandensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Lièvre variable	Scandinavie	Casjens <i>et al.</i> 2011
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. uriae</i>	Oiseaux , lézards, rongeurs	Europe, Asie Arctique/Antarctique	Baranton <i>et al.</i> 1992
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Rongeurs	Japon	Kawabata <i>et al.</i> 1993
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	Rongeurs	Amérique du Nord	Margos <i>et al.</i> 2010
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Lézards, rongeurs	Bassin méditerranéen	Le Fleche <i>et al.</i> 1997
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Rongeurs	Chine	Masuzawa <i>et al.</i> 2001
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	Rongeurs	Japon	Fukunaga <i>et al.</i> 1996
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Oiseaux	Japon	Fukunaga <i>et al.</i> 1996
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Rongeurs	Europe	Richter <i>et al.</i> 2006
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. granulatus</i>	Oiseaux , lézards	Europe, Japon	Wang <i>et al.</i> 1997
<i>B. yangtze</i>	<i>I. granulatus</i>	Rongeurs	Chine	Chu <i>et al.</i> 2008

L'adaptation des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato à des hôtes et/ou vecteurs spécifiques (tableau 4) est suspectée d'influencer leur distribution géographique.

En Europe, 9 espèces ont été identifiées dont 3 (*Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* et *Borrelia bavariensis*) sont aussi présentes en Asie (fig. 14), où leur vecteur principal est *Ixodes persulcatus* (*Ixodes ricinus* en Europe). *Borrelia bavariensis* est très proche génétiquement de certaines souches de *Borrelia garinii*. *Borrelia garinii* est également entretenue dans des colonies d'oiseaux marins par la tique *Ixodes uriae*, ce qui signifie qu'elle se trouve aussi dans des sites isolés, en Arctique et dans des îles de la côte Est du Canada (Duneau *et al.* 2008). L'absence de vecteur auquel elle est adaptée à l'intérieur des terres américaines expliquerait pourquoi les cycles entretenus par les oiseaux marins ne se sont pas répandus dans le reste de l'Amérique du Nord (Ogden *et al.* 2009). *Borrelia valaisiana*, dont la répartition se superpose avec *Borrelia garinii* en Europe, semble absente de Russie et d'Asie continentale car rarement associée à *Ixodes persulcatus*, de même que *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Une souche de *Borrelia valaisiana* portée par *Ixodes columnae* a cependant été identifiée au Japon. 3 espèces ont une distribution localisée au Japon : *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi* et *Borrelia japonica*. *Borrelia lusitaniae* est localisée autour du Bassin Méditerranéen, en particulier en Italie, dans la péninsule ibérique et le Nord du Maghreb. Les lézards de la famille des *Lacertidae* constituent ses hôtes principaux. *Borrelia finlandensis* est l'espèce la plus récemment identifiée et se trouve en Scandinavie.

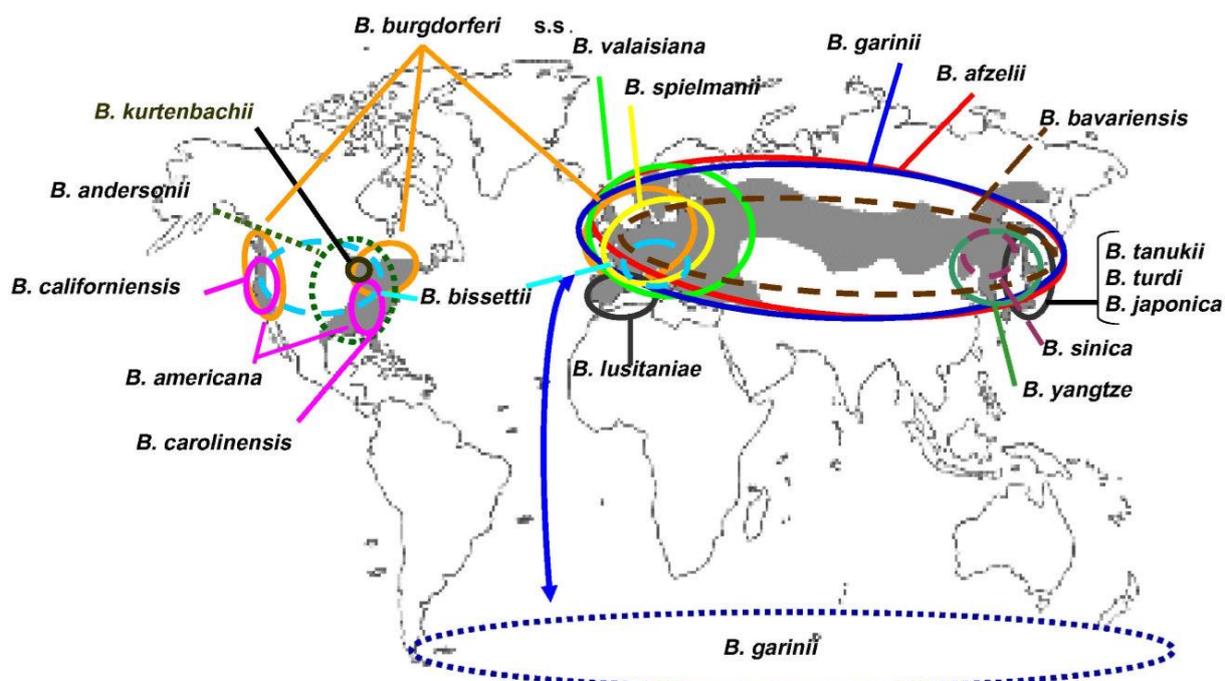


Fig. 14 : Distribution géographique des espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato
La zone grisée correspond à la distribution des vecteurs (cf. fig. 1)

Source : Margos *et al.* 2011

Borrelia burgdorferi sensu stricto et *Borrelia bissettii* ont toutes deux été recensées à la fois en Europe et en Amérique du Nord. Aux Etats-Unis, *Borrelia bissettii* a été trouvée dans le Colorado, l'Illinois, la Californie et en Caroline du Nord et du Sud, portée par *Ixodes spinipalpis* et *Ixodes pacificus*. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto est l'espèce la plus répandue en Amérique du Nord, portée par *Ixodes scapularis* dans le Nord-Est et le Nord Midwest des Etats-Unis ainsi que le Sud du Canada et *Ixodes pacificus* dans l'Ouest des Etats-Unis. 5 autres espèces se rencontrent en Amérique du Nord : *Borrelia andersoni*, *Borrelia californiensis*, *Borrelia carolinensis*, *Borrelia americana* et *Borrelia kurtenbachii*.

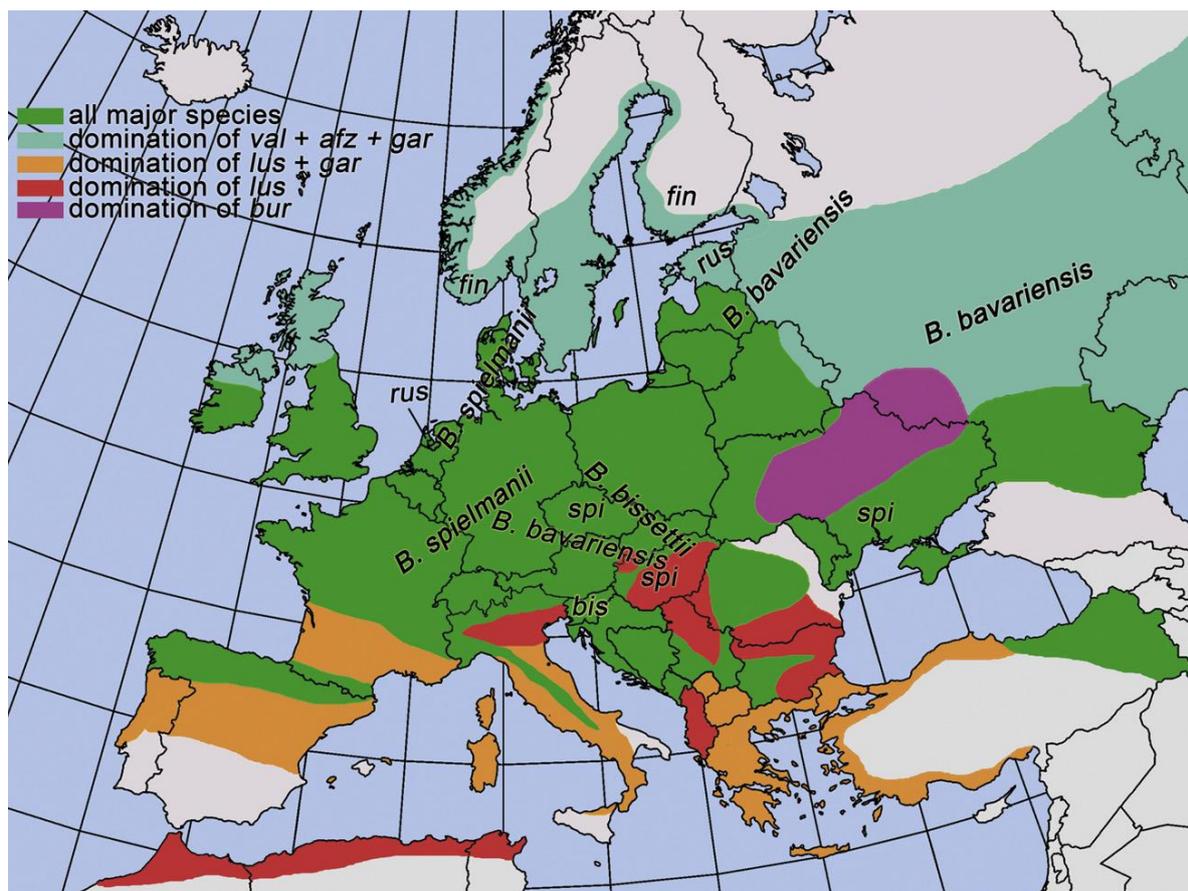


Fig. 15 : Distribution régionale des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en Europe, Asie occidentale et Afrique du Nord
Source : Franke *et al.* 2013

1.3. Espèces pathogènes

Borrelia burgdorferi sensu stricto, *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii* ont longtemps été considérées comme les seules espèces pathogènes, responsables de la maladie de Lyme. Chacune aurait un organotropisme propre et causerait préférentiellement une manifestation clinique spécifique de la maladie de Lyme chez l'homme (Balmelli *et al.* 1995). Les arthrites surviennent surtout en Amérique du Nord (cf. Première Partie), où *Borrelia burgdorferi* sensu

stricto est la seule espèce pathogène d'importance clinique, et résultent majoritairement d'une infection par celle-ci. Les neuroborrélioses sont fortement corrélées aux infections par *Borrelia garinii* même si les deux autres espèces peuvent aussi être associées à des manifestations neurologiques, quoique moins fréquemment. *Borrelia afzelii* semble présenter un organotropisme pour la peau à l'origine des manifestations cutanées secondaires ; c'est l'agent étiologique dominant de l'*Acrodermatitis chronica atrophicans*.

La participation d'autres espèces a été reconnue récemment suite à leur détection chez des patients atteints d'*erythema migrans* (Rudenko *et al.* 2011). Il s'agit de *Borrelia valaisiana* (en Europe), *Borrelia lusitaniae*, identifiée chez une patiente portugaise présentant des lésions cutanées chroniques (Collares-Pereira *et al.* 2004), *Borrelia spielmanii* avec des cas rapportés aux Pays-Bas, en Allemagne, en Hongrie et en Slovénie (Maraspin *et al.* 2006), *Borrelia bissetii*, *Borrelia kurtenbachii* et *Borrelia bavriensis*. Leur implication reste encore à ce jour anecdotique.

2. Le vecteur tique

2.1. Les tiques du genre *Ixodes*

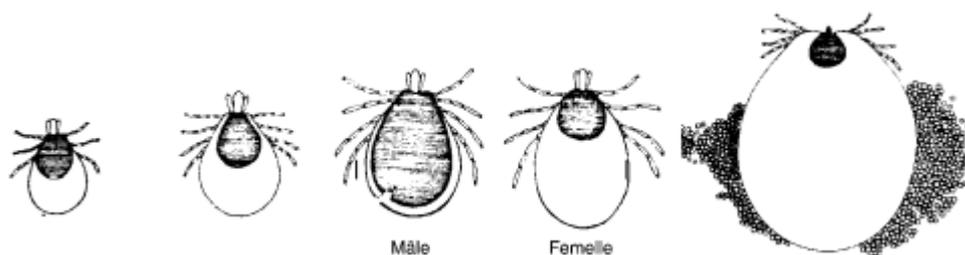
2.1.1. Espèces impliquées

Les tiques sont des acariens qui apparaissent aujourd'hui comme un groupe d'arthropodes vecteurs majeur, le deuxième après les moustiques. La maladie de Lyme est transmise par les tiques dures du genre *Ixodes* : ordre des *Ixodida* (tiques), sous-ordre des *Ixodina* (tiques dures), famille des *Ixodidae*. Les vecteurs-passerelles sont les espèces qui se nourrissent à la fois sur la faune sauvage et sur l'homme et qui présentent un risque zoonotique direct. Il s'agit d'*Ixodes ricinus* en Europe, dont l'aire de distribution se chevauche au Nord-Est de l'Europe avec *Ixodes persulcatus*, espèce asiatique (fig. 1). En Amérique du Nord, les vecteurs passerelles sont *Ixodes scapularis* au Canada et dans l'Est et le Midwest des États-Unis, et *Ixodes pacificus* à l'Ouest des États-Unis (Tsao 2009).

En plus de ces 4 espèces majeures, dites ubiquistes de par leur large spectre d'hôte, d'autres espèces participent au cycle enzootique des spirochètes (tableau 4) mais leur rôle reste mineur dû à leur étroit spectre d'hôtes, comme *Ixodes hexagonus* associée aux hérissons en Europe, *Ixodes spinipalpis* associée aux lapins d'Amérique et aux néotomas, petits rongeurs américains, ou *Ixodes uriae* associée aux oiseaux marins des zones côtières et des îles septentrionales (Franke *et al.* 2013).

2.1.2. Morphologie et anatomie interne (Pérez-Eid 2007)

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des différents stades d'*Ixodes ricinus*
D'après Armour J. *et al.*, *Veterinary Parasitology* 2nd édition, 1996, 183-188



Stade	Larve	Nymphe	Adulte mâle	Adulte femelle	Femelle repue
Taille	0,8-1 mm	1,5-2 mm	3-4 mm	3-6 mm	1 cm
Nombre de pattes	3	4	4	4	4

Comme toutes les tiques dures (*Ixodina*), les *Ixodes* présentent un dimorphisme sexuel, un capitulum rostral antérieur et des parties chitinisées : scutum (écusson dorsal), plaques ventrales, coxae. Leur sillon anal est en forme d'arche et elles ne présentent pas d'yeux, de même que les autres tiques de la famille des *Ixodidae*.



Fig. 16 : Morphologie d'*Ixodes ricinus* (D'après Lapouge 2006)

a. vue dorsale générale, b. vue ventrale sous la base du capitulum (épines coxales), c. vue ventrale du capitulum

Le genre *Ixodes* se caractérise par un gonopore en position postérieure, des épines coxales externes (fig. 16b) servant probablement de structures d'accrochage et des cornes ventrales à la base du capitulum. Chez la femelle, le scutum est hexagonal à arrondi et recouvre le tiers antérieur (parfois jusqu'à la moitié) du dos (fig. 16a), tandis qu'il recouvre la totalité du dos

du mâle. Le capitulum (fig. 16c) est plus long que large, longiligne avec un hypostome denté et à apex arrondi, permettant l'ancrage dans la peau de l'hôte.

Trois organes internes (fig. 17) ont une importance directe ou indirecte dans la transmission de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (cf. 2.2.3).

Les glandes salivaires organisées en grappes d'acini ont une fonction sécrétoire qui aide au percement de la peau, à la fixation à l'hôte grâce au ciment et au prélèvement de sang grâce à des substances d'insensibilisation, anti-coagulantes et anti-inflammatoire (Steen *et*

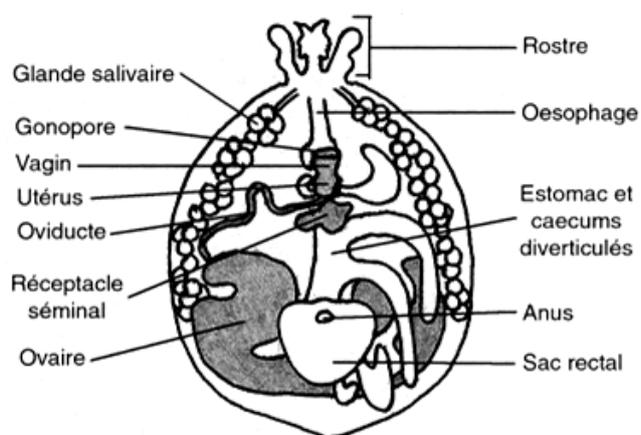


Fig. 17 : Anatomie interne des *Ixodes*
Source : Guétard M. 2001

al. 2006), une fonction sécrétoire de substances hygroscopiques permettant à la tique de survivre sur l'hôte dans des conditions à faible degré hygroscopique, et une fonction d'évacuation de l'eau provenant du sang absorbé (concentration du sang) vers la plaie de fixation dans l'hôte.

Le tube digestif comprend un estomac et de nombreux diverticules constituant des caecums où est dégradée l'hémoglobine puis où sont hydrolysées puis absorbées les protéines.

L'appareil génital de la femelle occupe un volume important, en particulier l'ovaire, unique, en forme de U, dans la moitié caudale de la tique. Celui-ci se prolonge par un oviducte, auquel fait suite l'utérus, arrondi puis le vagin, tubulaire, débouchant sur le gonopore. Lors de l'accouplement, le mâle dépose un spermatophore dans l'utérus de la femelle. Les spermatozoïdes subissent une maturation dans les voies génitales de la femelle. La ponte de jusqu'à 5 000 œufs s'effectue par le gonopore.

2.1.3. Particularités biologiques

Les *Ixodes* sont sensibles aux conditions environnementales car ce sont des parasites exophiles, c'est-à-dire qu'elles passent des périodes prolongées (12 à 18 mois) en mode non parasitaire entre chaque stade, libres dans le milieu naturel (fig. 18). Ces sont des tiques peu thermophiles et très hygrophiles : elles requièrent un taux humidité relative d'au moins 80 % pour échapper à



Fig. 18 : Femelle *Ixodes ricinus* à l'affût
Source : Biopix, JC Schou

une dessiccation fatale (Gray *et al.* 2002). Elles se limitent ainsi à zones dont le climat est tempéré et humide et dont la végétation permet au sol de rester humide y compris lors des périodes sèches de l'année. C'est ainsi que dans les régions au climat très humide du nord de l'Europe par exemple, les *Ixodes* abondent y compris dans les zones ouvertes de landes et de pâturages, tandis qu'en climat méso-humide, elles restent sous couvert forestier ou dans les biotopes d'altitude mais rarement au-delà de 1700 m (Pérez-Eid 2007).

2.2. Cycle de développement d'*Ixodes*

2.2.1. Superposition au cycle enzootique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Les *Ixodes* se développent selon 3 stades (Tableau 5) : larve, nymphe et adulte. Leur cycle est triphasique : chaque stade se nourrit d'un seul repas de sang sur un hôte distinct du stade précédent (fig. 19), pendant plusieurs jours consécutifs. Les larves et les nymphes sont capables de parasiter une large gamme de vertébrés tandis qu'il est plus courant de trouver les adultes sur les grands mammifères, en particulier les cervidés (Pérez-Eid 2007).

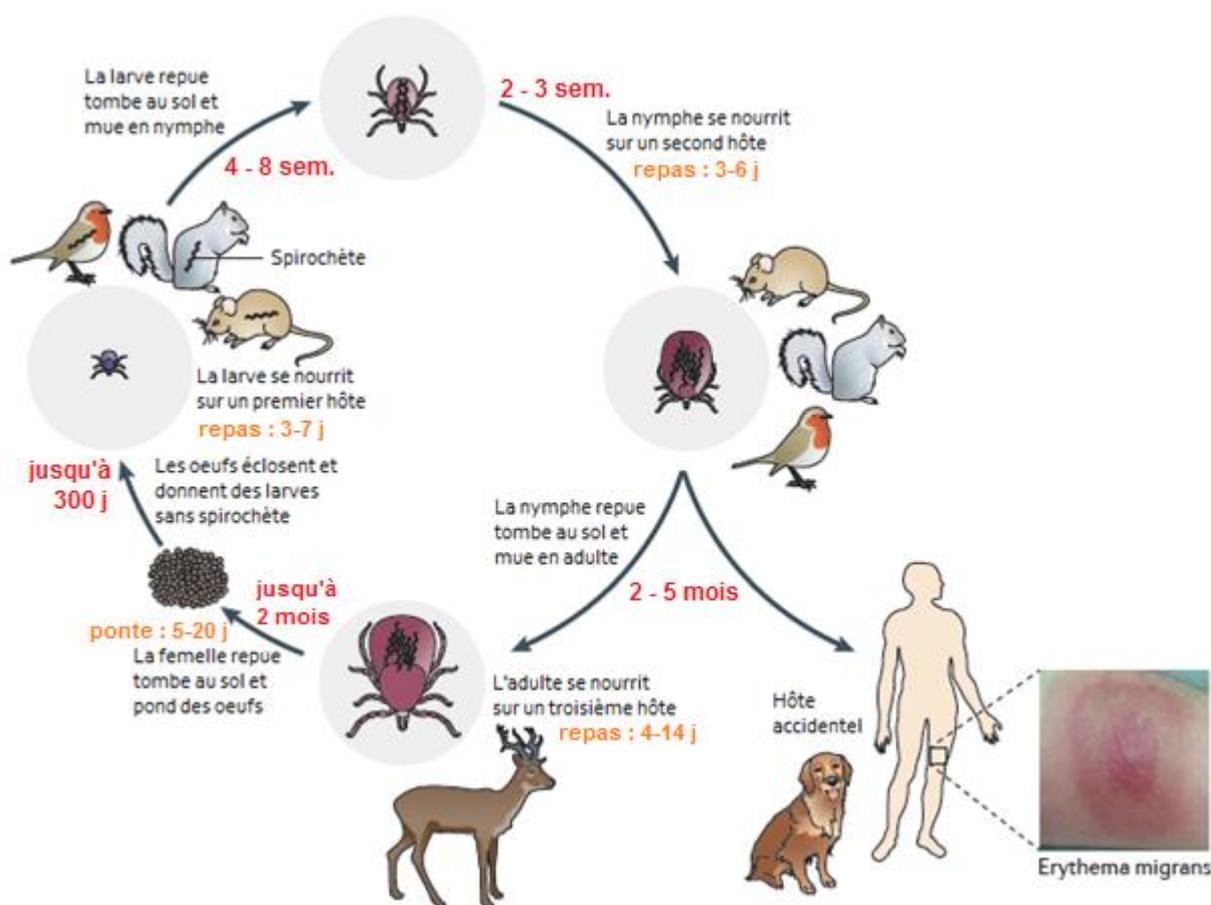


Fig. 19 : Cycle enzootique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato superposé au cycle de développement d'*Ixodes*
D'après Radolf *et al.* 2012
Les périodes de diapause de sont pas représentées.

Bien qu'il existe une transmission transovarienne (de l'adulte à la larve) de certains spirochètes, cela ne survient pas avec les espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Radolf *et al.* 2012). Les larves ne sont jamais infectées lorsqu'elles éclosent (elles ne sont donc pas responsables de la transmission de la maladie). *Borrelia burgdorferi* sensu lato est acquise par la tique après un repas de sang sur un hôte réservoir infecté, et est conservée au cours des mues et des repas de sang suivants. Sa transmission est donc trans-stadiale. Ce sont les nymphes infectées qui perpétuent le cycle de transmission de la bactérie pour les générations de larves suivantes lors de leur repas en inoculant le spirochète à un hôte compétent (rongeurs, oiseaux) qui devient réservoir de la maladie. Les tiques adultes ne jouent pas un rôle important dans la transmission de l'infection car elles se nourrissent principalement sur les cervidés, hôtes non compétents pour *Borrelia burgdorferi* sensu lato (ils ne permettent pas son développement au sein de leur organisme, cf. 3). Cependant, les cervidés sont importants dans l'entretien des populations d'*Ixodes* car les tiques adultes se reproduisent sur eux. L'homme, comme les animaux domestiques, constitue un cul-de-sac épidémiologique car il ne participe pas au maintien de l'infection (Savey *et Dufour* 2004).

2.2.2. Activité saisonnière des *Ixodes*

L'activité de recherche d'hôte des *Ixodes* décrit un cycle saisonnier (fig. 20) qui diffère entre l'Amérique du Nord et l'Europe (Kurtenbach *et al.* 2006). Les différents stades d'*Ixodes scapularis* sont actifs à des périodes différentes dans l'année tandis que ceux d'*Ixodes ricinus* sont actifs de façon synchrone et sur une période plus longue, selon deux pics d'activité au printemps et en automne (un seul pic d'activité au printemps dans le sud de l'Angleterre et en Irlande). Une tique à jeun peut entrer en diapause et redevenir active à la mi-saison suivante ou l'année suivante, tandis qu'une tique gorgée entre en phase de développement. Le cycle de développement des tiques varie selon les conditions climatiques de 2 à 4 ans.

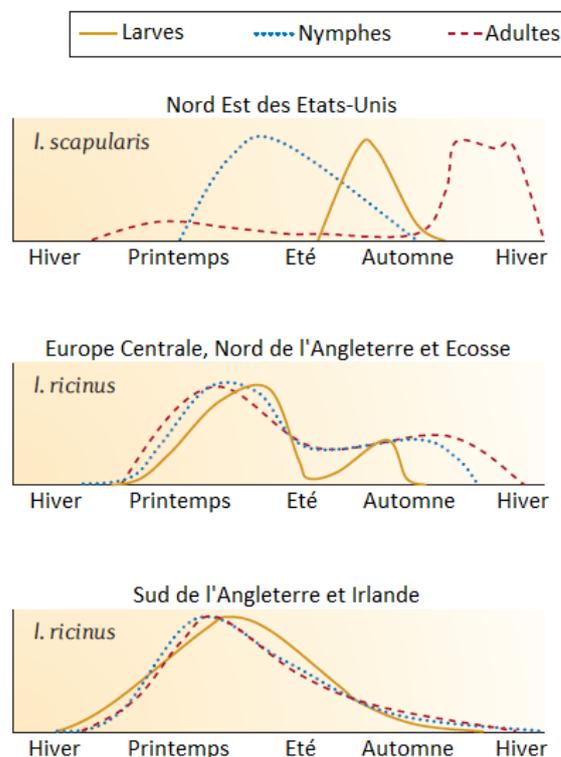


Fig. 20 : Phénologie des *Ixodes*
D'après Kurtenbach *et al.* 2006

La transmission de *Borrelia* est favorisée si les nymphes sont actives au printemps, infectant en premier lieu les hôtes réservoirs, eux-mêmes à l'origine de l'infection des larves, actives un peu plus tard dans la même année (Mannelli *et al.* 2012).

2.2.3. Recherche de l'hôte et fixation de la tique avant son repas

La stratégie de recherche d'un hôte consiste pour la tique à gravir la végétation pour se positionner à des hauteurs diverses selon le stade (à quelques centimètres du sol pour les stades immatures, jusqu'à 1 mètre pour les adultes) et attendre qu'un vertébré passe pour s'y attacher. Les tiques sont dotées d'un organe sensoriel sur la face dorsale de la première paire de pattes, l'organe de Haller, capable d'analyser les odeurs et les phéromones (Pérez-Eid 2007). Des sensilles également localisées sur la première paire de pattes sont pourvues de récepteurs sensibles à la température et aux vibrations. Ces différents attributs leur permettent de repérer un hôte, par perception de son odeur, de ses mouvements, du CO₂ qu'il rejette et du gradient de température occasionné par sa présence (Sonenshine 1991).

Une fois sur son hôte, la tique cherche un point de fixation dans les zones à peau fine de façon à ce que le rostre pénètre facilement dans la peau. Les chélicères (fig. 16c) coupent la peau et pénètrent progressivement dans la peau, accompagnés de l'hypostome dont les dents rétrogrades permettent l'ancrage dans la peau, tandis que les palpes, dont le rôle est sensoriel, restent à la surface. Le ciment, une sécrétion visqueuse issue des glandes salivaires permet de parfaire la fixation (Pérez-Eid 2007). L'action mécanique des chélicères, complétée par une action chimique de composés de la salive de la tique (enzymes lytiques, anti-coagulants et substances vaso-actives) créent un foyer lésionnel dans le tégument de l'hôte où se mêlent sang, lymphes et débris cellulaires (Sonenshine 1991), source du repas de la tique.

2.3. L'interface *Borrelia* – *Ixodes* : adaptations moléculaires

2.3.1. Acquisition du spirochète par la larve *Ixodes*

Le premier maillon de la chaîne d'infection qui perpétue le cycle enzootique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato est le passage du spirochète d'un hôte infecté (rongeurs et oiseaux le plus souvent) à une larve d'*Ixodes* non infectée. Des stimuli chimiotactiques seraient envoyés par la tique dans sa salive ou provoqués par l'action du repas larvaire dans le tissu cutané de l'hôte et seraient responsables de la migration des spirochètes vers le site de fixation de la tique puis de leur entrée dans l'hypostome (Radolf *et al.* 2012). L'acquisition des bactéries

par la larve est rapide car elles peuvent être détectées par immunofluorescence dans le tube digestif larvaire 24 heures après la fixation de la tique, c'est-à-dire avant que des quantités de sang significatives soient absorbées (Schwan *et Piesman* 2000).

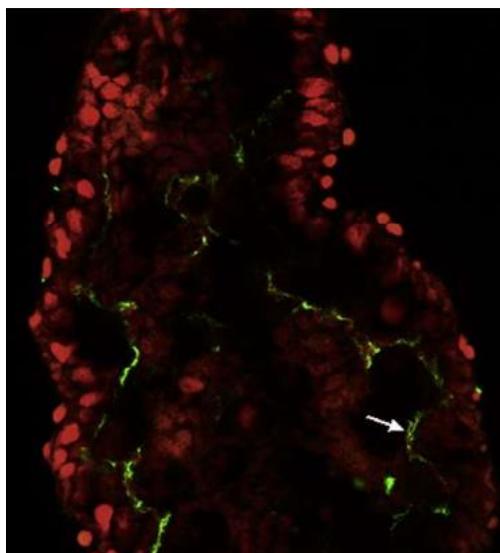


Fig. 21 : Colonisation du tube digestif d'*Ixodes scapularis* par *Borrelia burgdorferi*
Source : Pal *et* Fikrig 2003

La bactérie doit éviter d'être digérée par la tique. Une protéine de surface de la membrane externe de la bactérie, OspA, apparaît pendant l'acquisition larvaire de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. En effet, l'expression du gène OspA est activée en réponse à la présence d'adrénaline et de noradrénaline dans la peau de l'hôte, dont la production est elle-même induite par l'agression mécanique et chimique de la peau occasionnée par le repas de sang de la tique (Scheckelhoff *et al.* 2007). OspA se lie à un récepteur, TROSPA (Tick Receptor for OspA), présent à la surface des cellules épithéliales du tractus digestif d'*Ixodes*. La production de ligands

tels que TROSPA par le génome d'*Ixodes*, favorisant la colonisation de leur tube digestif par les spirochètes (fig. 21, obtenue par immunofluorescence), de même que la tolérance du système immunitaire de ces tiques envers la bactérie, sont des éléments qui contribuent à la compétence de ce vecteur pour *Borrelia* (Tsao 2009).

2.3.2. Survie trans-stadiale et persistance du spirochète dans la tique

L'adhésion de *Borrelia* aux cellules épithéliales du tube digestif d'*Ixodes* par l'intermédiaire d'OspA est un moyen d'empêcher l'internalisation des spirochètes pendant les premières phases de la digestion du repas de sang, puisque la digestion du sang hémolysé est intracellulaire, après endocytose dans les cellules digestives (Pal *et* Fikrig 2003). OspA peut également se lier à elle-même, ce qui explique les agrégats de spirochètes constatés dans le tube digestif d'*Ixodes*. Ce solide attachement à l'épithélium digestif permet à la bactérie de résister aussi à la période de mue de la tique.

L'entrée de sang dans le tube digestif de la tique déclenche une vague de réplication des spirochètes qui peut se prolonger jusqu'à la mue (Radolf *et al.* 2012). Une fois la tique détachée de son hôte après le repas de sang, la réserve de glucose dans la lumière de son tube digestif s'épuise, et la bactérie doit utiliser d'autres sources d'énergie. En particulier, le

glycérol, produit par *Ixodes* et dont les propriétés antigél lui permettent de survivre pendant l'hiver, peut être transformé en dihydroxyacétone phosphate (qui entre dans le cycle de la glycolyse, conduisant à la synthèse d'un ATP) par un équipement protéique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato codé par l'opéron *glp* (Pappas *et al.* 2011).

L'expression de Bb0690, protéine homologue à une Dps (DNA-binding proteins from starved cells) dont le rôle est de préserver l'ADN contre le jeûne et le stress oxydatif, état rencontré dans la tique nymphe dans l'attente de son repas de sang, est activée lors de la phase de quête de la nymphe. Cette protéine préserve l'intégrité de l'ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les nymphes à jeun et est cruciale pour la survie de la bactérie entre les repas de sang de la tique (Tsao 2009).

3. Dynamiques de transmission aux hôtes vertébrés

3.1. Transmission de *Borrelia* de la tique à l'hôte

3.1.1. Passage des spirochètes du tube digestif aux glandes salivaires de la tique

La transmission de *Borrelia burgdorferi* sensu lato au vertébré survient après le repas de sang de la nymphe *Ixodes*. Dans le tube digestif de la tique, se déroulent des interactions entre les spirochètes, les nutriments et les facteurs de l'hôte contenus dans le repas de sang. Certaines de ces molécules, additionnées aux changements métaboliques dans les bactéries occasionnés par ce nouvel environnement, sont requises pour activer le programme génétique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato associé à la transmission (Radolf *et al.* 2012). OspA disparaît ainsi au profit d'OspC, une autre protéine de surface de la membrane externe de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. De même qu'OspA aide à la colonisation du tube digestif d'*Ixodes*, OspC permet l'invasion des glandes salivaires de la tique (Pal *et al.* 2004).

Borrelia burgdorferi sensu lato progresse dans l'organisme de la tique au cours du repas de celle-ci, selon un mode de dissémination biphasique, correspondant au basculement entre les deux programmes génétiques (Dunham-Ems *et al.* 2009) : dans un premier temps, les spirochètes, situés à différents niveaux au sein de l'épithélium digestif de la tique, se répliquent intensément au début du repas de la tique, formant un réseau de bactéries non motiles car toujours attachées aux cellules de l'épithélium qui, elles, subissent une différenciation puis leur détachement à la surface de l'épithélium. Les bactéries entrent alors dans la seconde phase de dissémination en devenant mobiles (leur détachement des cellules coïncidant avec l'inhibition de l'expression d'OspA) et parviennent à parachever leur sortie

du tube digestif, naviguer dans l'hémocèle (liquide dans lequel baignent les organes internes de la tique) et traverser la barrière des glandes salivaires, dernière étape avant la transmission au vertébré. Ce phénotype « mobile » persiste ensuite dans l'hôte.

3.1.2. Une transmission assistée par la salive de la tique

La salive des tiques joue un rôle prépondérant dans l'interface hôte-vecteur-agent pathogène, exploitée par *Borrelia* dans sa transmission de la tique à l'hôte. Différentes protéines salivaires lui confèrent les propriétés anticoagulantes, anti-inflammatoires et vaso-actives qui facilitent la fixation de la tique dans la peau en luttant contre les réponses hémostatiques de l'hôte. D'autres, comme ISAC, présentent une activité anti-complément de l'hôte et interviennent dans les défenses de la tique contre la réponse immunitaire de l'hôte et plus précisément la voie alterne du complément (Fikrig *et* Narasimhan 2006). L'activité anti-complément varie d'une espèce d'*Ixodes* à l'autre et a été corrélée à la gamme d'hôtes correspondant à chaque espèce d'*Ixodes* (Randolph 2009). La salive de tique aide également à la transmission de *Borrelia* en participant à son échappement au système immunitaire de l'hôte. En effet, il a été montré que la protéine de surface OspC de *Borrelia* se lie à une protéine salivaire d'*Ixodes*, Salp15. Cette liaison permettrait de masquer OspC aux yeux du système immunitaire de l'hôte et donc de protéger la bactérie de l'implication des macrophages, des lymphocytes T CD4+ et des anticorps (Ramamoorthi *et al.* 2005).

3.2. Stratégies de survie de *Borrelia* dans l'hôte immuno-compétent

L'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte vertébré pendant l'infection est une fonction importante développée par *Borrelia burgdorferi* et accomplie selon 2 mécanismes identifiés et décrits ci-après.

3.2.1. Recombinaison au locus du gène *vls*

Il existe une protéine de surface immunogène de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, VlsE, dont la séquence ADN *vls* (contenant 15 cassettes de gène silencieuses et 1 séquence codante VlsE) est exclusivement exprimée une fois que la bactérie se trouve dans l'hôte mammifère (Levy 2002). Cette protéine se compose de 2 régions constantes (une à chaque extrémité) et d'un domaine variable constitué de 6 régions constantes et 6 régions variables. La conformation spatiale de VlsE est telle que les 6 régions variables sont celles qui sont

exposées à la surface de la protéine et constituent donc des régions antigéniques, accessibles aux anticorps de l'hôte (Liang *et al.* 2000). Les cassettes de gène silencieuses peuvent se recombiner avec la séquence codante, et conduire à la variation génétique de ces régions (Zhang *et Norris* 1998), de même que des mutations ponctuelles (Sung *et al.* 2001). Le spirochète utilise cette conversion génétique au cours du temps pendant l'infection pour créer une variation antigénique et échapper ainsi au système immunitaire de l'hôte pour survivre dans son organisme. En d'autres termes, le spirochète se « déguise » avec cette protéine de surface variable tant qu'il est actif dans l'hôte.

3.2.2 Inhibition du complément de l'hôte

Le système du complément joue un rôle de barrière important dans la prévention de l'infection par les micro-organismes. Il comprend plus de 30 protéines qui interagissent quand le système est activé. Son activation peut se faire par la voie classique (par l'intermédiaire des complexes antigène-anticorps), la voie des lectines et la voie alternative (toutes deux par fixation à la surface des micro-organismes). Les 3 voies convergent vers l'étape de clivage de C3 (composant du complément) en C3a et C3b. C3b, le plus gros des deux fragments, se lie à la surface du micro-organisme et induit son internalisation par les phagocytes.

Borrelia burgdorferi, comme d'autres agents pathogènes, utilise un moyen d'échapper à la cascade du complément : elle possède des lipoprotéines de surface de la famille des *Erp*, capables de se lier au facteur H, protéine plasmatique de régulation de la voie alterne du complément agissant comme cofacteur du facteur I dans l'inactivation de C3b. Cette liaison a pour effet de promouvoir l'activité du facteur H, c'est-à-dire la dégradation de C3b, annulant la phagocytose du spirochète (Anguita *et al.* 2003).

3.3. Hôtes vertébrés impliqués et spécialisation des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

3.3.1. Pattern d'association entre espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et groupes de vertébrés

Plusieurs études indiquent aujourd'hui que les espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato sont entretenues dans la nature par différents spectres d'hôtes vertébrés, tandis qu'elles sont toutes transmises par une seule espèce de tique selon la région géographique considérée (tableau 4). En Europe par exemple, *Borrelia afzelii* est associée aux rongeurs tels

que les souris et campagnols (Humair *et al.* 1995) tandis que les populations de passereaux et d'oiseaux marins hébergent *Borrelia valaisiana* et certaines souches de *Borrelia garinii* (Gylfe *et al.* 2000). D'autres souches de *Borrelia garinii* sont associées également aux rongeurs. D'un point de vue général, on distingue 3 groupes de souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato :

- les souches adaptées aux rongeurs, dont les principales sont *Borrelia garinii* (souche NT29, pathogène pour l'homme), *Borrelia afzelii* (pathogène pour l'homme), *Borrelia bissettii*, et *Borrelia japonica*.
- les souches adaptées aux oiseaux, parmi lesquelles *Borrelia garinii* (souche 20047, pathogène pour l'homme), *Borrelia valaisiana* et *Borrelia turdi*
- les souches qui ne sont pas spécialisées (généralistes) : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (pathogène pour l'homme).

La stratégie généraliste pourrait être une adaptation à des rencontres fortuites avec des hôtes peu abondants. Elle expliquerait pourquoi *Borrelia burgdorferi* sensu stricto est répandue dans le Nord-Est des Etats-Unis alors qu'il y a eu destruction des habitats naturels à grande échelle et une quasi disparition des cervidés (hôte préférentiel d'*Ixodes*) durant la colonisation. En Europe continentale, où de grandes étendues d'habitats naturels ont été préservées pendant des siècles, les espèces de *Borrelia* sont plus spécialisées et se sont adaptées à des hôtes relativement abondants (Kurtenbach *et al.* 2006).

Par ailleurs, les ruminants tels que les cervidés ou les bovins ne sont compétents pour la transmission d'aucune espèce de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Telford 1988). Le rôle des ovins est plus incertain mais semblerait également mineur en tant que réservoir de l'infection. Ainsi existe-t-il une complémentarité des différents groupes de vertébrés, les uns hôtes de choix des *Ixodes* (les cervidés), les autres hôtes associés aux différents espèces de *Borrelia* : les uns entretiennent les tiques, les autres la bactérie. Le cycle épidémiologique nécessite ces deux groupes d'hôtes. Les cervidés sont non compétents pour transmettre l'infection, mais ne conduisent pas nécessairement à une réduction du nombre de tiques infectées car ils contribuent majoritairement à l'entretien voire au renforcement des populations d'*Ixodes*. Ils contribuent ainsi indirectement au cycle d'infection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Mannelli *et al.* 2012).

3.3.2. Le rôle clé du système complément de l'hôte

L'élément lytique qui détruit les spirochètes de certaines souches dans le cas des hôtes qui leur sont résistants se trouve être la voie alterne d'activation du complément. Une nette corrélation entre l'association constatée des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato à leurs hôtes vertébrés et le pattern de sensibilité ou résistance au complément de telle ou telle espèce d'hôtes a été mise en évidence (Kurtenbach *et al.* 2002). La sélection des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato s'opère directement dans le tube digestif des tiques suite au repas de sang. Le complément ingéré interagit en effet avec la bactérie dans le tube digestif de la tique. Par exemple, *Borrelia afzelii* se lie spécifiquement aux protéines de contrôle du complément de rongeur lorsqu'il le rencontre dans le repas de sang de la tique sur un mulot, ce qui lui confère une résistance envers ce complément de rongeur, lui permettant de survivre à ce repas de sang et de migrer vers les glandes salivaires de la tique, depuis lesquelles elle est transmise au mulot. En revanche, si *Borrelia afzelii* rencontre un complément aviaire ou celui d'un cervidés, elle sera détruite dans le tube digestif d'*Ixodes* avant toute transmission à l'hôte, coupant également la transmission trans-stadiale de la bactérie. La gamme d'hôtes associée à une espèce ou une souche de *Borrelia burgdorferi* sensu lato est restreinte par le répertoire de gènes de la bactérie codant pour les ligands spécifiques ayant des affinités pour les inhibiteurs du complément.

Tableau 6 : Pattern de résistance de *Borrelia burgdorferi* sensu lato à la voie alterne du complément de certaines espèces de vertébrés (+ : résistant, +/- : partiellement résistant, - : sensible)
D'après Kurtenbach *et al.* 2002

Sérum	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia japonica</i>	<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>Borrelia garinii</i> 200047	<i>Borrelia garinii</i> NT29
Campagnol	+/-	+	+	+	-	-	+
Hamster	+/-	+	+	+	-	-	+
Ecureuil	+/-	+	+	+	-	-	+
Mulot	+/-	+	+	+	-	-	+
Faisan	+/-	-	-	-	+	+	-
Oiseaux marins	+/-	-	-	-	+	+	-
Merle	+/-	-	-	-	+	+	-
Lézard	+/-	-	-	-	+	+	-
Ovin	+/-	-	-	-	-	-	-
Cheval	+/-	-	-	-	-	-	-
Bovin	+/-	-	-	-	-	-	-
Cervidés	-	-	-	-	-	-	-

Concernant la compétence des ovins, des études *in vitro* s'opposent quelque peu aux résultats épidémiologiques, indiquant que certaines espèces de *Borrelia* sont moins sensibles au complément se trouvant dans le sérum ovin en comparaison avec le sérum bovin ou de cervidés (Kurtenbach *et al.* 2002).

3.4. Agrégats de tiques et implications du « co-feeding »

La transmission de *Borrelia burgdorferi* sensu lato d'une tique à l'autre peut toutefois avoir lieu via un hôte peu compétent (les ovins par exemple, Ogden *et al.* 1997) par le phénomène de « co-feeding » : la présence d'une tique non infectée (larve) se nourrissant en contact étroit sur la peau de l'hôte avec une tique infectée (nymphe) peut conduire à l'infection de la larve en question bien qu'il n'y ait pas d'infection systémique de l'hôte (Mannelli *et al.* 2012). Les spirochètes restent très localisés dans le tégument et ne diffusent que très lentement, et profitent de l'effet immuno-modulateur local de la salive de tique dans la peau de l'hôte. Ce type de transmission est favorisé par les regroupements de tiques sur la peau des vertébrés. Il est particulièrement actif lors d'activité synchrone des larves et des nymphes (fig. 20). Bien qu'il participe de façon moins significative que la transmission systémique au cycle de *Borrelia*, le « co-feeding » replace les hôtes non compétents tels que les cervidés comme potentiels acteurs directs de ce cycle.

Le rôle d'une espèce vertébrée dans la transmission de *Borrelia burgdorferi* sensu lato résulte donc de la combinaison de son immuno-compétence, de la densité de sa population (donc sa disponibilité en tant qu'hôte) et de sa charge en tiques (Brunner *et* Ostfeld 2008). La distribution des tiques sur les vertébrés n'est pas homogène ni le fruit du hasard. La majeure partie des individus portent peu de tiques et la majorité des tiques est concentrée sur une petite fraction d'individus, responsable de la plupart des événements de transmission, bien que la typologie de ces individus soit encore mal connue. Certains facteurs favorisant l'agrégation des tiques sur un individu ont cependant été identifiés chez des rongeurs comme le sexe de l'individu : les mâles seraient, d'une part, plus exposés aux tiques au printemps (période d'activité maximale des nymphes) du fait de leur activité de recherche des femelles, et d'autre part plus immuno-déprimés à cette période du fait de la compétition avec les autres mâles. Les taux plus élevés de testostérone augmenterait aussi la sensibilité aux tiques. Les femelles, elles, seraient plus sensibles aux infestations de tiques plus tard dans l'année, durant la lactation, période d'immuno-dépression sous l'effet combinée de la prolactine et des hormones de stress (Hughes *et* Randolph 2001).

TROISIEME PARTIE

Facteurs écologiques influençant le risque d'infection pour l'homme

1. L'écologie rencontre l'épidémiologie

Le risque d'infection de l'homme par la borréliose de Lyme est relié à la densité de nymphes en phase de quête infectées, elle-même combinaison de la densité de la population de tiques et de la prévalence de l'infection dans les nymphes à jeun. Les causes de variation de ces deux paramètres sont donc essentielles à déterminer dans un but d'évaluation épidémiologique. Cette partie explore les différents facteurs qui agissent sur ces deux paramètres, éléments exposés isolément mais à considérer comme agissant de manière complexe, en synergie les uns avec les autres, sur la circulation de la maladie dans l'environnement.

Les changements de distribution du vecteur sont importants à prendre en compte dans l'évaluation et la gestion du risque associé à la maladie de Lyme pour la santé publique. Une élévation de la densité du vecteur est en effet susceptible de conduire à une augmentation de l'exposition de l'homme aux tiques. Aux Etats-Unis, de nombreux habitats propices aux *Ixodes* coïncident avec des zones d'habitation humaine ou de loisirs de plein-air, où la faune sauvage reste abondante et adéquate : cervidés pour entretenir les populations de tiques, rongeurs et oiseaux en tant que réservoirs compétents pour les espèces génomiques américaines (Randolph 2001).

Le changement climatique est susceptible de toucher d'une part la survie, le développement et l'activité saisonnière des tiques, d'autre part le nombre, la migration et la diversité des hôtes qui ont un impact sur l'abondance des tiques. Ainsi l'incidence et la distribution de la borréliose de Lyme sont elles affectées en conséquence par l'interaction des effets climatiques sur les populations d'*Ixodes* et celles des hôtes. Au sud de la Suède, il a été possible de relier l'incidence de la maladie au climat, avec une association positive avec des hivers doux et des étés chauds et humides (Bennet *et al.* 2006).

L'émergence de la maladie de Lyme constatée ces dernières décennies trouverait son origine parmi des causes multifactorielles, et le rôle du changement climatique semble prépondérant, affectant le cycle de développement des tiques et la transmission du spirochète, mais encore flou. Il est très difficile actuellement de prédire toute tendance d'évolution de l'incidence de la maladie de Lyme dans des scénarii d'évolution climatique. Des études à long terme sont nécessaires pour collecter des données sur la biologie des tiques, leur distribution et leur abondance, l'évolution de la végétation et l'incidence de la borréliose, en lien avec les données climatiques, de façon à pouvoir développer des modèles probabilistes.

2. La distribution et la densité en tiques

De nombreux facteurs, climatiques, écologiques, paysagers et anthropogéniques, sont impliqués dans les changements de distribution du vecteur *Ixodes* en latitude et en altitude, ainsi qu'à l'intérieur même des zones dans lesquelles il est endémique. Il est cependant difficile de prédire l'effet combiné de tous ces facteurs, eux-mêmes ayant un impact complexe car possiblement à double sens, mais ces pistes méritent d'être explorées.

2.1. Influence du type de végétation d'un habitat

La nécessité d'une végétation conservant l'humidité, la cohabitation d'hôtes vertébrés de tous les stades de tiques et la capacité des tiques à se disperser dans et entre les habitats sont des conditions préalables à la survie d'*Ixodes* dans un habitat et à la réalisation de son cycle de développement. Les habitats favorables sont variables en Europe, leur typologie inclut les habitats forestiers décidus ou mixtes (forêts de feuillus et conifères), les landes de fougères et de graminées, les pâtures. Certaines modifications d'habitats, découlant directement du réchauffement du climat, ont facilité l'expansion de populations d'*Ixodes ricinus*, comme une altération des landes de bruyère dans les hautes terres britanniques envahies par les fougères, les graminées du genre *Molinia* (caractéristiques des prairies humides et tourbières) et le bouleau, formant des couches de végétation maintenant une humidité permanente idéale pour les tiques (Medlock *et al.* 2013). Les espèces animales peuplant ces habitats, moutons, lièvres, cervidés, sont complémentaires car hôtes de tous les stades de tiques dans leur ensemble. La hauteur de la végétation, la présence d'une litière, de fougères et de ronces semblent favoriser l'abondance de tiques (Dobson *et al.* 2011).

2.2. Effet multiplicateur des populations de cervidés

La densité des populations de tiques se trouve directement influencée par celle des populations de cervidés puisqu'il s'agit de l'hôte préférentiel des adultes *Ixodes*, support de leur repas de sang et de leur reproduction donc essentiels à l'entretien des populations de tiques. L'idée que l'expansion des populations de cervidés soit une force majeure dirigeant l'évolution de la distribution d'*Ixodes ricinus* en Europe est renforcée par des études menées au Royaume-Uni. Les raisons expliquant ces mouvements de cervidés semblent être la combinaison de l'adaptation comportementale de ces animaux envers l'homme (c'est-à-dire une meilleure tolérance des perturbations occasionnées par celui-ci), des modifications de leur

habitat (les massifs forestiers subissant des coupes régulières mais aussi du reboisement) et des pratiques en agriculture, et un déclin de leurs prédateurs (Scharlemann *et al.* 2008).

2.3. Influence du climat

2.3.1. Effet de la température et de l'hygrométrie sur la biologie d'*Ixodes*

La biologie d'*Ixodes ricinus* (cf. Partie 2) explique sa sensibilité aux conditions climatiques en mutation et leur impact sur sa survie et son activité saisonnière. Les hivers plus cléments permettent aux tiques de démarrer leur quête d'hôtes plus tôt dans l'année. La population de tiques en phase de quête décline naturellement au moment de l'été au fur et à mesure de l'attache aux hôtes. Les étés plus chauds et secs amplifient cette tendance et conduisent à un accroissement du taux de développement d'un stade à l'autre (Medlock *et al.* 2013).

Dans les régions où les précipitations estivales deviennent rares, la distribution d'*Ixodes* est susceptible d'être réduite en l'absence d'humidité nécessaire à la survie de la tique. La nature de la couverture végétale y est elle aussi affectée, renforçant la dessiccation de l'environnement, fatale aux stades en phase libre dans certaines régions, mais pouvant créer un habitat plus propice à leur survie dans d'autres régions (hautes latitudes et altitudes) par le remplacement de résineux par des feuillus dont les feuilles mortes créent une litière favorable aux tiques.

Des études en Amérique du Nord tendent à montrer que les variations d'amplitude entre les températures estivales et hivernales influenceraient positivement le degré de synchronisation entre les stades larvaire et nymphal, affectant le cycle de transmission de certaines espèces génomiques de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Gatewood *et al.* 2009). La survie de nymphes et d'adultes *Ixodes ricinus* sous des conditions climatiques hostiles est significativement accrue par l'infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Herrmann *et* Gern 2010). Les changements climatiques pourraient donc conduire à une densité plus élevée de tiques infectées, grâce aux avantages que *Borrelia* leur confère pour résister aux stress thermo-hygrométriques. Cette observation demande encore de plus amples investigations.

Des températures plus hautes pourraient perturber la diapause hivernale des tiques. De cette façon, l'incidence de la maladie de Lyme pourrait perdre sa saisonnalité, du fait d'une augmentation de l'activité hivernale des tiques. L'activité de quête demande une combinaison de température et d'humidité favorables : les tiques peuvent rester libres dans l'environnement sous des températures allant jusqu'à 35°C, pourvu que la couverture végétale

confère au sol des conditions d'humidité adaptées (Gray 1984). Les précipitations et la température ont des effets régulateurs interdépendants.

2.3.2. Effet du climat sur la distribution des tiques en altitude

Les conditions optimales pour le développement d'*Ixodes* ne sont pas réunies en altitude, les températures sont trop basses et il y a moins d'hôtes disponibles. L'altitude limite de survie des *Ixodes* est variable selon la région montagneuse considérée, et même au sein d'un même massif, selon l'orientation considérée (nord-sud ou est-ouest), déterminée par le climat : on trouve des *Ixodes* jusqu'à 1450 mètres d'altitude en Suisse, 1560 mètres en Autriche, 1270 mètres en République Tchèque, 700 mètres en Ecosse. A l'inverse, dans les régions méridionales de l'Europe comme en Grèce par exemple, aucune tique *Ixodes ricinus* ne vit en dessous de 600 mètres d'altitude. Dans les Pyrénées, il existe un fort gradient est-ouest le long de la chaîne : à l'ouest, sous influence atlantique, on trouve des tiques jusqu'à 2000 m d'altitude (Medlock *et al.* 2013). A l'est, sous influence méditerranéenne (climat plus sec), les tiques ne survivent qu'autour de 1000 m d'altitude. Plusieurs études de terrain en Europe Centrale (Danielova *et al.* 2006, Materna *et al.* 2005) démontrent une nette élévation du seuil altitudinal, preuve d'une expansion d'*Ixodes ricinus* en lien avec le changement climatique. Cette expansion est due à une élévation des températures annuelles et saisonnières et des précipitations, créant des conditions similaires à celles antérieurement rencontrées à des altitudes plus basses, favorables au développement des *Ixodes*. La période de quête d'hôte est allongée au cours de l'automne, malgré de larges variations inter-annuelles.

Cependant, les tiques ne peuvent pas physiquement parvenir en altitude sans un mode de « transport ». De tels mouvements sont possibles grâce aux hôtes qui les portent vers les sites devenus favorables. Une équipe suédoise suggère que le parallèle entre l'augmentation des températures moyennes hivernales et l'allongement de la période pendant laquelle la végétation n'est pas recouverte de neige a permis aux cervidés de peupler des zones précédemment inhospitalières dans les Alpes et dans les massifs de Scandinavie, permettant à *Ixodes ricinus* de migrer en altitude (Jaenson *et al.* 2011). Les températures plus clémentes influenceraient également la survie des hôtes pendant l'hiver et fourniraient une abondance de petits mammifères pour les stades immatures d'*Ixodes*.

2.3.3. Effet du climat sur la distribution des tiques dans les hautes latitudes

L'expansion latitudinale d'*Ixodes* concerne la Scandinavie, région la plus septentrionale d'Europe, et ses mécanismes sont comparables à ceux qui régissent son expansion altitudinale. Des changements ont été enregistrés dans les années 1980 et 1990 et reliés à la réduction du nombre annuel de jours où la température est inférieure à -12°C , se manifestant par des hivers plus doux, des printemps et automnes plus longs, ainsi qu'une réduction de la durée de la couverture neigeuse, allant de pair avec une expansion de la forêt décidue. Ces changements ont également conduit à une expansion des populations de cervidés permettant à *Ixodes ricinus* de se répandre rapidement vers le nord (Jaenson *et al.* 2012). La limite nord de distribution d'*Ixodes ricinus* s'est déplacée de quelques centaines de km vers le nord en Suède et en Norvège (Jore *et al.* 2011).

Une surveillance plus organisée des populations de tiques, avec des approches harmonisées au niveau européen, permettrait de suivre avec plus de précision l'évolution de la distribution d'*Ixodes ricinus*. Ceci permettrait d'adresser des messages clairs en termes de protection de la santé publique.

3. Les fluctuations de composition des communautés d'hôtes

Comment la transmission et la survie des spirochètes sont-elles influencées à l'échelle de la communauté d'hôtes ? Il n'y a pas de preuve à l'heure actuelle de l'existence d'une régulation du succès reproducteur des hôtes vertébrés par *Borrelia burgdorferi* sensu lato, mais d'autres facteurs ont été identifiés.

La prévalence de l'infection dans les populations de tiques dépend de l'interaction entre la gamme d'espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato présente avec la gamme et la diversité des hôtes du milieu. Les hôtes d'*Ixodes* contribuent à la transmission des spirochètes de façon complémentaire car ils nourrissent des fractions différentes de la population de tiques et sont compétents de manière différentielle pour les différentes espèces génomiques de *Borrelia burgdorferi* (cf. Deuxième Partie). Ce sont ces interactions qui déterminent le pattern d'infection des populations de tiques. Par exemple au Royaume-Uni, les faisans sont extrêmement abondants dans certaines régions et sont les hôtes d'une large proportion de nymphes *Ixodes ricinus*. Ainsi *Borrelia afzelii*, compatible avec les rongeurs, ne peut pas survivre. Ces oiseaux, hôtes majoritairement de nymphes, sont en revanche à l'origine d'une forte prévalence d'infection mixte à *Borrelia garinii* et *Borrelia valaisiana* chez les tiques adultes à jeun (Randolph 2001).

3.1. Débat autour de l'effet de la biodiversité : dilution contre amplification

L'effet de la biodiversité sur l'épidémiologie des maladies infectieuses, dont la maladie de Lyme, est un sujet de plus en plus interpellant depuis la prise de conscience de l'impact de l'homme sur les écosystèmes et la perte inexorable d'espèces vivantes. La biodiversité, dans le sens de la richesse d'un milieu en espèces animales, pourrait jouer un rôle important dans la régulation du risque de borréliose pour l'homme.

Si le rôle des cervidés dans le maintien des populations d'*Ixodes* est bien connu, leur rôle dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme n'est pas encore l'objet d'un consensus. Leur non-compétence pour *Borrelia burgdorferi* sensu lato s'explique par une destruction de la bactérie directement dans le tube digestif de la tique par leur système complétement absorbé dans le repas de sang (cf. Deuxième Partie). Des études montrent que d'importantes populations de cervidés donnent lieu à d'importantes populations d'*Ixodes* mais l'activité « borrelicide » de leur sérum réduit le taux d'infection de ces populations d'*Ixodes* par *Borrelia burgdorferi* sensu lato, donc le risque de transmission de la maladie de Lyme (Rosef *et al.* 2009). C'est l'effet dilution des populations de cervidés. A l'inverse, des milieux plus riches en espèces réservoirs de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, comme les rongeurs ou les oiseaux, soutiennent des populations de tiques dans lesquelles la prévalence nymphale de l'infection est plus élevée (effet amplification).

Des modèles suggèrent également un effet dilution d'une forte diversité d'espèces dans une communauté donnée grâce à la présence de nombreux types d'hôtes différents, potentiellement moins compétents que ceux qui hébergent et transmettent les spirochètes, mais participant autant aux repas de sang des tiques, ce qui a pour effet de réduire la prévalence de l'infection chez les tiques (LoGiudice *et al.* 2003). La biodiversité aurait ainsi un effet tampon sur le risque de maladie de Lyme pour l'homme. Cette hypothèse a été vérifiée sur le terrain dans le sud du Québec au Canada, et mériterait d'être renforcée par d'autres études du même type dans diverses régions (Bouchard *et al.* 2013).

La corrélation ne serait cependant pas aussi simple, et si la composition des communautés d'hôtes affecte bien l'écologie de la maladie de Lyme, plus de biodiversité ne signifie pas systématiquement un risque amoindri pour l'homme (Randolph *et Dobson* 2012). En effet ce schéma se complique en Europe où coexistent plusieurs espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato : des hôtes qui auraient un effet dilution pour une certaine espèce

génomique pourraient avoir un effet amplificateur pour d'autres, par le jeu des associations spécifiques liées à l'activité du complément de ces hôtes.

La situation d'un écosystème donné doit être prise en compte, car la biodiversité peut aussi s'exprimer par une diversité d'hôtes dont la majorité est compétente pour *Borrelia burgdorferi* sensu lato. L'effet dilution ne devrait pas être utilisé à tout prix comme un argument pour la conservation de la biodiversité, qui doit être valorisée pour d'autres raisons.

3.2. Effet du climat et des interactions trophiques

Les rongeurs sont très sensibles à la disponibilité en ressources alimentaires (régulation de type « bottom-up »), ce qui se traduit par des variations intra et inter-annuelles de densité des populations de rongeurs, réservoirs de souches pathogènes de *Borrelia*, à l'origine d'effets complexes sur la dynamique de la borréliose de Lyme (Ostfeld *et al.* 2006). Les conditions climatiques favorables d'une année à pour certaines espèces végétales conduisent à une production abondante de ressources pour les rongeurs dont la densité de population est augmentée l'année suivante (a+1), elle-même étant corrélée à une abondance de nymphes *Ixodes* infectées l'année a+2 (Ostfeld *et al.* 2001), augmentant le risque de borréliose pour l'homme. Un raisonnement identique peut être appliqué aux populations de cervidés, en particulier le chevreuil, hôte le plus important pour l'entretien des populations d'*Ixodes*. Un climat plus doux dans les régions septentrionales ou en altitude leur permettrait de mieux survivre à l'hiver et de grossir les populations d'*Ixodes*.

L'importance de la prédation influence également la démographie des populations d'hôtes (régulation de type « top-down »).

3.3. Impact des migrations

Les tiques ne peuvent pas parcourir de grandes distances seules, la propagation des spirochètes de la borréliose de Lyme est donc sans doute liée à la migration de leurs hôtes. Les oiseaux, en particulier les espèces qui se nourrissent au sol car plus exposées au risque d'infestation par les tiques, constituent des hôtes extrêmement mobiles qui permettent une dispersion des agents pathogènes sur un continent entier et sur une période courte (Kjelland *et al.* 2010). En effet, en plus de transporter des tiques infectées, certaines espèces aviaires sont capables d'héberger *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans leur organisme. Ainsi, la plupart des souches de *Borrelia garinii*, suivie de *Borrelia valaisiana*, sont associées aux oiseaux et de forts taux de migration de ces souches ont été observés (Kurtenbach *et al.* 2006).

3.4. Impact de la modification des habitats

3.4.1. Effet de la fragmentation des habitats

L'effet dilution devrait servir d'incitation à maintenir une haute biodiversité et des communautés animales stables par des pratiques agricoles raisonnées. Par exemple, la fragmentation des milieux forestiers a pour conséquence une diminution de la diversité des mammifères, une diminution de la densité en cervidés et un renforcement de la densité en rongeurs, conduisant à une augmentation du nombre de tiques infectées, à l'origine d'une augmentation du risque de maladie de Lyme pour l'homme (LoGiudice *et al.* 2003). La fragmentation des habitats est par ailleurs un facteur clé dans la mise en contact des populations humaines et les tiques infectées.

3.4.2. Des habitats-mosaïques en reconnexion

La structure des habitats joue un rôle important dans l'invasion de nouvelles zones par *Ixodes*. Alors que les hautes latitudes subissent une réduction de la période de couverture neigeuse et l'expansion de la forêt décidue, de nombreuses parties de l'Europe sont en mutation paysagère, liée à de nombreuses initiatives de reconnexion des habitats, notamment par le reboisement. Le degré de connectivité entre habitats exerce lui aussi une influence sur la présence de tiques de par son effet sur leurs hôtes (Estrada-Peña 2002). Une plus grande connectivité entre parcelles, réduisant la distance qui les sépare, est un élément de défragmentation des habitats, propice à l'invasion et l'établissement par des populations d'*Ixodes* du fait des mouvements d'hôtes vertébrés. Cette défragmentation est encouragée par différents programmes européens de politique agricole et fournissent des couloirs entre les parcelles d'un même habitat, favorisant les passages d'animaux. En Grande-Bretagne, *Ixodes ricinus* s'installe dans la périphérie des parcelles cultivées dont les marges sont laissées à la faune sauvage, en particulier lorsque l'habitat voisin est forestier (Medlock *et al.* 2013). Les espaces boisés sont considérés également comme des habitats en mosaïque, avec une gestion active de la végétation des chemins forestiers qui compartimentent la forêt en parcelles boisées. Toujours en Grande-Bretagne, la création de corridors verts s'introduisant dans les aires urbaines ont conduit les cervidés à coloniser ces zones, et de nombreux problèmes liés aux tiques ont été rapportés dans des zones résidentielles (Jameson *et* Medlock 2010). Le risque pour l'homme est en effet accru dans ces situations car le contact avec les tiques donc la transmission de *Borrelia* sont accrus.

4. Stratégies d'adaptation de *Borrelia* et dynamiques de propagation

4.1. Diversité des spirochètes

La structure des populations des spirochètes de la borréliose est dynamique et se trouve façonnée par la structure des communautés d'hôtes et l'adaptation de l'immunité des hôtes. Un spirochète répandu pourrait ainsi perdre son succès de transmission si le nombre d'hôtes présentant un avantage immunitaire devait augmenter, laissant place à des espèces au génotype plus rare, rencontrées seulement ponctuellement aujourd'hui. Ce mécanisme, encore mal connu, permettrait de maintenir une certaine diversité génétique au sein du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Des différences significatives dans la distribution des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato d'une année à l'autre ont été observées dans les populations de tiques en phase de quête récoltées dans le Nord-Est des Etats-Unis (Qiu *et al.* 1997).

4.2. La spécialisation des espèces de *Borrelia* en Europe

Ce scénario s'est produit en Europe, où coexistent plusieurs espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato spécialisées à un type d'hôtes par une sensibilité différentielle au complément des vertébrés (tableau 6). Par exemple, *Borrelia garinii* et *Borrelia valaisiana* sont adaptées aux oiseaux tandis que *Borrelia afzelii* est adaptée aux mammifères, en particulier les rongeurs. Cette spécialisation aurait occasionné une migration différentielle de ces pathogènes, conduisant à une distribution géographique plus large de *Borrelia garinii*, propagée par les oiseaux. Suivant la théorie de l'évolution, la stratégie de spécialisation est doublement coûteuse pour l'espèce car le vecteur est d'une part un ectoparasite généraliste (il peut parasiter plusieurs types d'hôtes), qui d'autre part absorbe un faible nombre de repas de sang. La probabilité que le vecteur se nourrisse sur un hôte résistant à la bactérie spécialisée est non négligeable, ce qui affecte son succès de transmission, donc sa valeur adaptative (Tsao 2009). C'est pourquoi les espèces spécialistes ne seraient favorisées par rapport aux généralistes qu'en situation d'hôtes abondants, comme en Europe où de grands refuges sylvestres ont été préservés depuis la dernière aire glaciaire. Dans des habitats dont les communautés d'hôtes sont relativement stables dans le temps, la spécialisation survient puisque *Borrelia* est transmise aux mêmes types d'hôtes de façon constante, hôtes qui sélectionnent certaines souches au détriment d'autres. La spécialisation est ensuite renforcée par ces hôtes s'ils contribuent proportionnellement plus aux repas de sang des vecteurs infectés. Si les

communautés de vertébrés ne sont pas stables ou que les hôtes se raréfient, la stratégie généraliste est favorisée.

4.3. La stratégie généraliste de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

Ixodes scapularis, de même qu'*Ixodes ricinus* en Europe, est capable de se nourrir sur toute une gamme d'hôtes mammifères et aviaires. Elle transmet en Amérique du Nord *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, une espèce retrouvée chez de nombreux taxons vertébrés (tableau 6). La nature généraliste de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto serait le résultat d'une adaptation du spirochète à un environnement appauvri en hôtes suite à la destruction à grande échelle des habitats lors de la période post-coloniale, puis de la révolution industrielle, au Nord-Est des Etats-Unis (Hanincova *et al.* 2006). Cette stratégie aurait permis par la suite la croissance de la population de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto et sa propagation géographique rapide en Amérique du Nord (en synergie avec l'expansion de son vecteur *Ixodes scapularis*, favorisé par le reboisement contemporain et la croissance des populations de cervidés), facilitant l'expansion de la maladie de Lyme.

QUATRIEME PARTIE

Etude éco-épidémiologique de la borreliose dans des populations de tiques *Ixodes* du centre de la Grande-Bretagne

1. Contexte de l'étude

Plusieurs études de la distribution de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans des populations de tiques européennes (Kirstein *et al.* 1997, Rauter *et Hartung* 2005, Halos *et al.* 2010, Nazzi *et al.* 2010, Reye *et al.* 2010) ont montré que la prévalence de l'infection varie significativement entre différents sites géographiques, et que la contribution relative des différentes espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato à cette infection varie elle aussi de façon marquée entre ces sites. Les raisons de cette variation ne sont pas toutes élucidées, mais une hypothèse suggère qu'elle reflèterait en partie la composition locale de la faune vertébrée, hôte des tiques et de la bactérie.

Malgré des efforts pour établir la distribution nationale des populations d'*Ixodes ricinus* et ses modifications au cours du temps (Kirby *et al.* 2004, Pietzsch *et al.* 2005, Scharlemann *et al.* 2008, Gray *et al.* 2009, Smith *et al.* 2011), peu d'études à ce jour ont tenté de quantifier la présence de *Borrelia burgdorferi* dans les populations d'*Ixodes ricinus* au Royaume-Uni (Livesley *et al.* 1994, Kirstein *et al.* 1997, Kurtenbach *et al.* 1998, Davidson *et al.* 1999, Ling *et al.* 2000, Vollmer *et al.* 2011). La connaissance actuelle de la distribution de l'agent pathogène est issue des rapports de cas humains de maladie de Lyme (Public Health England). Ces données indiquent l'existence apparente au Royaume-Uni de « points chauds » géographiques où la prévalence de la borréliose humaine est élevée. Au-delà d'une simple présence plus importante de l'agent pathogène dans ces zones, ces « points chauds » s'expliquent par un taux de contact plus élevé entre les tiques et l'homme, résultant d'un taux de fréquentation plus élevé de ces sites (Dobson *et al.* 2011). Un autre facteur déterminant pourrait être la présence relative des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, car certaines sont bien plus pathogènes que d'autres.

Cette étude menée à l'Université de Liverpool (Royaume-Uni) cherche à établir une distribution des tiques infectées par *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans le centre de la Grande-Bretagne. Cette région (fig. 22) a été choisie car de précédentes études se sont concentrées sur l'Angleterre méridionale ou les Highlands écossaises. Le centre de la Grande-Bretagne est réputé pour avoir des populations de tiques abondantes, cependant peu de cas de maladie de Lyme y ont été rapportés.

1.1. Objectifs

- Sélectionner un certain nombre de sites géographiques où la présence de tiques est connue, à travers le Nord du Pays de Galles, le Nord de l'Angleterre et le Sud de l'Ecosse, afin d'y récolter des *Ixodes* libres (en phase de quête).
- Estimer la prévalence de l'infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato chez les nymphes et les adultes dans chaque échantillon prélevé.
- Définir les espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato présentes dans chaque population échantillonnée.
- Analyser le repas de sang des tiques de chaque population pour en déterminer la source (hôtes), et la relative contribution de différentes espèces d'hôtes à l'entretien de chaque population.
- Examiner les relations possibles entre la prévalence de *Borrelia burgdorferi* sensu lato chez *Ixodes* et la distribution des espèces hôtes.
- Etudier l'influence de facteurs tels que la localisation géographique, l'habitat et la densité des tiques de chaque site.

1.2. Sites visités pour le prélèvement des tiques

Les sites d'étude potentiels ont été identifiés en premier lieu par imagerie satellite (Google Earth), outil ayant permis de localiser les zones forestières de Grande-Bretagne centrale et d'autres types de végétation (landes, pâtures, coupes-rases). La pertinence de ces sites, en termes de présence de tiques et de cervidés et de type de végétation, a ensuite été évaluée auprès des services locaux de la Forestry Commission (tiques fréquemment retrouvées sur les animaux abattus à la chasse, retours d'infestations fréquentes des promeneurs) ou des éleveurs locaux (forte prévalence de maladies transmises par les tiques chez les ovins telles que l'anaplasmose ou le Louping ill). Dix-sept sites au total, appartenant à la Forestry Commission (forêts publiques) ou à des éleveurs d'ovins, représentatifs de différents habitats et dispersés dans toute l'aire d'étude, ont finalement été sélectionnés (fig. 23 et 24).



Fig. 22 : Zone d'étude

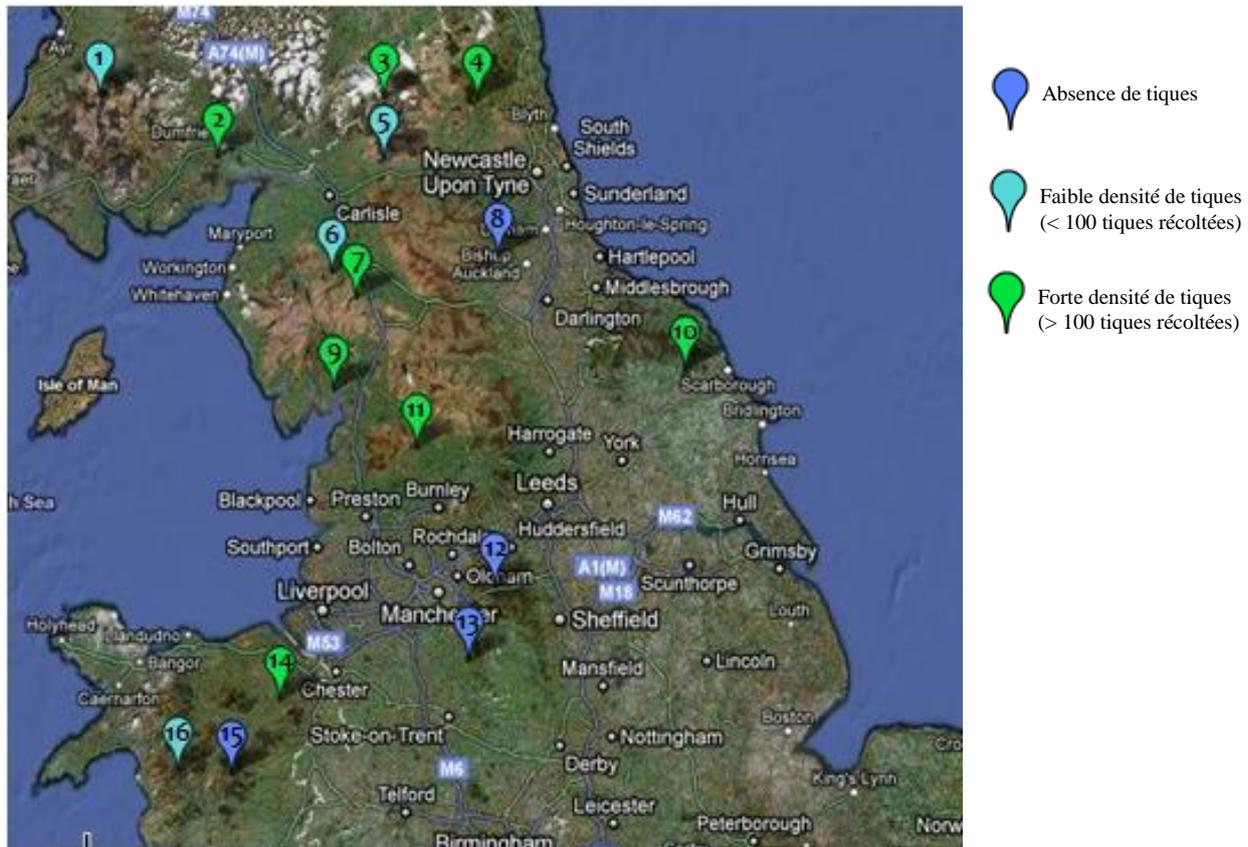


Fig. 23 : Sites visités et densité des populations de tiques

D'après Google maps

- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Loch Doon, East Ayrshire, Scotland 2. Mable, Dumfries and Galloway, Scotland 3. Kielder, Northumberland, England 4. Rothbury, Northumberland, England 5. Gilsland, Northumberland, England 6. Mell Fell (Keswick), Cumbria (Lake District), England 7. Shap, Cumbria (Lake District), England 8. Bishop Auckland, Durham, England | <ol style="list-style-type: none"> 9. Grange-over-Sands, Cumbria (Lake District), England 10. Dalby, North Yorkshire, England 11. Bowland, Lancashire, England 12. Crowden, Derbyshire (Peak District), England 13. Macclesfield, Cheshire East (Peak District), England 14. Graigfechan, Denbighshire, Wales 15. Vyrnwy, Gwynedd, Wales 16. Dollgellau, Gwynedd, Wales |
|---|---|

2. Matériel et méthodes

2.1. Technique de prélèvement des tiques dans le milieu naturel : méthode dite « du drapeau »

Les prélèvements dans les sites d'étude ont été menés par temps frais à chaud (14 à 27 °C) et sans pluie, entre mai et juillet 2010. La plupart des sites n'ont été visités qu'une seule fois. Les tiques *Ixodes ricinus* en phase de quête ont été récoltées à l'aide d'une fine couverture de laine de couleur claire (2 m de longueur, 2 m de largeur) traînée sur le sol par séquences de 10 à 15 m (fig. 24). Les nymphes et adultes *Ixodes* capturés ont été placés dans de l'alcool à 70°.



Fig. 24 : Récolte de tiques par la méthode « du drapeau »
 a. Couverture traînée sur la végétation
 b. Inspection de la couverture
 c. Prélèvement d'une tique

La technique de récolte a été mise au point par MacLeod en 1932 mais n'a pas été standardisée dans cette étude car l'objectif n'était pas de quantifier les populations de tiques présentes. Les récoltes furent effectuées par trois opérateurs et duraient 90 minutes. On évalue la densité de tiques en chaque site au nombre total de tiques prélevées en 90 minutes de récolte. Dans certains sites, pas ou peu de tiques furent trouvées, après 90 minutes de recherche sur plus de 1000 m².

2.2. Extraction de l'ADN présent dans les tiques

Une fois récoltées, les tiques ont été conditionnées individuellement (et par site d'origine) dans des tubes Eppendorf® secs de 1,5 ml, puis conservées à -18°C. L'extraction de l'ADN a été effectuée dans un laboratoire spécifique, différent de celui dédié à la préparation des PCR. Elle consiste à lyser chaque tique, après sortie du congélateur, par une triple action mécanique, thermique et chimique à l'aide d'une solution alcaline (ammoniac à 1,25 %), comme décrit par Guy et Stanek (1991) : chaque tube contenant une nymphe reçoit 100 µl de NH₃, ceux contenant un adulte en reçoivent 250 µl. Un témoin négatif contenant seulement la solution d'ammoniac (sans tique) est préparé toutes les 4 tiques, en vue des techniques de biologie moléculaire. Grâce à l'embout de pipette utilisé pour ajouter l'ammoniac dans chaque tube, chaque tique est écrasée manuellement. Les tubes sont ensuite chauffés à 95 °C pendant 20 minutes, capuchons fermés. Puis ils sont centrifugés pendant 30 secondes à 8000 tours par minute. Ils sont de nouveau chauffés, capuchons ouverts, jusqu'à ce qu'il ne reste que la moitié du volume initial de solution dans chacun d'eux, de façon à concentrer l'ADN. Les échantillons ont été conservés au congélateur à moins 18°C en fin de procédé.

2.3. Détection de l'ADN borrélien dans chaque tique par PCR en temps réel

Les extraits de tiques nymphes et adultes ont été analysés individuellement par une PCR en temps réel ciblant le gène de l'ARNr 23S de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (le protocole utilisé est détaillé en Annexe 1, d'après Courtney *et al.* 2004). Les échantillons positifs pour *Borrelia burgdorferi* sensu lato sont caractérisés par une courbe de fluorescence d'évolution sigmoïde au cours des cycles d'amplification (fig. 25).

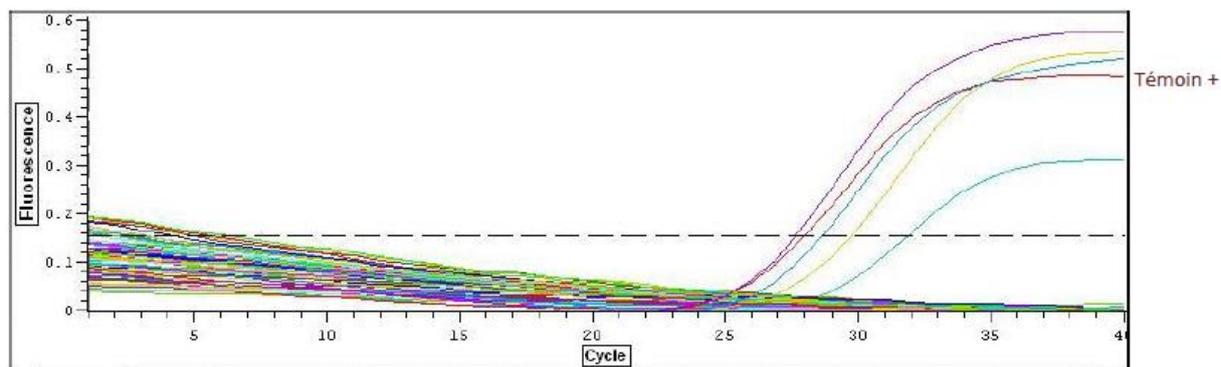


Fig. 25 : Résultats d'une épreuve de PCR en temps réel pour la détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

2.4. Typage des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato présentes dans les tiques nymphes et adultes positives

2.4.1. Par Reverse Line Blotting (RLB)

La technique du Reverse Line Blotting (Alekseev *et al.* 2001, Poupon *et al.* 2006) a été utilisée pour déterminer à quelles espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato les produits de PCR précédemment obtenus correspondaient. Les extraits de tiques positifs pour *Borrelia burgdorferi* sensu lato ont été de nouveau amplifiés par une PCR simple, ciblant cette fois la région de l'ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato située entre les gènes des ARNr 5S et 23S (Rijpkema *et al.* 1995). Un témoin négatif pour 4 échantillons a été utilisé.

On a ensuite testé l'hybridation des produits de cette PCR avec des sondes spécifiques de chaque espèce de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Le RLB est la technique la mieux adaptée pour ce test car elle permet d'analyser simultanément un grand nombre d'échantillons pour un grand nombre de sondes (jusqu'à 40). Son principe est le suivant (protocole en Annexe 2) : les sondes correspondant à chaque espèce génomique sont fixées de façon covalente par leur groupement amine en 5' au groupement carboxyle d'une membrane Biodyne® C (Pall, Dreieich, Allemagne) activée (fig. 26a). Pour cela, la membrane est placée dans un Mini-

Blotter ® 45 (Immunetics, Cambridge, Royaume-Uni) dont les canaux parallèles sont remplis chacun avec une sonde différente (fig. 26b). Après incubation d'au moins une minute à température ambiante, les sondes en excès sont retirées des canaux par aspiration. La membrane est ensuite inactivée par incubation dans une solution de NaOH à 0,1 mol/L pendant 10 minutes puis subit plusieurs lavages.

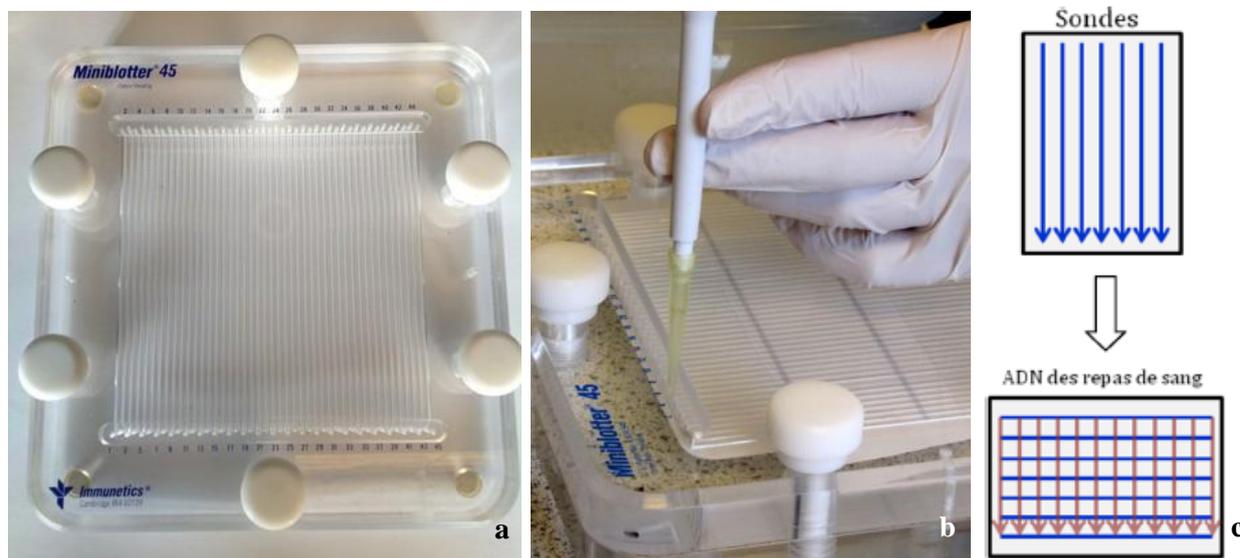


Fig. 26 : Dispositif principal du RLB, le Mini-Blotter ® 45

La membrane est à nouveau placée dans le Mini-Blotter ® 45 mais en la tournant à 90° par rapport à sa position initiale (fig. 26c). Les canaux parallèles sont remplis avec les produits de la PCR ayant amplifié la région intergénique 5S-23S de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans chaque extrait de tique positive, après avoir dénaturé ceux-ci à 100°C pendant 10 minutes, de façon à ce qu'ils puissent s'hybrider. Le système est incubé à 55°C pendant 45 minutes pour permettre l'hybridation, puis les solutions de produits de PCR en excès sont retirées des canaux par aspiration, puis la membrane subit plusieurs lavages.

La membrane est ensuite incubée avec un conjugué streptavidine-phosphatase alcaline pendant 30 minutes à 42°C. Après lavages, elle est incubée pendant 1 minute avec du liquide chémoluminescent, le CDP-Star® (Roche, Mannheim, Allemagne) qui est un substrat de la phosphatase alcaline et qui émet de la lumière pouvant impressionner un film radiographique. Si un échantillon s'est hybridé avec une sonde, il n'aura pas été éliminé par les lavages, et comme il est étiqueté par le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline, la réaction du CDP-Star® pourra se faire et de la lumière sera émise à l'endroit de la membrane où l'hybridation aura eu lieu (fig. 27).

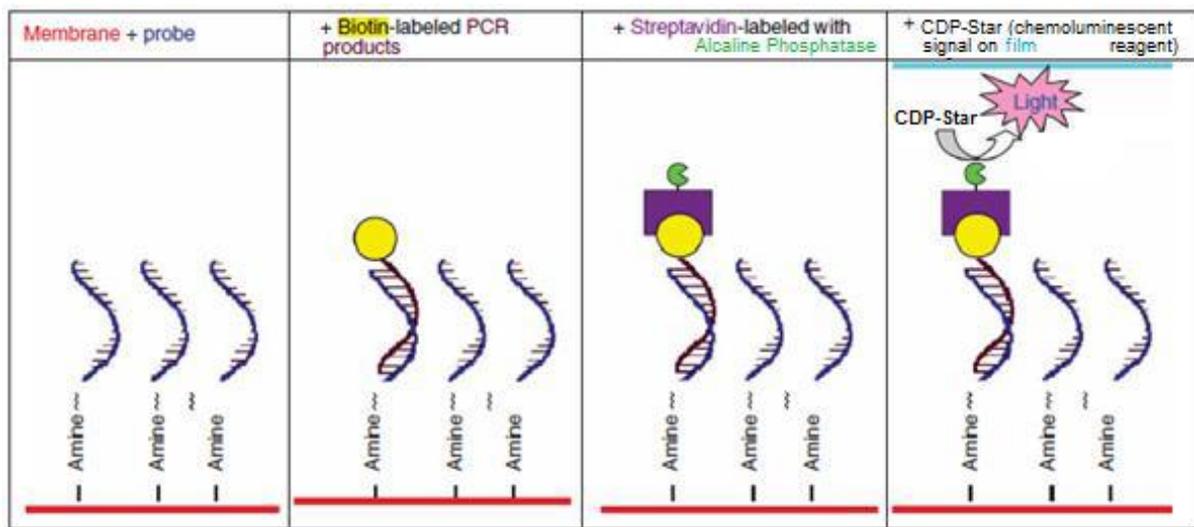


Fig. 27 : Principe du Reverse Line Blotting
D'après Kong F. *et al.* 2006

Les points d'hybridation au niveau de la membrane se traduisent donc par des points d'émission de lumière, enregistrés au niveau d'un film radiographique (Hyperfilm® ECL, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Royaume-Uni) placé sur la membrane dans une cassette radiologique. L'exposition dure 25 minutes, et un développement classique de l'image permet d'obtenir le type de résultat présenté en figure 28. Chaque point noir marque une hybridation entre l'ADN de l'échantillon et une sonde. L'échantillon (lecture verticale) est alors positif pour l'espèce correspondante (lecture horizontale).

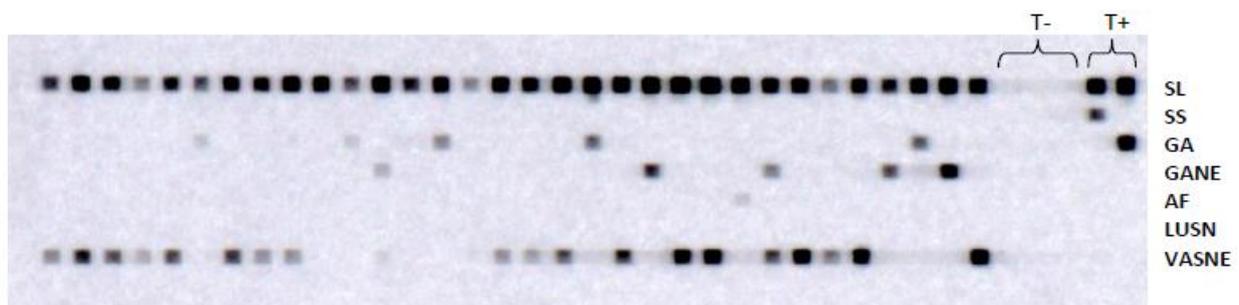


Fig. 28 : Résultat sur film radiographique du typage de *Borrelia burgdorferi* sensu lato par RLB

- SL : *Borrelia burgdorferi* sensu lato
- SS : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto
- GA : *Borrelia garinii*
- GANE : *Borrelia garinii* « new »
- AF : *Borrelia afzelii*
- LUSN : *Borrelia lusitaniae*
- VASNE : *Borrelia valaisiana*
- T- : Témoins négatifs
- T+ : Témoins positifs

2.4.2. Par séquençage

Une analyse comparative des séquences de la région intergénique ARNr 5S - 23S de *Borrelia burgdorferi* sensu lato a également été réalisée sur des extraits de tiques positifs par la compagnie coréenne de biotechnologies MACROGEN, de façon à confirmer les résultats des RLB. Une amplification par PCR de cette séquence, comme décrit précédemment, a été réalisée au préalable, suivie d'un lavage de ses produits par précipitation au polyéthylène glycol (PEG).

2.5. Analyse des repas de sang des tiques par Reverse Line Blotting (RLB)

Evaluer de façon directe la composition en espèces animales d'une communauté d'hôtes vertébrés est difficile, mais elle peut être approchée de façon indirecte en analysant les reliquats de repas de sang des tiques de chaque site étudié, de façon à connaître les espèces des hôtes sur lesquels elles se sont nourries. C'est également grâce au Reverse Line Blot que cette analyse a été tentée, selon le même protocole que pour le typage des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Annexe 2).

Une PCR simple cible un fragment d'environ 145 paires de bases au niveau de l'ADNr mitochondrial 12S des vertébrés qui se trouverait dans le repas de sang des tiques, et qui est utilisé comme un marqueur moléculaire permettant de discriminer les espèces d'hôtes vertébrés (Humair et al. 2007). Les sondes utilisées permettent de distinguer les groupes majeurs d'hôtes susceptibles d'avoir nourri les tiques récoltées (fig. 29). Ces analyses ne sont menées que sur des nymphes car elles n'ont théoriquement absorbé qu'un seul repas de sang.

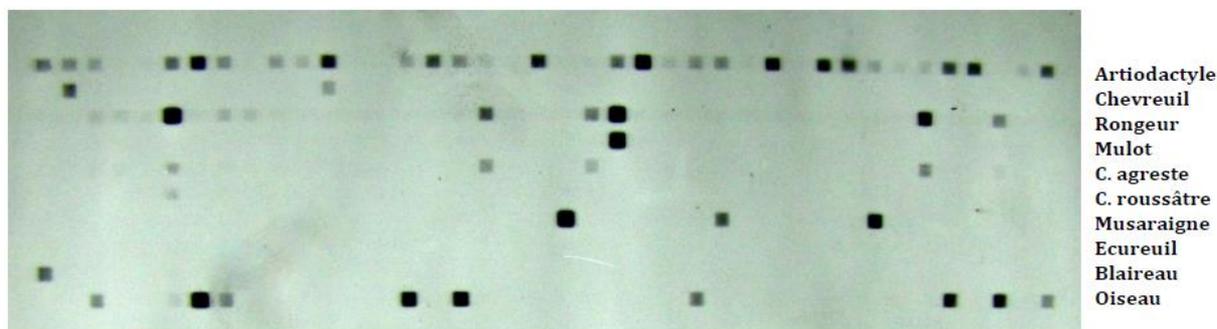


Fig. 29 : Résultat sur film radiographique d'une analyse de repas de sang par RLB
C : *Campagnol*

3. Résultats

Des adultes et des nymphes de l'espèce *Ixodes ricinus* ont été trouvés dans 12 des 16 sites visités (tableau 7, fig. 30). Les 4 sites dans lesquels aucune tique n'a été trouvée étaient dispersés géographiquement (fig. 23). 4 sites n'ont fourni qu'entre 8 (Loch Doon) et 71 tiques, tandis que dans les 8 autres, au moins 173 tiques ont pu être collectées (tableau 7).

Toutes les tiques, excepté celles prélevées à Loch Doon, trop peu nombreuses pour fournir des données significativement interprétables, ont été testées par PCR pour détecter la présence d'ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

3.1. Prévalence de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les populations d'*Ixodes* des sites prélevés

Au total, 2204 tiques ont été analysées individuellement (1903 nymphes et 301 adultes). 73 tiques se sont révélées positives (dont 63 nymphes) à l'issue de la PCR en temps réel, donnant une prévalence générale d'infection des tiques par *Borrelia burgdorferi* sensu lato de 3,31 % (intervalle de confiance [CI] à 95 % : 2,60 – 4,15). Des différences significatives de prévalences locales de l'infection nymphale ont été trouvées entre les sites (fig. 30, tableau 7).

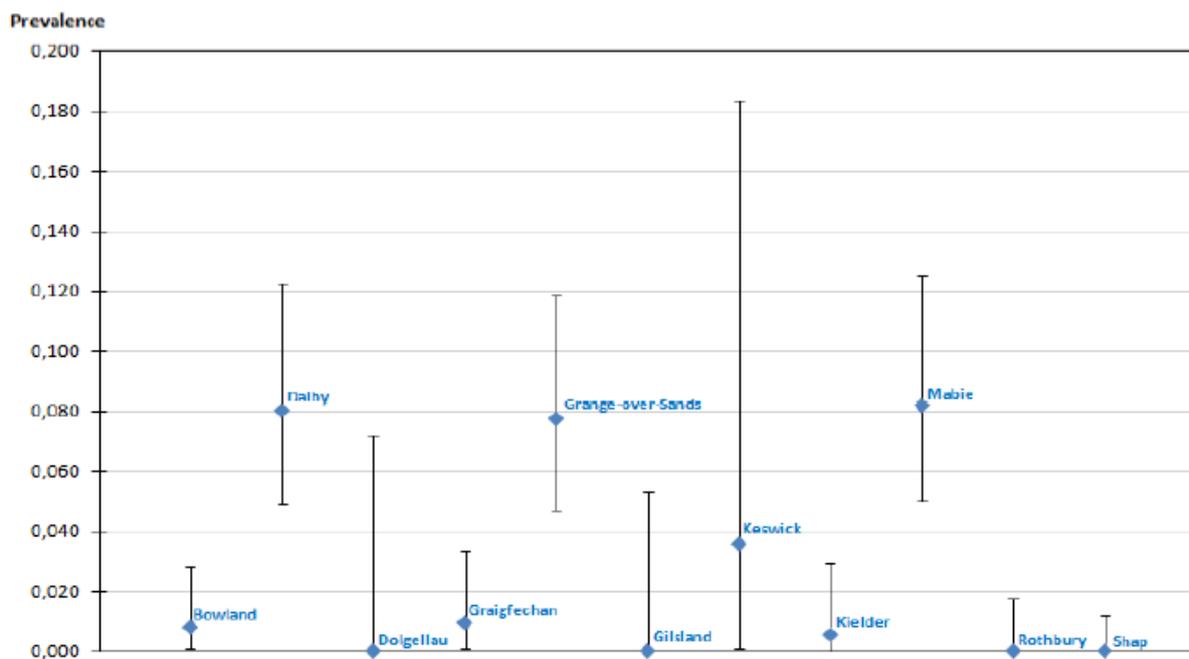


Fig. 30 : Prévalences locales de l'infection des nymphes par *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Site	Habitat	Ixodes ricinus collectées		Ixodes ricinus infectées		Prévalence nymphale (IC exact à 95%)
		Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	
Bowland	Clairière humide intra-forestière	14	253	2	2	0,79 % (0,09 - 2,83)
Dalby	Forêt mixte à dominante décidue	20	237	2	19	8,02 % (4,89 - 12,24)
Dolgellau	Forêt mixte à dominante coniférienne	2	40	0	0	0 % (0 - 8,81)
Gilsland	Coupe-rase humide en lisière de forêt coniférienne	16	55	0	0	0 % (0 - 6,49)
Graigfechan	Lande de fougères	22	212	0	2	0,94 % (0,11 - 3,37)
Grange-over-Sands	Forêt décidue	29	245	6	19	7,75 % (4,73 - 11,85)
Kielder	Coupe-rase humide en lisière de forêt coniférienne	100	185	0	1	0,54 % (0 - 2,97)
Mabie	Forêt mixte à dominante décidue	18	232	0	19	8,19 % (5,0 - 12,49)
Mell Fell (Keswick)	Forêt ouverte collinéenne et ptéridales	2	28	0	1	3,57 % (0,09 - 18,35)
Rothbury	Pâturage en lisière d'une forêt coniférienne	6	167	0	0	0 % (0 - 2,18)
Shap	Lande de bruyères et de fougères	72	249	0	0	0 % (0 - 1,47)

Tableau 7 : Caractéristiques écologiques des sites visités et infection des tiques prélevées par *Borrelia burgdorferi* sensu lato



Fig. 31 : Illustration des 4 types d'habitats étudiés

Aucune tique infectée par *Borrelia burgdorferi* sensu lato n'a été trouvée dans 4 sites : Dolgellau, Gilsland, Rothbury et Shap (fig. 30, tableau 7). La prévalence de l'infection nymphale dans les autres sites varie de 0,54 % (CI 95 % : 0 – 2,97) à 8,19 % (CI 95 % : 5,0 – 12,49). Les résultats de prévalence chez les *Ixodes* adultes, de même que les données pour les sites de Dolgellau, Gilsland et Keswick ne sont pas significatifs du fait de la faible taille des échantillons concernés.

3.2. Typage des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les groupes d'*Ixodes* positifs

L'identification des espèces génomiques présentes dans 72 des 73 tiques contenant de l'ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato a été possible par RLB et séquençage. 71 tiques ont été analysées par RLB (les 2 restantes présentaient une quantité insuffisante d'ADN pour être testées) et l'espèce a pu être identifiée dans 70 d'entre elles (l'ADN issu d'une nymphe n'a réagi qu'avec la sonde correspondant à *Borrelia burgdorferi* sensu lato). Le séquençage a été mené sur 15 tiques (dont 2 adultes) et a fourni des données pour 12 d'entre elles (les données chromatographiques étaient de qualité insuffisante pour les 3 autres). L'identité de l'espèce infectante de *Borrelia* a été déterminée par les 2 méthodes pour 10 nymphes. Des résultats identiques ont été obtenus pour 9 d'entre elles (pour la 10^{ème}, une nymphe prélevée à Dalby, le séquençage indiquait une infection par *Borrelia garinii* tandis que le RLB indiquait une co-infection par *Borrelia garinii* et *Borrelia valaisiana*).

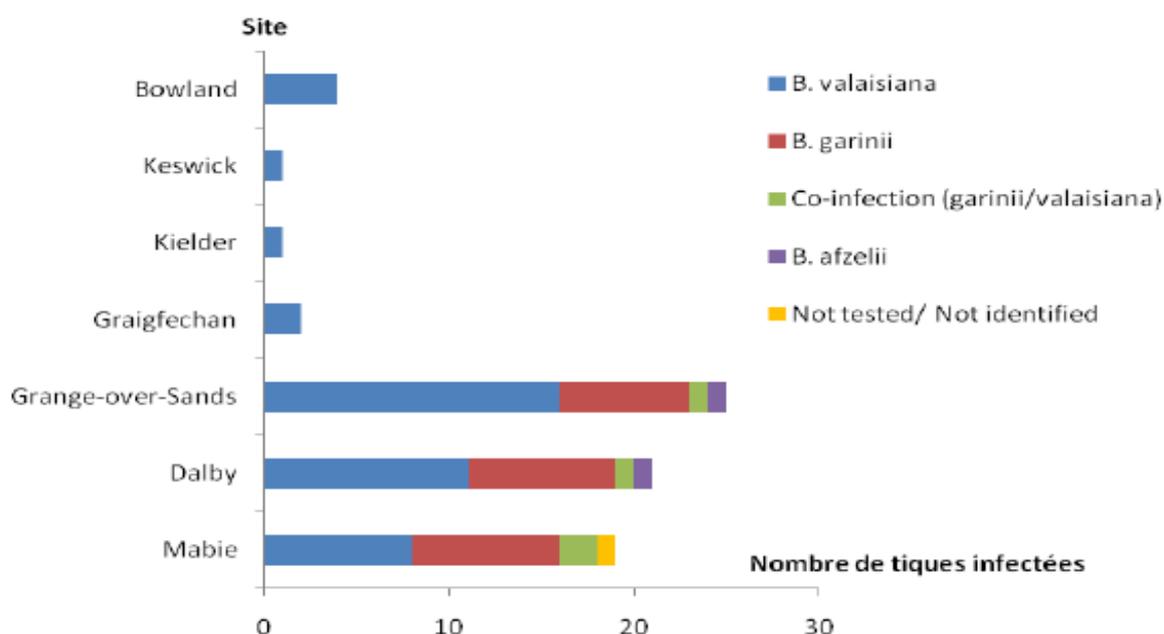


Fig. 32 : Distribution des espèces de *Borrelia burgdorferi* s.l. d'après les résultats du typage par RLB

Au total, 41 tiques (58 %) dont 5 adultes contenaient l'ADN de *Borrelia valaisiana*, 24 tiques (33 %) dont 5 adultes contenaient l'ADN de *Borrelia garinii*, 2 nymphes (3 %) contenaient l'ADN de *Borrelia afzelii*. Les 5 nymphes restantes contenaient à la fois l'ADN de *Borrelia valaisiana* et l'ADN de *Borrelia garinii*.

Borrelia valaisiana était présente dans les 7 sites ayant fourni des tiques infectées par *Borrelia burgdorferi* sensu lato (fig. 32). *Borrelia garinii* (espèce pathogène pour l'homme) et les co-infections ont été trouvées dans les 3 sites de type forêt décidue ou à dominante décidue (Dalby, Grange-over-Sands et Mabie), sites dans lesquels la prévalence de l'infection des tiques par *Borrelia burgdorferi* sensu lato est la plus élevée, autour de 8 % (fig. 30). *Borrelia afzelii*, autre espèce pathogène pour l'homme, a également été trouvée dans 2 de ces sites (Dalby et Grange-over-Sands).

3.3. Distribution des espèces vertébrées sources de repas de sang pour les nymphes *Ixodes* prélevées

Deux sites à haute prévalence (Mabie et Grange-over-Sands) et deux sites à faible prévalence (Kielder et Rothbury) de l'infection des tiques par *Borrelia burgdorferi* sensu lato ont été choisis pour effectuer l'analyse des repas de sang. Une centaine de nymphes par site ont été analysées par Reverse Line Blotting.

Les résultats des RLB ont indiqué que moins de 15% des nymphes analysées se sont nourries sur plus d'un hôte. Par ailleurs, on ne peut pas détecter d'hôte source chez plus de 30% des nymphes analysées. La figure 33 présente les résultats obtenus ne s'intéressant qu'aux nymphes pour lesquelles on ne détecte qu'un seul hôte source du repas de sang. Mais les effectifs de nymphes concernées sont petits, c'est pourquoi ces résultats sont peu significatifs et ne peuvent pas être interprétés ; la méthode mérite d'être optimisée.

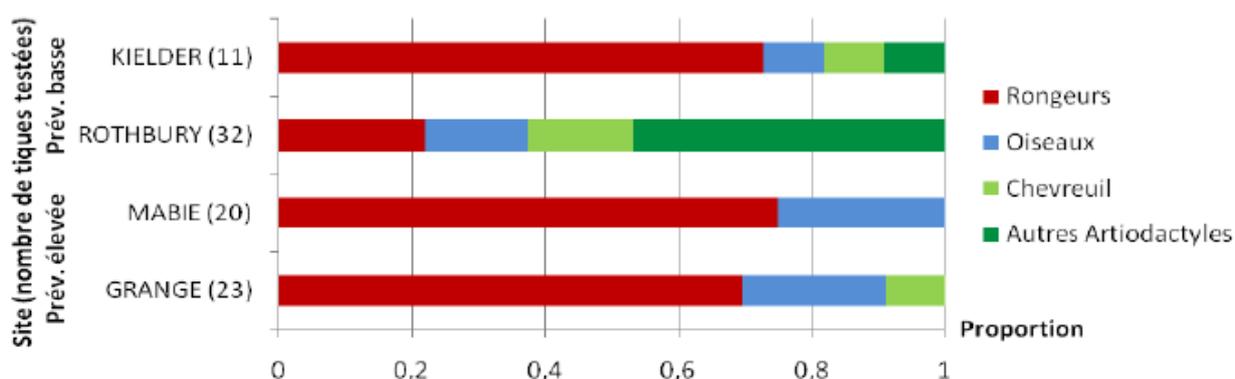


Fig. 33 : Distribution des espèces sources de repas de sang pour les nymphes *Ixodes ricinus* s'étant nourries sur un seul hôte

4. Discussion

Il est admis, concernant la distribution de *Borrelia burgdorferi* en Europe, que la bactérie est présente là où se trouvent les populations d'*Ixodes ricinus* (Dobson *et al.* 2011). En effet, rares sont les études sur *Ixodes ricinus* qui n'ont révélé aucune trace d'infection : dans une revue systématique de 2005 de la prévalence de *Borrelia burgdorferi* dans les populations d'*Ixodes ricinus* en Europe, seule une étude sur 110 dans 24 pays n'a pu mettre en évidence une telle infection (Rauter *et Hartung* 2005). Cette étude était menée dans une forêt décidue côtière du nord de l'Italie et rapporte une quantification de la dynamique saisonnière d'*Ixodes ricinus* et des essais répétés mais infructueux de détection de l'infection/exposition à *Borrelia burgdorferi* chez plus de 250 tiques libres et chez des vertébrés fréquentant le site (Mannelli *et al.* 1999). Aucune autre étude incluse dans cette revue systématique ne rapporte une prévalence inférieure à 1,5 % et seulement 5 rapportent une prévalence inférieure à 3% (Rauter *et Hartung* 2005). Ainsi nos résultats montrant que les infections par *Borrelia burgdorferi* seraient absentes ou présentes à de très faibles prévalences dans plusieurs sites du centre de la Grande-Bretagne sont notables. 5 des sites étudiés semblaient héberger de grandes densités de tiques pour lesquelles l'infection par *Borrelia burgdorferi* était absente ou s'élevait à une prévalence inférieure à 1,5 %. Ces sites étaient distincts géographiquement (fig. 34), localisés au nord du Pays de Galles, dans le Lancashire, la Cumbrie et le Northumberland, et séparés par des sites qui présentaient de fortes densités de tiques pour lesquelles la prévalence de l'infection par *Borrelia burgdorferi* était significativement plus élevée et comparable aux valeurs rapportées pour des sites du sud de l'Angleterre (Vollmer *et al.* 2011). Nos résultats indiquent donc une distribution inégale de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les populations d'*Ixodes ricinus* de Grande-Bretagne centrale qui est incohérente avec l'idée générale laissée par les études antérieures menées dans le reste du Royaume-Uni, dans lesquelles *Borrelia burgdorferi* était toujours détectée (Livesley *et al.* 1994, Kurtenbach *et al.* 1998, Davidson *et al.* 1999, Ling *et al.* 2000). Quelques études britanniques tout à fait récentes viennent, elles aussi, en contraction avec cette idée : une équipe a rapporté une absence d'infection de 82 nymphes par *Borrelia burgdorferi* à Rhossili Down dans le Sud du Pays de Galles, et seulement une nymphe infectée sur 71 au Richmond Park dans le Surrey en Angleterre (Vollmer *et al.* 2011) alors que d'autres avaient relevé des valeurs de prévalence plus élevées dans ce même parc (Dobson *et al.* 2011). Des travaux très récents dans d'autres régions d'Europe ont également montré que la distribution de *Borrelia burgdorferi* dans les populations d'*Ixodes ricinus* serait plus irrégulière que ce qui avait été reconnu précédemment : une étude des populations d'*Ixodes ricinus* de 24 sites aux Pays-Bas n'a mis

en évidence d'infection par *Borrelia burgdorferi* que dans 16 d'entre eux. Les auteurs suggéraient que l'absence de détection de *Borrelia burgdorferi* pouvait être due à des échantillons de tiques testées trop petits, mais ils ne précisaient pas le nombre de tiques analysées par site. L'étude présentait cependant des données indiquant l'absence d'infection par *Borrelia burgdorferi* dans des sites hébergeant jusqu'à 50 nymphes par 100 m² (Gassner *et al.* 2011).

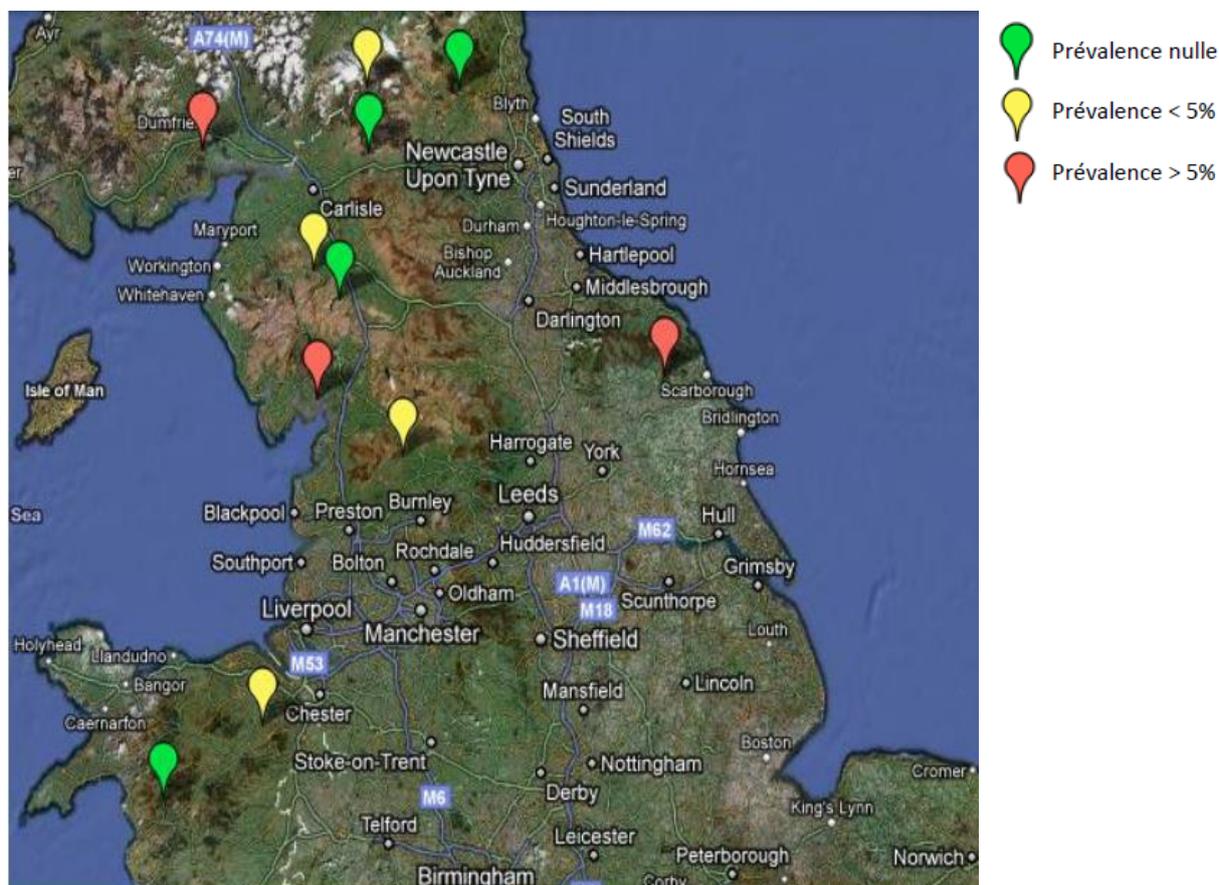


Fig. 34 : Prévalence de l'infection à *Borrelia burgdorferi* s.l. dans les populations de tiques des sites étudiés en Grande-Bretagne

Etant donnée la nature spatialement transversale de notre étude, il n'est pas exclu que l'absence de tiques et/ou de *Borrelia burgdorferi* en certains sites ait été temporaire. De précédentes études, longitudinales dans le temps, ont permis d'observer des fluctuations annuelles de la prévalence de l'infection par *Borrelia burgdorferi* de populations d'*Ixodes ricinus* en des sites spécifiques (Mejlon *et Jaenson* 1993, Wielinga *et al.* 2006), fluctuations souvent suffisamment fortes pour que les valeurs de prévalence d'une année à l'autre soient significativement différentes, y compris lorsque relativement peu de tiques furent prélevées. Bien qu'il n'existe aucun compte-rendu d'absence seulement temporaire d'infection de populations d'*Ixodes ricinus*, une étude longitudinale sur 4 années de populations d'*Ixodes*

pacificus dans l'Ouest des Etats-Unis n'avait pas pu détecter *Borrelia burgdorferi* en certains sites lors de la première année puis l'ont toujours détectée les années suivantes (Eisen et al. 2004). Des prélèvements répétés au cours du temps dans les sites que nous avons étudié permettraient de préciser le caractère permanent ou non des prévalences nulles obtenues, bien que des tentatives sporadiques (non publiées par l'équipe) de détection de *Borrelia burgdorferi* dans la forêt de Kielder entre 2002 et 2010 aient toujours été infructueuses.

Seules des hypothèses peuvent être formulées pour expliquer une telle hétérogénéité. Nos résultats (tableau 7) suggèrent que le type d'habitat influence la prévalence de *Borrelia burgdorferi* dans les populations de tiques en phase de quête. La prévalence de l'infection dans les tiques prélevées dans des forêts décidues ou à dominante décidue est significativement plus élevée que dans d'autres habitats dont la végétation est dominée par les conifères, les prairies ou les landes. L'effet de l'habitat sur la prévalence de *Borrelia burgdorferi* a déjà été étudié en Europe et aux Etats-Unis (Wielinga *et al.* 2006, Halos *et al.* 2010) et serait le reflet de la structure des communautés d'hôtes vertébrés peuplant les différents habitats. Il est intéressant de noter qu'à Shap (Est de la Cumbrie), lande où nous n'avons pas détecté *Borrelia burgdorferi*, la bactérie avait été rencontrée antérieurement. En effet, il a été montré que l'agent pathogène était entretenu à cet endroit par les ovins qui, bien qu'ils ne portent pas d'infection systémique (cf. partie 2), peuvent transmettre localement l'infection d'une tique à l'autre par co-feeding en un même point d'attache sur la peau du mouton (Ogden *et al.* 1997). Or, notre collecte de tiques a eu lieu sur une zone de la lande où les moutons ont été exclus depuis plusieurs années. Malgré la forte densité de tiques qui y a été trouvée, l'absence de *Borrelia burgdorferi* va dans le sens des conclusions de l'équipe d'Ogden en 1997.

Ce travail confirme par ailleurs la présence de l'agent de la maladie de Lyme dans plusieurs populations de tiques jusqu'ici inexplorées, complétant les connaissances actuelles sur la distribution de *Borrelia burgdorferi* au Royaume-Uni. Le risque pour la santé publique posé par *Borrelia burgdorferi* dans ces populations de tiques est à mesurer en relation avec l'importance du contact entre ces dernières et les populations humaines. Les 3 sites à forte prévalence de *Borrelia burgdorferi* dans les tiques libres sont tous proches de villes (Dumfries, Grange-over-Sands et Pickering) et sont fortement fréquentés. En effet, les forêts de Mabie et Dalby sont précisément présentées comme des aires touristiques et de loisirs avec plus de 500 000 visiteurs par an à elles deux (Forestry Commission).

L'observation de *Borrelia afzelii* en 2 sites du nord de l'Angleterre est remarquable et suggère que cette espèce se répand dans tout le pays car elle a été précédemment observée dans le sud de l'Angleterre (Couper *et al.* 2010, Vollmer *et al.* 2011). Elle est cependant en minorité dans la communauté de *Borrelia* qu'elle compose en ces 2 sites, comme cela a déjà été observé (Vollmer *et al.* 2011). L'apparente rareté de *Borrelia afzelii* dans le sud de la Grande-Bretagne est en contraste marqué avec son apparente abondance dans les Highlands écossaises (Ling *et al.* 2000). Les souches de *Borrelia afzelii* d'Ecosse ont montré plus de parenté avec celles de Lettonie qu'avec celles d'Angleterre, suggérant qu'il y aurait peu de mouvements de *Borrelia afzelii* entre le nord et le sud de la Grande-Bretagne (Vollmer *et al.* 2011). Cela pourrait être mis en parallèle avec les relations phylogénétiques de certains rongeurs britanniques qui montrent une nette division nord-sud entre les phylogroupes (Searle *et al.* 2009). La faible dispersion des rongeurs entre le nord et le sud pourrait ainsi être à l'origine de cette différenciation marquée entre les *Borrelia afzelii* écossaises et anglaises.

Par ailleurs, nous n'avons pas du tout rencontré *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, autre espèce rare au Royaume-Uni en dehors des Highlands (Kurtenbach *et al.* 1998, Ling *et al.* 2000, Couper *et al.* 2010, Vollmer *et al.* 2011). Toujours en accord avec les travaux cités ci-avant, nos résultats suggèrent que *Borrelia valaisiana* et *Borrelia garinii* sont les espèces qui contribuent le plus aux communautés de *Borrelia* des sites étudiés. *Borrelia valaisiana* est la plus répandue, présente dans tous les sites recensant des tiques infectées par *Borrelia*. C'est aussi la seule espèce génomique identifiée dans les sites à très faible prévalence. Tout ceci reflète sa dominance dans le centre et le sud de la Grande-Bretagne ainsi que l'efficacité de dispersion des espèces génomiques adaptées aux oiseaux (Vollmer *et al.* 2011) qui ont un potentiel d'invasion accru des communautés de tiques, y compris les plus reculées et préalablement indemnes, grâce aux mouvements de leurs hôtes aviaires (Ogden *et al.* 2009). D'autre part, la seule co-infection trouvée (dans 4 nymphes de sites à haute prévalence) est l'association *Borrelia garinii* / *Borrelia valaisiana*, deux espèces spécifiques des hôtes oiseaux. Une même tique peut être infectée par plusieurs espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, même si cela reste beaucoup plus rare qu'une infection unique. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette double infection de la tique :

- Les deux espèces de *Borrelia* ont pu s'accumuler dans la tique après deux repas de sang pris sur deux hôtes distincts infectés chacun par une espèce différente du spirochète. Mais il se trouve que, dans ce travail, les tiques co-infectées sont des nymphes et théoriquement elles ne se nourrissent que sur un seul hôte. Cette hypothèse est donc peu probable.

- La tique aurait acquis l'une des espèces de *Borrelia* par transmission trans-ovarienne, l'autre par un repas de sang sur un hôte infecté.
- Il est possible également que l'hôte ayant servi au repas de sang de la tique ait été lui-même co-infecté.

Le complément de l'hôte étant actif dans le tube digestif des tiques *Ixodes ricinus*, il est susceptible d'agir de façon sélective sur les spirochètes qui y seraient présents. Cela réduit donc la probabilité d'une co-infection entre espèces de *Borrelia* associées aux oiseaux et espèces associées aux rongeurs au sein d'une même tique. C'est pourquoi la co-infection *Borrelia garinii* / *Borrelia valaisiana* est la plus représentée, les deux espèces étant spécifiques du même type d'hôte (Kurtenbach *et al.* 2002).

L'absence inattendue d'*Ixodes ricinus* dans certains sites visités, malgré une faune et une flore apparemment similaire à celles des sites où les tiques ont été trouvées en abondance, correspond aux données compilées par le programme de surveillance passive des tiques au Royaume-Uni mené par la Health Protection Agency (aujourd'hui Public Health England) depuis 2005. Le caractère inégal de la distribution d'*Ixodes ricinus* à l'échelle locale a déjà été décrit et corrélé au type de végétation et au drainage des sols (Jameson et Medlock 2011). Ce programme fournit une cartographie actualisée des plus complètes de la distribution d'*Ixodes ricinus* au Royaume-Uni à ce jour.

En conclusion, nous avons mis en évidence des patterns d'infection de populations de tiques par *Borrelia* dans le nord de l'Angleterre, le nord du Pays de Galles et le sud de l'Ecosse similaires à ceux décrits dans le sud de l'Angleterre et l'Irlande du Nord mais différents de ceux du nord de l'Ecosse. De plus, nous avons identifié des sites dans lesquels les tiques étaient absentes de façon inattendue, d'autres dans lesquels *Borrelia burgdorferi* sensu lato semblait ne pas être établie malgré une population de tiques dense. Des investigations plus poussées sur la composition des communautés d'hôtes peuplant ces sites permettraient d'expliquer ces différences afin d'explorer un peu plus la complexe écologie de cet agent pathogène et de pouvoir mieux prédire le risque de borréliose de Lyme pour l'homme.

CONCLUSION

La recherche sur l'écologie de *Borrelia burgdorferi* sensu lato est basée sur les principes de l'écologie des populations appliquée à l'étude de la dynamique des populations d'hôtes et de vecteurs et de la distribution de l'agent pathogène et du vecteur. Dans ce contexte, des données de terrain appropriées, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire, et l'apport de modèles statistiques jouent un rôle clé. Cependant, l'intérêt porté aux mécanismes de transmission de *Borrelia* doit aussi inclure les processus moléculaires dont le rôle est central à l'interface entre les hôtes, les tiques et les spirochètes. La co-évolution entre ces 3 acteurs a été favorable à la bactérie qui profite de la physiologie de son hôte pour réduire sa propre machinerie de biosynthèses et échapper à sa destruction par le système immunitaire de l'hôte.

Par ailleurs, la compréhension des processus fondamentaux qui régissent le rôle de la biodiversité dans les différentes fonctions d'un écosystème conditionne les tentatives d'anticipation des conséquences sociétales d'une perte de cette biodiversité et la mise en place de mesures adéquates pour y répondre. Des observations à l'échelle des habitats sont à considérer attentivement pour comprendre l'écologie de la maladie de Lyme, comme celle d'autres maladies zoonotiques. Ainsi la recherche en écologie peut elle participer à fournir le savoir nécessaire à la protection de la santé publique. Car si l'éradication des spirochètes est irréaliste, la réduction de leur menace pour l'homme reste un objectif accessible.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

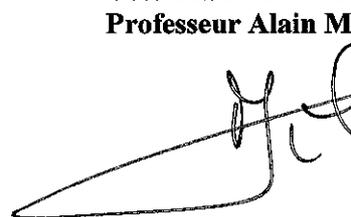
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Michel FRANC**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **RENARD Marine** intitulée « *Ecologie de la borreliose de Lyme : étude dans des populations de tiques du genre ixodes dans le centre de la Grande-Bretagne.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 5 novembre 2013
Professeur Michel FRANC
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

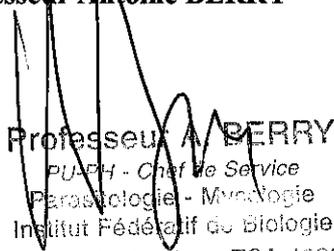


Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



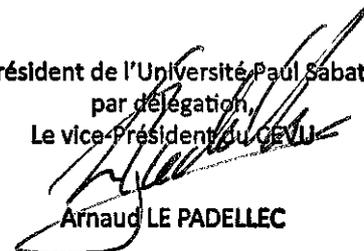
Vu :
Le Président du jury :
Professeur Antoine BERRY

Professeur A. BERRY
PU-PH - Chef de Service
Parasitologie - Myxologie
Institut Fédératif de Biologie
Place du Dr Baylac - TSA 40031
31059 TOULOUSE Cedex 9



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
Le vice-Président du CEVU



Arnaud LE PADELLEC

Mlle Marine RENARD
a été admis(e) sur concours en : 2008
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012
a validé son année d'approfondissement le : 27/06/2013
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Bibliographie

Articles de périodiques

ALEKSEEV AN, DUBININA AV, VAN DE POL I, SCHOULS LM (2001). Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 2237-2242.

ANGUITA J, HEDRICK MN, FIKRIG E (2003). Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**, 493-504.

BALMELLI T, PIFFARETTI JC (1995). Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Research in Microbiology*, **146**, 329-340.

BARANTON G, POSTIC D, GIRONS I, BOERLIN P, PIFFARETTI JC, ASSOUS M, GRIMONT PA (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**, 378-383.

BENNET L, HALLING A, BERGLUND J (2006). Increased incidence of Lyme borreliosis in southern Sweden following mild winters and during warm, humid summers. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **25**, 426-432.

BLANC F, DE SEZE J (2008). Diagnostic et traitement des neuroborrélioses de Lyme. *La Lettre du Neurologue*, **12**, 315-321.

BOUCHARD C, BEAUCHAMP G, LEIGHTON PA, LINDSAY R, BELANGER D, OGDEN NH (2013). Does high biodiversity reduce the risk of Lyme disease invasion ? *Parasites and Vectors*, **6**, 195.

BOWMAN D, LITTLE SE, LORENTZEN L, SHIELDS J, SULLIVAN MP, CARLIN EP (2008). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. *Veterinary Parasitology*, **160**, 138-148.

BRUNNER JL, OSTFELD RS (2008). Multiple causes of variable tick burdens on small mammal hosts. *Ecology*, **89**, 2259-2272.

BURGDORFER W, BARBOUR AG, HAYES SF, BENACH JL, GRUNWALDT E, DAVIS JP (1982). Lyme disease-a tick-borne spirochetosis ? *Science*, **216**, 1317-1319

BURGESS EC, GILLETTE D, PICKET JP (1986). Arthritis and panuveitis as a manifestation of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **189**, 1340-1342.

BURGESS EC, MATTISON M (1987). Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **191**, 1457-1458.

- CANICA MM, NATO F, DU MERLE L, MAZIE JC, BARANTON G, POSTIC D (1993). Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. Nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **25**, 441-448.
- CASJENS SR, FRASER-LIGGETT CM, MONGODIN EF, QIU WG, DUNN JJ, LUFT BJ, SCHUTZER SE (2011). Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *Journal of Bacteriology*, **193**, 1489-1490.
- CHARON NW, COCKBURN A, LI C, LIU J, MILLER KA, MILLER MR, MOTALEB MA, WOLGEMUTH CW (2012). The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of Microbiology*, **66**, 349-370.
- CHU C, LIU W, JIANG B, WANG D, JIANG W, ZHAO Q (2008). Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**, 3130-3133.
- COLLARES-PENA M, COUCEIRO S, FRANCA I, KURTENBACH K, SCHAFER SM, VITORINO L, GONCALVES L, BAPTISTA S, VIEIRA ML, CUNHA C (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 1316-1318.
- COUPER D, MARGOS G, KURTENBACH K, TURTON S (2010). Prevalence of *Borrelia* infection in ticks from wildlife in south-west England. *Veterinary Record*, **167**, 1012-1014.
- COURTNEY JW, KOSTELNIK LM, ZEIDNER NS, MASSUNG RF (2004). Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 3164-3168.
- DANIELOVA V, RUDENKO N, DANIEL M, HOLUBOVA J, MATERNA J, GOLOVCHENKO M, SCHWARZOVA L (2006). Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *International Journal of Medical Microbiology*, **296**, 48-53.
- DAVIDSON MM, EVANS R, LING CL, WISEMAN AD (1999). Isolation of *Borrelia burgdorferi* from ticks in the Highlands of Scotland. *Journal of Medical Microbiology*, **48**, 59-65.
- DENNIS DT (2005). Rash decisions: Lyme disease, or not ? *Clinical Infectious Diseases*, **41**, 966-968.
- DIVERS TJ, CHANG YF, JACOBSON RH, McDONOUGH SP (2001). Lyme Disease in Horses. *Compendium Equine*, **23**, 375-378.
- DOBSON ADM, TAYLOR JL, RANDOLPH SE (2011). Tick (*Ixodes ricinus*) abundance and seasonality at recreational sites in the UK: hazards in relation to fine-scale habitat types revealed by complementary sampling methods. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **2**, 67-74.
- DUNEAU D, BOULINIER T, GOMEZ-DIAZ E, PETERSEN A, TVERAA T, BARRETT RT, McCOY KD (2008). Prevalence and diversity of Lyme borreliosis bacteria in marine birds. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**, 352-359

- DUNHAM-EMS SM, CAIMANO MJ, PAL U, WOLGEMUTH CW, EGGERS CH, BALIC A, RADOLF JD (2009). Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *The Journal of Clinical Investigation*, **119**, 3652-3665.
- EISEN L, EISEN RJ, CHANG CC, MUN J (2004). Acarologic risk of exposure to *Borrelia burgdorferi* spirochaetes: long-term evaluations in north-western California, with implications for Lyme borreliosis risk-assessment models. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 38-49.
- ESTRADA-PENA A (2002). Understanding the relationships between landscape connectivity and abundance of *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, **28**, 239-248.
- FIKRIG E, NARASIMHAN S (2006). *Borrelia burgdorferi* – travelling incognito ? *Microbes and Infection*, **8**, 1390-1399.
- FRANKE J, HILDEBRANDT A, DORN W (2013). Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes - Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **4**, 11-25.
- FUKUNAGA M, HAMASE A, OKADA K, NAKAO M (1996). *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiology and Immunology*, **40**, 877-881.
- HAHN CN, MAYHEW IG, WHITWELL KE, SMITH KC, CAREY D, CARTER SD, READ RA (1996). A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. *Equine Veterinary Journal*, **28**, 84-88.
- GASSNER F, VAN VLIET AJ, BURGERS SL, JACOBS F (2011). Geographic and temporal variations in population dynamics of *Ixodes ricinus* and associated *Borrelia* infections in The Netherlands. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **11**, 523-532.
- GATEWOOD AG, LIEBMAN KA, VOUREC'H G, BUNIKIS J, HAMER SA, CORTINAS R, MELTON F, CISLO P, KITRON U, TSAO J, BARBOUR AG, FISH D, DIUK-WASSER MA (2009). Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2476-2483.
- GRAY JS (1984). Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L., in Co Wicklow, Ireland. *Acarologia*, **25**, 167-178.
- GRAY JS, DAUTEL H, ESTRADA-PENA A, KAHL O, LINDGREN E (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 593232.
- GUY EC, STANEK G (1991). Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*, **44**, 610-611.
- GYLFE A, BERGSTRÖM S, LUNDSTRÖM J, OLSEN B (2000). Reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature*, **403**, 724-725.
- HALOS L (2005). La borréliose de Lyme chez le chien et le chat. *Le Point Vétérinaire*, **253**, 48-53.

- HALOS L, BORD S, COTTE V, GASQUI P (2010). Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 4413-4420.
- HANINCOVA K, KURTENBACH K, DIUK-WASSER M, BREI B, FISH D (2006). Epidemic spread of Lyme borreliosis, northeastern United-States. *Emerging Infectious Diseases*, **12**, 604-611.
- HERRMANN C, GERN L (2010). Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *Journal of Medical Entomology*, **47**, 1196-1204.
- HILDENBRAND P, CRAVEN DE, JONES R, NEMESKAL P (2009). Lyme Neuroborreliosis: Manifestations of a Rapidly Emerging Zoonosis. *American Journal of Neuroradiology*, **30**, 1079-1087.
- HUGHES VL, RANDOLPH SE (2001). Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites. *Journal of Parasitology*, **87**, 49-54.
- HUMAIR PF, PETER O, WALLICH R, GERN L (1995). Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *Journal of Medical Entomology*, **32**, 433-438.
- HUMAIR PF, DOUET V, MORAN CADENAS F, SCHOULS LM, VAN DE POL I, GERN L (2007). Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *Journal of Medical Entomology*, **44**, 869-880.
- IMAI DM, BARR BC, DAFT B, BERTONE JJ, FENG S, HODZIC E, JOHNSTON JM, OLSEN KJ, BARTHOLD SW (2011). Lyme neuroborreliosis in 2 horses. *Veterinary Pathology*, **48**, 1151-1157.
- JAENSON TGT, LINDGREN E (2011). The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **2**, 44-49.
- JAENSON TGT, JAENSON DGE, EISEN L, PETERSSON E, LINDGREN E (2012). Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasites and Vectors*, **5**, 8.
- JAMESON LJ, MEDLOCK JM (2011). Tick surveillance in Great-Britain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, **11**, 403-412.
- JORE S, VILJUGREIN H, HOFSHAGEN M, BRUN-HANSEN H, KRISTOFFERSEN AB, NYGARD K, BRUN E, OTTESEN P, SAEVIK BK, YTREHUS B (2011). Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. *Parasites and Vectors*, **4**, 84.
- KAWABATA H, MASUZAWA T, YANAGIHARA Y (1993). Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiology and Immunology*, **37**, 843-848.

- KIRBY AD, SMITH AA, BENTON TG, HUDSON PJ (2004). Rising burden of immature sheep ticks (*Ixodes ricinus*) on red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*) chicks in the Scottish uplands. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 67-70.
- KIRSTEIN F, RIJKEMA S, MOLKENBOER M, GRAY JS (1997). The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *European Journal of Epidemiology*, **13**, 67-72.
- KJELLAND V, STUEN S, SKARPAAS T, SLETTAN A (2010). *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in Southern Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **52**, 59.
- KONG F, GILBERT GL (2006). Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)-a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nature Protocols*, **1**, 2668-2680.
- KRUPKA I, STRAUBINGER RK (2010). Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, **40**, 1103-1119.
- KURTENBACH K, PEACEY M, RIJKEMA SG, HOODLESS AN (1998). Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1169-1174.
- KURTENBACH K, DE MICHELIS S, ETTI S, SCHÄFER SM, SEWELL HS, BRADE V, KRAICZY P (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement. *Trends in Microbiology*, **10**, 74-79.
- KURTENBACH K, HANINCOVA K, TSAO JI, MARGOS G, FISH D, OGDEN NH (2006). Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 660-669.
- LE FLECHE A, POSTIC D, GIRARDET L, BARANTON G (1997). Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**, 921-925.
- LETRILLIART L, RAGON B, HANSLIK T, FLAHAULT A (2005). Lyme disease in France: a primary care-based prospective study. *Epidemiology and Infection*, **133**, 945-952.
- LEVY SA (2002). Use of a C6 ELISA test to evaluate the efficacy of a whole-cell bacterin for the prevention of naturally transmitted canine *Borrelia burgdorferi* infection. *Veterinary Therapeutics*, **3**, 420-424.
- LIANG FT, NOWLING JM, PHILIPP MT (2000). Cryptic and exposed invariable regions of *VlsE*, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi* s.l. *Journal of Bacteriology*, **182**, 3597-3601.
- LING CL, JOSS AWL, DAVIDSON MM, HO-YEN DO (2000). Identification of different *Borrelia burgdorferi* genomic groups from Scottish ticks. *Molecular Pathology*, **53**, 94-98.
- LITTMAN MP (2003). Canine borreliosis. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, **33**, 827-862.

- LIVESLEY MA, CAREY D, GERN L, NUTTALL PA (1994). Problems of isolating *Borrelia burgdorferi* from ticks collected in United Kingdom foci of Lyme disease. *Medical and Veterinary Entomology*, **8**, 172-178.
- LOGIUDICE K, OSTFELD RS, SCHMIDT KA, KEESING F (2003). The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 567-571.
- MACLEOD J (1932). The bionomics of *Ixodes ricinus* L., the “sheep tick” of Scotland. *Parasitology*, **24**, 382-400.
- MANNELLI A, CERRI D, BUFFRINI L, ROSSI S (1999). Low risk of Lyme borreliosis in a protected area on the Tyrrhenian coast, in central Italy. *European Journal of Epidemiology*, **15**, 371-377.
- MANNELLI A, BERTOLOTTI L, GERN L, GRAY J (2012). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe : transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**, 837-861.
- MARASPIN V, RUZIC-SABLJIC E, STRLE F (2006). Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. *Emerging Infectious Diseases*, **12**, 1177
- MARCONI R, LIVERIS D, SCHWARTZ I (1995). Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes : phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 2427-2434.
- MARGOS G, VOLLMER DA, CORNET M, GARNIER M, FINGERLE V, WILSKA B, BORMANE A, VITORINO L, COLLARES-PEREIRA M, DRANCOURT M, KURTENBACH K (2009). A new *Borrelia* species defined by Multilocus Sequence Analysis of Housekeeping Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 5410-5416.
- MARGOS G, HOJGAARD A, LANE RS, CORNET M, FINGERLE V, RUDENKO N, OGDEN N, AANENSEN DM, FISH D, PIESMAN J (2010). Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissetii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **1**, 151-158.
- MARGOS G, VOLLMER SA, OGDEN NH, FISH D (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 1545-1563.
- MASUZAWA T, TAKADA N, KEDEKEN M, FUKUI T, YANO Y, ISHIGURO F (2001). *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 1817-1824.
- MATERNA J, DANIEL M, DANIELOVA V (2005). Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Central Europe Journal of Public Health*, **13**, 24-28.

- MEDLOCK JM, HANSFORD KM, BORMANE A, DERDAKOVA M, ESTRADA-PENA A, GEORGE JC, GOLOVLJOVA I, JAENSON TG, JENSEN JK, JENSEN PM, KAZIMIROVA M, OTEO JA, PAPA A, PFISTER K, PLANTARD O, RANDOLPH SE, RIZZOLI A, SANTOS-SILVA MM, SPRONG H, VIAL L, HENDRICKX G, ZELLER H, VAN BORTEL W (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* in Europe. *Parasites and Vectors*, **6**, 1
- MEJLON HA, JAENSON TG (1993). Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **25**, 449-456.
- MÜLLEGGER RR (2004). Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. *European Journal of Dermatology*, **14**, 296-309.
- NADELMAN RB, NOWAKOWSKI J, FISH D, FALCO RC, FREEMAN K, McKENNA D, WELCH P, MARCUS R, AGUERO-ROSENFELD ME, DENNIS DT, WORMSER GP (2001). *The New England Journal of Medicine*, **345**, 79-84.
- NARDELLI DT, CALLISTER SM, SCHELL RF (2008). Lyme arthritis: current concepts and a change in paradigm. *Clinical and Vaccine Immunology*, **15**, 21-34.
- NAZZI F, MARTINELLI E, DEL FABBRO S, BERNARDINELLI I (2010). Ticks and Lyme borreliosis in an alpine area in northeast Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 220-226.
- NIGROVIC LE, THOMPSON KM (2006). The Lyme vaccine: a cautionary tale. *Epidemiology and Infection*, **135**, 1-8.
- OGDEN NH, NUTTALL PA, RANDOLPH SE (1997). Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitology*, **115**, 591-599.
- OGDEN NH, LINDSAY LR, MORSHED M, SOCKETT PN, ARTSOB H (2009). The emergence of Lyme disease in Canada. *Canadian Medical Association Journal*, **180**, 1221-1224.
- OSTFELD RS, SCHAUBER EM, CANHAM CD, KEESING F, JONES CG, WOLFF JO (2001). Effects of acorn production and mouse abundance on abundance and *Borrelia burgdorferi* infection prevalence of nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, **1**, 55-63.
- OSTFELD RS, CANHAM CD, OGGENFUSS K, WINCHCOMBE RJ, KEESING F (2006). Climate, deer, rodents and acorns as determinants of variation in Lyme disease risk. *PLOS Biology*, **4**, e145.
- PAL U, FIKRIG E (2003). Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. *Microbes and Infection*, **5**, 659-666.
- PAL U, YANG X, CHEN M, BOCKENSTEDT LK, ANDERSON JF, FLAVELL RA, NORGARD MV, FIKRIG E (2004). OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *The Journal of Clinical Investigation*, **113**, 220-230.

- PALMEN C (2010). Borrelia-associated lymphocytoma cutis. *Archives de Pédiatrie*, **17**, 1159-1161.
- PAPPAS CJ, IYER R, PETZKE MM, CAIMANO MJ, RADOLF JD, SCHWARTZ I (2011). *Borrelia burgdorferi* requires glycerol for maximum fitness during the tick phase of the enzootic cycle. *PLOS Pathogens*, **7**(7), e1002102.
- PASTER BJ, DEWHIRST FE (2000). Phylogenetic foundation of spirochetes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **2**, 341-344.
- PIETZSCH ME, MEDLOCK JM, JONES L, AVENELL D (2005). Distribution of *Ixodes ricinus* in the British Isles: investigation of historical records. *Medical and Veterinary Entomology*, **19**, 306-314.
- PORTIER K, FORTIER G, RIFFAULT C, PERRIN R (2002). Suspicion de maladie de Lyme chez un poney. *Pratique Vétérinaire Equine*, **34**, 59-65.
- POSTIC D, RAS NM, LANE RS, HENDSON M, BARANTON G (1998). Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 3497-3504.
- POSTIC D, GARNIER M, BARANTON G (2007). Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *International Journal of Medical Microbiology*, **297**, 263-271.
- POUPON M, LOMMANO E, HUMAIR P, DOUET V (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 976-979.
- PRIEST HL, IRBY NL, SCHLAFER DH, DIVERS TJ, WAGNER B, GLASER AL, CHANG YF, SMITH MC (2012). Diagnosis of Borrelia-associated uveitis in two horses. *Veterinary Ophthalmology*, **15**, 398-405.
- QIU WG, BOSLER EM, CAMPBELL JR, UGINE GD, WANG IN, LUFT BJ, DYKHUIZEN DE (1997). A population genetic study of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto from eastern Long Island, New York, suggested frequency-dependent selection, gene flow and host adaptation. *Hereditas*, **127**, 203-216.
- RADOLF JD, CAIMANO MJ, STEVENSON B, HU LT (2012). Of ticks, mice and men : understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 87-99.
- RAMAMOORTHY N, NARASIMHAN S, PAL U, BAO F, YANG XF, FISH D, ANGUITA J, NORGARD MV, KANTOR FS, ANDERSON JF, KOSKI RA, FIKRIG E (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, **436**, 573-577.
- RANDOLPH SE (2001). The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **356**, 1045-1056.
- RANDOLPH SE (2009). Tick-borne disease systems emerge from the shadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology*, **136**, 1403-1413.

- RANDOLPH SE (2010). To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology*, **167**, 92-94.
- RANDOLPH SE, DOBSON AD (2012). Pangloss revisited: a critique of the dilution effect and the biodiversity-buffers-disease paradigm. *Parasitology*, **139**, 847-863.
- RAUTER C, HARTUNG T (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7203-7216.
- REYE AL, HUBSCHEN JM, SAUSY A, MULLER CP (2010). Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 2923-2931.
- RICHTER D, POSTIC D, SERTOUR N, LIVEY I, MATUSCHKA F, BARANTON G (2006). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 873-881.
- RIJKEMA SG, MOLKENBOER MJ, SCHOOLS LM, JONGEJAN F (1995). Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 3091-3095.
- RIZZOLI A, MERLER S, FURLANELLO C, GENCHI C (2002). Geographical information systems and bootstrap aggregation (bagging) of tree-based classifiers for Lyme disease risk prediction in Trentino, Italian Alps. *Journal of Medical Entomology*, **39**, 485-492.
- ROSEF O, PAULAUSKAS A, RADZIJEVSKAZA J (2009). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **51**, 47.
- RUDENKO N, GOLOVCHENKO M, LIN T, GAO L, GRUBHOFFER L, OLIVER JH Jr (2009a). Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia Americana* sp. Nov. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 3875-3880.
- RUDENKO N, GOLOVCHENKO M, GRUBHOFFER L, OLIVER JH Jr (2009b). *Borrelia carolinensis* sp. nov. – a new (14th) member of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 134-141.
- RUDENKO N, GOLOVCHENKO M, GRUBHOFFER L, OLIVER JH Jr (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, **2**, 123-128.
- SAVEY M, DUFOUR B (2004). Diversité des zoonoses. Définitions et conséquences pour la surveillance et la lutte. *Epidémiologie et Santé Animale*, **46**, 1-16.
- SCHARLEMANN JP, JOHNSON PJ, SMITH AA, MACDONALD DW, RANDOLPH SE (2008). Trends in ixodid tick abundance and distribution in Great Britain. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 238-247.

SCHECKELHOFF MR, TELFORD SR, WESLEY M, HU LT (2007). *Borrelia burgdorferi* intercepts host hormonal signals to regulate expression of outer surface protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 7247-7252.

SCHWAN TG, PIESMAN J (2000). Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 382-388.

SEARLE JB, KOTLIK P, RAMBAU RV, MARKOVA S, HERMAN JS, McDEVITT AD (2009). The Celtic fringe of Britain : insights from small mammal phylogeography. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, **276**, 4287-4294.

SMITH FD, BALLANTYNE R, MORGAN ER, WALL R (2011). Estimating Lyme disease risk using pet dogs as sentinels. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **35**, 163-167.

STANEK G (2012). Lyme borreliosis. *The Lancet*, **379**, 461-473.

STEEN NA, BARKER SC, ALEWOOD PF (2006). Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon*, **47**, 1-20.

STEERE AC, MALAWISTA SE, SNYDMAN DR, SHOPE RE, ANDIMAN WA, ROSS MR, STEELE FM (1977). Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis and Rheumatism*, **20**, 7-17.

STEERE AC, BRODERICK TF, MALAWISTA SE, (1978). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *American Journal of Epidemiology*, **108**, 312-321.

STEERE AC, GRODZICKI RL, KORNBLATT AN, CRAFT JE, BARBOUR AG, BURGDORFER W, SCHMID GP, JOHNSON E, MALAWISTA SE (1983). The spirochetal etiology of Lyme disease. *New England Journal of Medicine*, **308**, 733-740.

STEERE AC, ANGELIS SM (2006). Therapy for Lyme arthritis: strategies for the treatment of antibiotic-refractory arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **54**, 3079-3086.

SUNG SY, McDOWELL JV, MARCONI RT (2001). Evidence for the contribution of point mutations to *vlsE* variation and for apparent constraints on the net accumulation of sequence changes in *vlsE* during infection with Lyme disease spirochetes. *Journal of Bacteriology*, **183**, 5855-5861.

TELFORD SR, MATHER TN, MOORE SI, WILSON ML, SPIELMAN A (1988). Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **39**, 105-109.

TSAO JI (2009). Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Veterinary Research*, **40**, 36

VOLLMER SA, BORMANE A, DINNIS RE, SEELIG F (2011). Host migration impacts on the phylogeography of Lyme borreliosis spirochaete species in Europe. *Environmental Microbiology*, **13**, 184-192.

WANG G, VAN DAM A, LE FLECHE A, POSTIC D, PETER O, BARANTON G (1997). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**, 926-932.

WIELINGA PR, GAASENBEEK C, FONVILLE M, DE BOER A (2006). Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7594-7601

ZHANG J, NORRIS S (1998). Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infection and Immunology*, **66**, 3698-3704.

ZHIOUA E, RODHAIN F, BINET P, PEREZ-EID C (1997). Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers of Ile de France, France. *European Journal of Epidemiology*, **13**, 959-962

Monographies et chapitres de monographies

DIVERS TJ (2007). Lyme disease. In *Equine Infectious Diseases*. St Louis : Saunders Elsevier, p 310-312. ISBN 978-1-416-02406-4

GRAY JS, KAHL O, LANE RS, STANEK G (2002). *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. Wallingford : CABI Publishing. 347 p. ISBN 0-85199-632-9.

LINDGREN E, JAENSON TGT (2006). *Lyme borreliosis in Europe : influences of climate ans climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures*. Copenhagen: World Health Organisation Regional Office for Europe. 34 p. ISBN 92-890-2291-4

PEREZ-EID C (2007). *Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Paris : Editions Tec & Doc. 314 p. ISBN 978-2-7430-0974-8

SONENSHINE DE (1991). *Biology of ticks*. Volume 1. New York : Oxford University Press. 472 p. ISBN 0-19-505910-7.

Ressources électroniques

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *2011 map - Lyme Disease* [en ligne].
Disponible sur : <http://www.cdc.gov/lyme/stats/maps/map2011.html> (consulté le 07/02/2013).

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Reported cases of Lyme disease by state or locality* [en ligne].
Disponible sur : http://www.cdc.gov/lyme/stats/chartstables/reportedcases_statelocality.html (consulté le 07/02/2013).

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Confirmed Lyme disease cases by month of disease onset-United States, 2001-2010* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cdc.gov/lyme/stats/chartstables/casesbymonth.html> (consulté le 07/02/2013).

LAPOUGE V (2006). *Dermatologie parasitaire du chien – Ixodes ricinus* [en ligne]. Disponible sur : http://www3.vetagro-sup.fr/etu/dermato/morphologie/ixodes_mo.htm (consulté le 05/07/2013).

PUBLIC HEALTH ENGLAND. *Epidemiology of Lyme Borreliosis in the UK* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/LymeDisease/EpidemiologicalData/lymLymeepidemiology> (consulté le 07/02/2013)

RESEAU SENTINELLES (2011). *Une collaboration entre médecins généralistes et chercheurs en France métropolitaine, bilan annuel 2011* [en ligne]. Disponible sur : <http://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?rub=39> (consulté le 20/02/2013).

Thèse

GUETARD M (2001). *Ixodes ricinus : morphologie, biologie, élevage, données bibliographiques*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 189 p.

ANNEXE 1

Détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato par PCR quantitative Protocole suivi

1. Préparation des échantillons à analyser (extraits de tiques *Ixodes ricinus*)

Laisser décongeler les extraits et témoins.
Centrifuger 30 secondes à 8000 tours/min.

2. Préparation du « mix »

Pour chaque puits d'une plaque 96 puits, prévoir :

- 12,5 µl de Master Mix (Taq Polymérase, nucléotides) de concentration 2x
- 0,5 µl d'amorce sens Bb23Sr diluée à 22,5%, de séquence 5'-CGA GTC TTA AAA GGG CGA TTT AGT-3'
- 0,5 µl d'amorce anti-sens Bb23Sf diluée à 22,5%, de séquence 5'-GCT TCA GCC TGG CCA TAA ATA-3'
- 1 µl de sonde Bb23Sp-FAM diluée à 3,3%, de séquence 5'-AGA TGT GGT AGA CCC GAA GCC GAG TG-3'
- 8,5 µl d'eau

Préparer 100 fois la quantité nécessaire pour 1 puits de façon à avoir suffisamment de « mix » pour chacun des 96 puits.

Pipeter ensuite 23 µl de ce mix dans chaque puits de la plaque.

Fermer les puits de la plaque avec des capuchons adaptés.

3. Ajout des échantillons

Chaque puits reçoit **2 µl** de l'extrait d'une tique *Ixodes ricinus* (dans lequel se trouve l'ADN à amplifier). Remplir la plaque par colonne, et de la gauche vers la droite. Placer un témoin négatif tous les 4 échantillons à analyser. Le témoin positif est placé en dernier, dans le puits H12. Chaque colonne achevée est recouverte de ses capuchons afin de limiter le risque de contamination.

4. Incubation

La plaque remplie est placée dans la machine à PCR quantitative (Opticon...). Le programme est lancé pour 40 cycles.

5. Lecture des résultats

Les échantillons positifs pour *Borrelia burgdorferi sensu lato* peuvent être visualisés par une courbe de fluorescence d'évolution sigmoïde au cours des cycles d'amplification. Les échantillons négatifs présentent une courbe de pente descendante ou de fluorescence nettement inférieure à celle du contrôle positif.

ANNEXE 2

Reverse Line Blotting (RLB) pour le typage des génoespèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et l'analyse des repas de sang

Protocole suivi

Jour 1

1. Préparer une solution de SSPE 20 x (stock) : NaH_2PO_4 anhydre (24 g/L) + NaCl (175,3 g/L) + EDTA (7,4 g/L)
Le pH doit être de 7,4. Si ce n'est pas le cas, ajouter du NaOH ou du HCl pour ajuster le pH. Passer à l'autoclave.
La solution peut être conservée à température ambiante jusqu'à 1 an.

2. Préparer une solution de NaHCO_3 à 0,5M (8,4g dans 200 ml), de pH 8,4 (exactement).

3. Diluer les sondes dans la solution de NaHCO_3 à 0,5M de pH 8,4 : 1 μl de sonde dans 149 μl de NaHCO_3 . Les sondes sont envoyées anhydres, on les reconstitue donc en utilisant le volume d'eau indiqué sur leur tube. Une membrane peut utiliser jusqu'à 40 sondes. Les sondes utilisées sont les suivantes :

Pour le typage des génoespèces de *B. burgdorferi* sensu lato

Borrelia burgdorferi sensu lato (SL) : 5'-CTT TGA CCA TAT TTT TAT CTT CCA-3'

Borrelia burgdorferi sensu stricto (SS) : 5'-AAC ACC AAT ATT TAA AAA ACA TAA-3'

Borrelia garinii (GA) : 5'-AAC ATG AAC ATC TAA AAA CAT AAA-3'

Borrelia garinii new (GANE) : 5'-CAA AAA CAT AAA TAT CTA AAA ACA TAA-3'

Borrelia afzelii (AF) : 5'-AAC ATT TAA AAA ATA AAT TCA AGG-3'

Borrelia valaisiana (VSNE) : 5'-TAT ATC -TT TGT TCA ATC CAT GT-3'

Borrelia lusitaniae (LUS) : 5'-TCA AGA TTT GAA GTA TAA AAT AAA A-3'

Pour l'analyse des repas de sang

Artiodactyles (*Artiodactyla*) : 5'-TAT TCG CCA GAG TAC TAC-3'

Chevreuil (*Capreolus*) : 5'-CCT AAA CAC AAG TAA TTA ATA TAA CAA-3'

Rongeurs (*Rodentia*) : 5'-CGC GGT ACT TTA TAT CGA T-3'

Mulot (*Apodemus*) : 5'-TAA ACT TAA ATA ATT TAA TAA CAA AAC TAT-3'

Campagnol agreste (*Microtus*) : 5'-CTT AGC CCT AAA CTT TAA TAA TT-3'

Campagnol roussâtre (*Clethrionomys*) : 5'-AAA CTT CAA CAT TTA TAA AAC AAA AG-3'

Musaraigne (*Sorex*) : 5'-AAT ACC CGC CAG AGA AC-3'

Ecureuil (*Sciurus*) : 5'-AAC ATA GAC ACT CAA TTA ACA AG-3'

Blaireau (*Meles*) : 5'-GAT AAC TCA CAG AAC AAA ACT-3'

Oiseaux (Aves) : 5'-TAC GAG CAC AAA CGC TTA A-3'

Jour 2

4. Préparer les solutions tampons suivantes :

500 ml SSPE 2x/SDS 0,1%, 50°C (5ml de SDS 10% + 50 ml de SSPE 20x + 445 ml d'eau distillée)

500 ml SSPE 2x/SDS 0,5%, 55°C (25 ml de SDS 10% + 50 ml de SSPE 20x + 425 ml d'eau distillée)

500 ml SSPE 2x/SDS 0,5%, 50°C (25 ml de SDS 10% + 50 ml de SSPE 20x + 425 ml d'eau distillée)

500 ml SSPE 2x, à température ambiante

5. Préparer une solution d'EDTA de 20mM (la solution de 100 mM est à 7,45 g/L) à pH 8

6. Amplifier par PCR (20 μl d'ADN dans un mélange réactionnel de 50 μl) :

- la région intergénique 5S-23S de de *Borrelia burgdorferi* sensu lato pour le typage

Amorce sens (Bb23S) : 5'-ACC ATA GAC TCT TAT TAC TTT GAC CA-3'

Amorce anti-sens (Bb5S) : 5'-GAG AGT AGG TTA TTG CCA GGG-3'

- l'ADNr mitochondrial 12S des vertébrés pour l'analyse de repas de sang

Amorce sens (12S-6F) : 5'-CAA ACT GGG ATT AGA TAC C-3'

Amorce anti-sens (B12S-9R) : 5'-AGA ACA GGC TCC TCT AG-3'

Dans chaque puits : 25 μl de Master Mix 2x + 1 μl d'amorce sens + 1 μl d'amorce anti-sens + 3 μl d'eau distillée stérile + 20 μl d'ADN (extrait de tique ou témoin positif) ou de témoin négatif (eau distillée).

Mettre dans le thermocycleur et lancer le programme suivant :

- ① 94°C pendant 3 minutes
- ② 94°C pendant 20 secondes
- ③ 60°C pendant 30 secondes, -1°C par cycle
- ④ 72°C pendant 30 secondes
- ⑤ Aller à ②, 8 fois
- ⑥ 94°C pendant 20 secondes
- ⑦ 52°C pendant 30 secondes
- ⑧ 72°C pendant 30 secondes
- ⑨ Aller à ⑥, 39 fois
- ⑩ 72°C pendant 7 minutes
- ⑪ 10°C, durée illimitée

Jour 3

7. Préparer une solution de NaOH à 0,1M (0,8 g dans 200 ml)

8. Préparer une solution d'EDAC à 16% (1,6 g dans 10 ml pour une membrane)

9. Découper un morceau de membrane assez grand pour pouvoir y fixer toutes les sondes et tous les échantillons. La garder dans le papier qui l'entoure pendant le découpage. Placer le flacon de SSPE 2X/SDS 0,1% à 50°C.

10. Activation de la membrane : incubation de 15 minutes dans les 10 ml d'EDAC à 16%, dans une boîte en plastique, à température ambiante.

11. Lavage : Vider la solution d'EDAC à 16%, ajouter de l'eau distillée et remuer pendant 2 minutes. Puis, placer la membrane dans le mini-blotter sur un fin support éponge. Visser fortement.

12. Attache des sondes : Remplir les canaux du mini-blotter avec 150 µl des sondes diluées, en laissant les deux premières et les deux dernières lignes vides. Prendre soin de ne laisser aucune bulle dans les canaux. Ajouter de l'encre diluée à 1% avec du SSPE 2x dans les canaux vides jouxtant la première et la dernière lignes remplies, de façon à délimiter la zone de la membrane où se trouvent les sondes. Incuber pendant 1 minute à température ambiante.

13. Retirer les sondes par aspiration dans le même ordre que celui avec lequel elles ont été pipetées dans les canaux. Utiliser un embout de pipette pour les sondes et un embout pour l'encre.

14. Retirer la membrane du mini-blotter en ouvrant celui-ci et en saisissant la membrane avec des pinces, et l'incuber dans 200 ml de NaOH à 0,1M pendant 10 minutes maximum (sinon l'hybridation sera plus faible) à température ambiante, dans une boîte en plastique, en remuant, pour l'inactiver. Jeter le support éponge. Rincer le mini-blotter à l'eau en utilisant du papier pour nettoyer les fentes.

15. Rincer la membrane avec de l'eau distillée.

16. Laver la membrane dans la boîte en plastique avec 250 ml de SSPE 2x/SDS 0,1% pendant 10 minutes à 50°C, en remuant doucement.

17. Laver la membrane dans la boîte en plastique avec 100 ml d'EDTA à 20mM et à pH 8 pendant 15 minutes à température ambiante.

18. Conserver la membrane à 4°C jusqu'à son utilisation (enveloppée de cellophane pour éviter sa déshydratation).

Jour 4

19. Préchauffer les solutions tampons restantes avant utilisation.

20. Ajouter 10 µl des produits de la PCR à 150 µl de SSPE 2x/SDS 0,1%.

- 21.** Dénaturer les produits dilués de la PCR pendant 10 minutes à 100°C puis refroidir immédiatement (dans le thermocycleur ou dans de la glace).
- 22.** Laver la membrane pendant 5 minutes à 55°C dans 250 ml de SSPE 2x/SDS 0,1%.
- 23.** Placer la membrane sur un support éponge dans le mini-blotter, de telle façon que les canaux soient perpendiculaires aux lignes parallèles formées par le dépôt des sondes. La première ligne de sonde doit être située en haut de la membrane.
- 24.** Enlever les liquides résiduels des canaux du mini-blotter par aspiration avec une pipette.
- 25.** Remplir les canaux avec les produits de la PCR. La première ligne doit être seulement du tampon (150 µl de SSPE 2x/SDS 0,1%). Ne pas laisser de bulles dans les canaux car elles interfèreraient avec l'hybridation). Remplir la dernière ligne également avec du tampon.
- 26.** Incuber pendant 45 minutes à 55°C pour permettre l'hybridation, sur une surface horizontale, sans remuer.
- 27.** Retirer les échantillons du mini-blotter par aspiration et sortir la membrane du dispositif en utilisant des pinces.
- 28.** Laver la membrane deux fois dans 250 ml de SSPE 2x/SDS 0,5% pendant 1 à 2 minutes, à 65°C, dans une boîte en plastique.
- 29.** Déposer la membrane dans une autre boîte en plastique et laisser refroidir pour éviter l'inactivation de la phosphatase alcaline dans l'étape suivante. Ouvrir l'incubateur et descendre la température à 42°C.
- 30.** Ajouter 5 µl de conjugué streptavidine-phosphatase alcaline (500 U/ml) à 25 ml de SSPE 2x/SDS 0,5%. Incuber la membrane dans cette solution pendant 30 minutes à 42°C dans la boîte en plastique, en remuant.
- 31.** Laver la membrane 2 fois dans 250 ml de SSPE 2x/SDS 0,5% pendant 10 minutes à 42°C pour enlever l'excès de conjugué streptavidine-phosphatase alcaline.
- 32.** Rincer la membrane 2 fois dans 250 ml de SSPE 2x pendant 5 minutes à température ambiante pour enlever le SDS.
- 33.** pour la détection chémoluminescente de l'ADN qui se serait hybridé, incuber la membrane à température ambiante avec du liquide de détection CDP-Star®, pendant 1 minute. Ne pas verser trop de liquide mais suffisamment pour qu'il recouvre la membrane en remuant la boîte. Vider l'excès de liquide après l'incubation.
- 34.** Envelopper avec soin la membrane dans du cellophane en s'assurant qu'aucune bulle ni aucun pli ne recouvre la membrane. Ne pas toucher la partie où se seraient hybridés les fragments d'ADN.
- 35.** Positionner la membrane enveloppée de cellophane dans une cassette radiologique et la fixer dedans (attention à l'orientation de la membrane).
- 36.** En chambre noire, ajouter un film radiographique par-dessus la membrane dans la cassette. Plier un coin du film pour se souvenir de l'orientation. Fermer la cassette et exposer pendant 25 minutes.
- 37.** Préparer les liquides développeur et fixateur. Développer à la lumière rouge pendant 5 minutes (4 minutes s'il s'agit d'un développeur rapide). Passer dans un bain d'eau pendant 30 secondes. Puis passer dans le fixateur pendant 1 minute. La lumière peut être rallumée à la fin et le film peut être rincé dans l'eau pendant 15 minutes.

Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* Populations Across Central Britain

Judy Bettridge,¹ Marine Renard,¹ Fan Zhao,² Kevin J. Bown,³ and Richard J. Birtles³

Abstract

Lyme borreliosis is rapidly emerging in the United Kingdom, with over 1000 cases per annum now reported. Lyme borreliosis is caused by the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) group of spirochetes, which are transmitted by ixodid ticks. In the United Kingdom, *Ixodes ricinus* is recognized as the principal vector of the spirochetes, and this tick species is widely distributed across the country. However, as yet, it is unclear whether the distribution of *B. burgdorferi* essentially mirrors that of its vector, or if there are marked differences between the 2. The aim of this survey was to investigate the prevalence of *B. burgdorferi* in *I. ricinus* populations across northern England, north Wales, and the Scottish Border region. We surveyed for questing *I. ricinus* nymphs and adults at 17 sites, encountering ticks at 12. At 8 sites, large numbers (>160) ticks were collected, and at 3 of these sites *B. burgdorferi* infection prevalence was significantly higher (>7.5%) than the other 5 (<1.0%). Habitat type was associated with *B. burgdorferi* prevalence, with ticks from deciduous and mixed woodland being significantly more likely to be infected than those from other habitat types. Identification of infecting *Borrelia* species indicated that *Borrelia valaisiana* was the most common and widespread species encountered. *B. garinii* was common at sites where infection prevalence was high, and *B. afzelii* was also occasionally encountered at these sites. The survey revealed a surprisingly uneven distribution of *B. burgdorferi* s.l. across the region, thereby indicating that the presence of ticks does not necessarily mean the presence of the pathogen. Indeed, the spirochete appears to be absent or very rare at some sites where ticks are abundant.

Key Words: *Borrelia burgdorferi* sensu lato—*Ixodes ricinus*—Central Britain.

Introduction

THE HARD TICK, *Ixodes ricinus*, IS A VECTOR for many of the arthropod-borne diseases of humans and livestock in temperate zones of the Northern Hemisphere. Lyme borreliosis, the most common tick-borne disease in Europe and North America, is caused by spirochetes belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) complex. Within this complex, numerous species have been delineated and, of these, *Borrelia afzelii*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia burgdorferi* sensu strictu (s.s.), *Borrelia garinii*, *Borrelia lusitaniae*, and *Borrelia valaisiana* have been most frequently encountered in Europe. Many surveys of *B. burgdorferi* s.l. in European *I. ricinus* populations have now been reported (e.g., Kirstein et al. 1997, Rauter and Hartung 2005, Halos et al. 2010, Kjelland et al. 2010, Nazzi et al. 2010, Reye et al. 2010), and these have demonstrated not only that the overall prevalence of infection can significantly

differ between survey sites, but that the relative contribution each complex member makes to the local *I. ricinus*-associated *B. burgdorferi* community varies markedly between sites. The reasons for this variation are not fully understood, but are undoubtedly, in part, a reflection of the local vertebrate host fauna. This fauna influences not only *I. ricinus* population dynamics but is also a determinant of the *B. burgdorferi* s.l. complex composition, because different members of this complex appear to have adapted to exploit different vertebrates as reservoir hosts; *B. garinii* and *B. valaisiana* are associated with birds whereas *B. afzelii* is associated with small mammals (Kurtenbach et al. 2002, Hanincová et al. 2003a,b). Conversely, *B. burgdorferi* s.s., in North America at least is far more of a generalist, exploiting a wide range of hosts (Ginsberg et al. 2005, Hanincová et al. 2006).

Lyme borreliosis is an emerging disease in the United Kingdom. Over the past decade, the number of cases being

¹School of Veterinary Science, Leahurst Campus, University of Liverpool, Cheshire, United Kingdom.

²State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China.

³School of the Environment and Biological Sciences, University of Salford, Salford, United Kingdom.

diagnosed each year has increased 10-fold, such that in 2010, over 1000 serologically confirmed infections were reported (Health Protection Agency 2010, Health Protection Scotland 2010). In addition, it has recently been estimated that as many as 2000 cases per year may go unconfirmed (British Infection Association 2011). Why Lyme borreliosis should have emerged so dramatically in the United Kingdom over the past decade or so is unclear. Improvements in medical awareness, diagnostics, and reporting are likely contributory factors, but they may also reflect an increased natural presence of *B. burgdorferi*. Although some efforts have been made to establish the national distribution of *I. ricinus*, and how this is changing (Kirby et al. 2004, Pietzsch et al. 2005, Scharlemann et al. 2008, Gray et al. 2009, Smith et al. 2011), there have been, to date, only a handful of surveys that have attempted to quantify the presence of *B. burgdorferi* in UK *I. ricinus* populations (Livesley et al. 1994, Kirstein et al. 1997, Kurtenbach et al. 1998, Davidson et al. 1999, Ling et al. 2000, Vollmer et al. 2011), hence knowledge of the distribution of the pathogen is primarily derived from Lyme borreliosis patient histories (Smith et al. 2000; Health Protection Agency 2010). These data suggest that there are apparent “Lyme borreliosis hot spots” in the United Kingdom (Smith et al. 2000), but, because the natural presence of *B. burgdorferi* within hot spots is apparently no greater than elsewhere, the higher contact rates be-

tween infected ticks and humans result from a higher frequency of human visits to these sites (Dobson et al. 2011). One other possible determinant of “hot spots” may be the composition of the “guild” of *Borrelia* species present. Some species are far more frequent zoonotic agents than others; thus, the medical significance of *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., and *B. garinii* is well established, whereas the importance of *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, and *B. bissettii* remains uncertain (Ruzic-Sabljić et al. 2008).

We investigated the distribution of borreliae-infected ticks across central Britain. We chose this region because previous studies have focused on southern England or the Scottish Highlands and, anecdotal evidence suggests that central Britain contains areas where ticks are known to be abundant, but from which few cases of Lyme borreliosis have been reported.

Materials and Methods

Sample collection

Potential survey sites were first identified using satellite imagery (Google Earth) to locate forest/woodland areas across central Britain. The suitability of these sites, largely in terms of the presence of ticks and/or deer, and accessibility, was assessed through contact with, primarily, Forestry Commission rangers. Because surveying all sites deemed

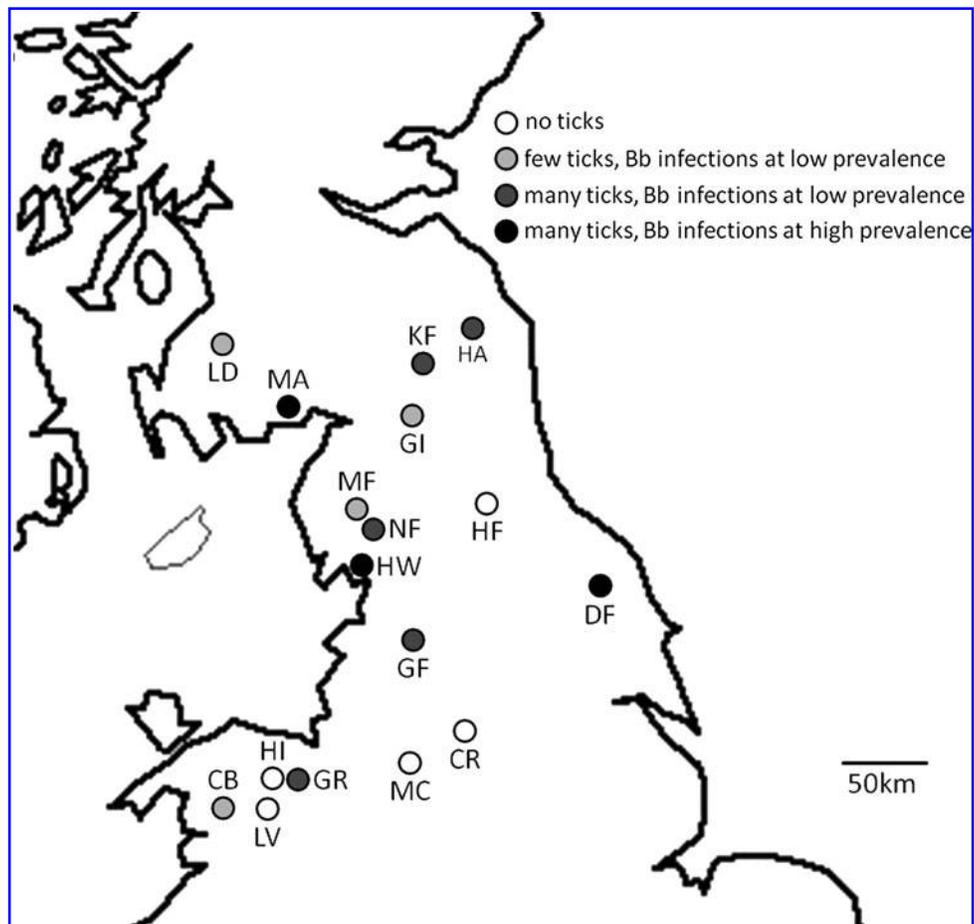


FIG. 1. Map of central Britain showing locations of sites used in this study. Bb, *Borrelia burgdorferi*; CB, Coed y Brenin; CR, Crowden; DF, Dalby Forest; GI, Gilsland; GF, Gisburn Forest; GR, Graig-fechan; HW, Hampsfell Woods; HF, Hamsterley Forest; HA, Harwood; HI, Hiraethog; KF, Kielder Forest; LV, Lake Vyrnwy; LD, Loch Doon; MA, Mabie Forest; MC, Macclesfield Forest; MF, Mell Fell; NF, Naddle Forest.

TABLE 1. LOCATION OF SITES USED IN THIS STUDY AND DETAILS OF *I. RICINUS* COLLECTIONS AND *B. BURGDORFERI* S.L. INFECTIONS IN COLLECTED TICKS

Site	Ordnance survey grid ref.	Habitat ^a	I. ricinus collected		Infected ticks	
			Adults	Nymphs	Adults	Nymphs (% prevalence: exact binomial 95% confidence intervals)
Coed y Brenin, Gwynedd	SH7227	Mixed woodland	2	40	0	0 (0: 0-8.81)
Crowden, Derbyshire	SK0799	Moorland	0	0		
Dalby Forest, North Yorkshire	SE8587	Mixed woodland	20	237	2	19 (8.02: 4.89-12.24)
Gilsland, Northumbria	NY6768	Conifer plantation/grassland	16	55	0	0 (0: 0-6.49)
Gisburn Forest, Lancashire	SD7457	Conifer plantation/grassland	14	253	2	2 (0.79: 0.09-2.83)
Graig-fechan, Clwyd	SJ1554	Moorland	22	212	0	2 (0.94: 0.11-3.37)
Hampfell Woods, Cumbria	SD4078	Deciduous woodland	29	245	6	19 (7.75: 4.73-11.85)
Hamsterley Forest, County Durham	NZ0931	Mixed woodland	0	0		
Harwood, Northumberland	NY9994	Conifer plantation/grassland	6	167	0	0 (0: 0-2.18)
Hiraethog, Clwyd	SJ0351	Mixed woodland	0	0		
Kielder Forest, Northumbria	NY6096	Conifer plantation/grassland	100	185	0	1 (0.54: 0-2.97)
Lake Vymwy, Powys	SH9524	Moorland	0	0		
Loch Doon, South Ayrshire	NX4794	Conifer plantation/grassland	0	8	nt ^b	nt
Mabie Forest, Dumfriesshire	NX9371	Deciduous woodland	18	232	0	19 (8.19: 5.0-12.49)
Macclesfield Forest, Cheshire	SJ9670	Deciduous woodland	0	0		
Mell Fell, Cumbria	NY4024	Deciduous woodland	2	28	0	1 (3.57: 0.09-18.35)
Naddle Forest, Cumbria	NY4914	Moorland	72	249	0	0 (0: 0-1.47)

^aHabitat definitions: Deciduous woodland, >80% of trees deciduous; conifer plantation, >80% trees conifers; mixed woodland, woodland in which conifers/deciduous each contribute 20-80% of trees; moorland, generally treeless, heather, bracken, vegetation typically <50 cm high; grassland, generally treeless, juncus grass, vegetation typically >50 cm high.

^bNot tested.

suitable was beyond our capacity, we selected 17 that were geographically dispersed across the study area (Fig. 1). Survey of these sites was carried out on warm (14–27°C), rain-free days between May and July, 2010, and most sites were visited only once. Questing *I. ricinus* ticks were collected by blanket dragging, with nymphs and adults being removed into 70% ethanol. Each drag was, typically, 10–15 meters long, although we did not attempt to standardize dragging because we were not attempting to quantify tick populations. Dragging was repeated until we estimated that at least 200 nymphs had been collected. At some sites, no or very low numbers of ticks were encountered. These sites were surveyed for a minimum of 90 min by at least 3 people, and we estimate that an area of ground in excess of 1000 square meters was dragged at these sites.

DNA extraction, *B. burgdorferi* detection, and *Borrelia* species delineation

DNA extraction was performed in a dedicated laboratory located apart from those in which PCR products were handled. Each *I. ricinus* adult or nymph was placed in an individual 1.7-mL Eppendorf tube, and a crude DNA extract was prepared from it using alkaline lysis as previously described (Guy and Stanek 1991). One “blank” (no tick) sample was co-processed with every 5 ticks. Extracts were individually tested for the presence of *Borrelia* species by real-time PCR amplification of a fragment of the 23S ribosomal RNA encoding gene, as previously described (Courtney et al. 2004). For nymphal ticks only, reverse line blotting (RLB) (Alekseev et al. 2001; Poupon et al. 2006) was used to determine from which species within the *B. burgdorferi* s.l. complex all real-time PCR products were obtained. In addition, the identity of the *Borrelia* species in a random subset of extracts from nymphal ticks was also tested by comparative analysis of 5S–23S rDNA intergenic spacer region sequences, following amplification of this region as previously described (Rijpkema et al. 1995).

Statistical analysis

To investigate the potential effects of habitat type (as a proxy for host community structure) and tick developmental stage (because adult ticks have been previously reported to be infected more commonly than nymphs; e.g., Rauter and Hartung 2005) on the probability of a tick being infected with *B. burgdorferi* s.l., we used generalized linear mixed models (GLMMs) with a binomial error term and a logit link. Maximal models had individual tick infection status as the response variable, with tick developmental stage and habitat type as fixed effects. Site was included as a random effect to account for possible pseudoreplication associated with information for each habitat being based on a number of different sites. Model selection was based on backward stepwise model selection with only variables significant at the $p < 0.05$ level being retained in the final model. Analyses were undertaken using R 2.14 (<http://www.r-project.org/>).

Results

I. ricinus nymphs and adults were found at 12 of the 17 sites visited (Table 1). The 5 sites where ticks were not found were geographically dispersed (Fig. 1) and were of differing habitat categories. Four sites yielded only between 8 and 71 ticks, but at the remaining 8 sites at least 173 ticks were collected.

TABLE 2. PARAMETER ESTIMATES (LOGIT SCALE) AND STANDARD ERRORS FOR THE MODEL OF INFECTION WITH *B. BURGDORFERI* IN TICKS (DECIDUOUS WOODLAND IS THE REFERENCE HABITAT TYPE)

Parameter	Coefficient (standard error)	z value	Probability > z
Intercept	–2.43 (0.16)	–15.59	<0.001
Mixed woodland	–0.16 (0.28)	–0.57	0.57
Moorland	–3.03 (0.73)	–4.17	<0.001
Plantation/grassland	–2.64 (0.48)	–5.56	<0.001

All ticks, except those collected at Loch Doon, were tested for the presence of *B. burgdorferi* DNA. Ticks from Loch Doon were not tested because too few were collected to yield useful data. Of the 2204 ticks (nymphs and adults) tested, 73 yielded an amplicon, giving an overall prevalence of infection of 3.31% (95% confidence interval [CI] 2.60–4.15). Of the 1903 nymphs tested, 63 (3.31%, 95% CI 2.55–4.22) yielded an amplicon. No evidence of *B. burgdorferi* infection was found at four sites (Coed y Brenin, Gilsland, Harwood, and Naddle Forest). The prevalence of infection in nymphs at the other sites varied between 0.54% (95% CI 0–2.97) and 8.19% (95% CI 5.0–12.49) (Table 1).

GLMM analyses indicated that habitat type, but not tick developmental stage, significantly influenced the probability of a tick being infected with *B. burgdorferi* (Table 2). Relative to those collected from deciduous forest, ticks from moorland were significantly less likely to be infected with *B. burgdorferi* (odds ratio [OR] = 0.048, 95% CI 0.012–0.2). That is, the odds of a tick being infected in deciduous woodland are approximately 20.64 (i.e., 1/0.048) times greater than they are in moorland. Similarly, ticks from conifer plantation/grassland habitats were also significantly less likely to be infected than those from deciduous woodland (OR = 0.07, 95% CI 0.028–0.18). No significant difference was found between ticks collected from deciduous and mixed woodland (OR for mixed woodland = –0.16, 95% CI 0.30–1.23).

The identities of *Borrelia* species present in 72 of the 73 nymphs that were found to contain *B. burgdorferi* s.l. DNA were successfully determined using RLB and comparative sequence analysis. Seventy-one of the 73 nymphs were tested using RLB (for 2 nymphs, insufficient DNA was available), with infecting *Borrelia* species being identified in 70 (DNA from 1 nymph reacted only with the *B. burgdorferi* s.l. probe). Sequence data for a single *Borrelia* species was obtained from 12 of the 15 nymphs tested (for 3, chromatographic data were of insufficient quality to be trustworthy). For 10 nymphs, the identities of infecting *Borrelia* species were determined by both comparative sequence analysis and RLB; 9 produced identical results, whereas for the 10th nymph, comparative sequence analysis indicated a *B. garinii* infection and RLB indicated a mixed infection of *B. garinii* and *B. valaisiana*. In total, 41 nymphs (58%) contained *B. valaisiana* DNA and 24 nymphs (33%) contained *B. garinii* DNA. Two nymphs (3%) contained *B. afzelii* DNA. The remaining 5 nymphs contained DNA from both *B. valaisiana* and *B. garinii* (Fig. 2).

B. valaisiana was encountered at all 7 of the sites where *B. burgdorferi* s.l.-infected nymphs were found. *B. garinii* and mixed infections were found at the 3 deciduous forest sites

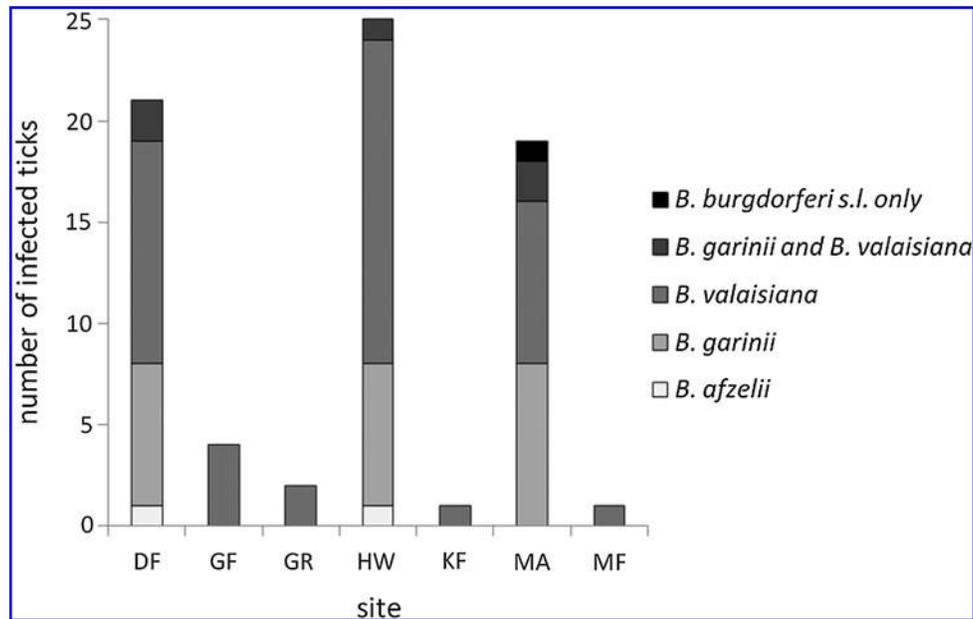


FIG. 2. Identity of *Borrelia* species contributing to spirochete communities in infected *I. ricinus* ticks collected from seven sites during this study. DF, Dalby Forest; GF, Gisburn Forest; GR, Graig-fechan; HW, Hampsfell Woods; KF, Kielder Forest; MA, Mabie Forest; MF, Mell Fell. For 1 tick at MA, the RLB indicated the presence of a *B. burgdorferi* s.l. member but was unable to delineate which species within the complex to which this organism belonged. In several ticks, mixed infections of *B. garinii* and *B. valaisiana* were detected.

with the highest overall prevalence of *B. burgdorferi* s.l. infection. *B. afzelii* was also found at 2 of these sites (Fig. 2).

Discussion

The generally accepted view of *B. burgdorferi* distribution in Europe is that the bacteria are present more or less wherever there are *I. ricinus* ticks (Dobson et al. 2011). The evidence to support this assumption is that only very rarely have surveys of *I. ricinus* failed to yield any evidence of infection; indeed, in a recent systematic review of the prevalence of *B. burgdorferi* in *I. ricinus* in Europe, only 1 of 110 studies from 24 countries reported such a failure (Rauter and Hartung 2005). This study was carried out in coastal deciduous woodland in northern Italy and reported the quantification of *I. ricinus* seasonal dynamics but repeated, unsuccessful attempts to detect infection by and/or exposure to *B. burgdorferi* in (>250) questing ticks and vertebrates frequenting the woodland (Mannelli et al. 1999). No other study included in the systematic review reported a *B. burgdorferi* infection prevalence of less than 1.5%, and only 5 reported a prevalence of less than 3% (Rauter and Hartung 2005). Thus, our finding that *B. burgdorferi* infections appear to be absent from, or present at extremely low prevalences at, numerous sites in central Britain is noteworthy. Five of the sites we surveyed appeared to support a high density of ticks in which *B. burgdorferi* s.l. infection prevalence ranged between 0% and 1.5%. These sites were geographically distinct, lying in north Wales, Lancashire, eastern Cumbria, and Northumberland, and were interspersed with sites that apparently supported high tick densities in which *B. burgdorferi* infection prevalence was significantly higher and akin to prevalence values commonly reported at sites in southern England (Vollmer et al. 2011).

Our findings point to a patchy distribution for *B. burgdorferi* in central British *I. ricinus* populations and are thus inconsistent with the impression created by previously reported studies carried out elsewhere in the United Kingdom, in which *B. burgdorferi* is almost always found (Livesley et al. 1994, Kurtenbach et al. 1998, Davidson et al. 1999, Ling et al. 2000). However, there is at least 1 exception; Vollmer and colleagues (2011) reported an absence of *B. burgdorferi* infections in 82 nymphs surveyed at Rhossili Down in South Wales. Furthermore, the same authors reported infection in only 1 of 71 nymphs collected in Richmond Park, Surrey (Vollmer et al. 2011), although others have reported higher infection prevalence values in this park (Dobson et al. 2011). Very recent work from elsewhere in Europe has also indicated that the distribution of *B. burgdorferi* in *I. ricinus* populations may be more patchy than previously recognized. Gassner and colleagues (2011) surveyed *I. ricinus* populations at 24 sites across The Netherlands, but found *B. burgdorferi* infections at only 16. The authors suggested that an absence of evidence for *B. burgdorferi* at these sites may have been due to too few ticks being tested, but did not specify how many ticks had been examined from these sites. However, the study did present data indicating an absence of *B. burgdorferi* infections at sites supporting up to 50 *I. ricinus* nymphs per 100 square meters (Gassner et al. 2011).

Given the cross-sectional nature of our study, we cannot rule out that the observed absence of ticks and/or *B. burgdorferi* (at some of our tick-infested sites) was temporary. Previously reported longitudinal studies have observed annual fluctuations in the prevalence of *B. burgdorferi* infections in *I. ricinus* populations at specific sites (Mejlon and Jaenson 1993, Wielinga et al. 2006), and these fluctuations were often dramatic enough that interannual *B. burgdorferi* prevalence

values were significantly different from one another, even when relatively few ticks were sampled. Although we can find no record of an apparent temporary absence of infections in *I. ricinus* populations that otherwise maintained *B. burgdorferi*, a 4-year longitudinal study of *Ixodes pacificus* populations in the western United States was unable to detect *B. burgdorferi* at some sites during the first year of survey, but subsequently consistently detected the spirochete at those sites (Eisen et al. 2004). Clearly, repeated sampling at our sites would address this shortfall, although sporadic attempts to detect *B. burgdorferi* in *I. ricinus* ticks collected in Kielder Forest over the past 8 years have never succeeded (K.B., unpublished observations). Furthermore, discussion with a local general practice suggested that, although practitioners had attended Lyme disease patients, they had no record of locally acquired cases (R.B., personal communication).

We can only speculate why we observed such patchiness, but our data suggest that habitat type influences the prevalence of *B. burgdorferi* in questing ticks. Infection prevalence in ticks collected from deciduous and mixed woodland sites was significantly higher than at other sites where conifer plantation, grassland, or moorland was the dominant habitat. The effect of habitat on prevalence of *B. burgdorferi* has previously been reported in Europe and the United States (Wielinga et al. 2006, Brownstein et al. 2005, Halos et al. 2010). This is likely to be a reflection of the different host community structure found in different habitats. Interestingly, 1 of the sites where we did not detect any *B. burgdorferi* was Naddle Forest in eastern Cumbria, a location where *B. burgdorferi* has previously been encountered (Ogden et al. 1997). This report detailed the maintenance of *B. burgdorferi* at the site via sheep primarily by co-feeding adult and nymphal ticks. Although our sampling at this site included 72 adults, in which no infections were diagnosed, these were collected on a specific area of moorland from which sheep had been excluded for several years. Thus, the absence of *B. burgdorferi* infections in our sample is not inconsistent with the enzootic cycle proposed by Ogden and colleagues (1997). Indeed, such cycles may exist at other sites where we tested few adults and encountered low prevalence or absence of *B. burgdorferi* infections in questing nymphs.

Despite the unexpected patchiness in distribution of *B. burgdorferi* infections across our study area, our work confirms the presence of the pathogen in several previously unexplored tick populations, thereby adding to the expanding knowledge of *B. burgdorferi* distribution in the United Kingdom. However, as pointed out previously (Dobson et al. 2011), the public health risk posed by the presence of *B. burgdorferi* in these populations is tempered by the extent of their contact with humans. All 3 sites where we recorded a high prevalence of *B. burgdorferi* in questing ticks were close to towns (Dumfries, Grange-over-Sands, and Pickering) and were well visited; indeed Mable Forest and Dalby Forest are specifically promoted as tourist/recreation sites, with well over 500,000 visitors per annum between them (<http://www.forestry.gov.uk/>), equating to a density of visits to Dalby Forest of approximately 12,000 visits/km² per year.

Our observation of *B. afzelii* at 2 sites in northern England suggests a widespread presence of this species in the country. Previously, the species has only been observed at sites in south and southwestern England (Couper et al. 2010, Vollmer et al. 2010). However, as also observed by Vollmer and colleagues

(2011), the species represented only a minor component of the *Borrelia* community at the 2 sites where we found it. The apparent scarcity of *B. afzelii* in southern Britain is in marked contrast to the apparent abundance of the species in the Scottish highlands (Ling et al. 2000). Furthermore, we did not encounter *B. burgdorferi* s.s., another species that appears to be rare in the United Kingdom outside the Scottish Highlands (Kurtenbach et al. 1998, Ling et al. 2000, Couper et al. 2010, Vollmer et al. 2011). In keeping with earlier work (Kurtenbach et al. 1998, Ling et al. 2000, Couper et al. 2010, Vollmer et al. 2011), we observed that *B. valaisiana* and *B. garinii* were the species that contributed most to *Borrelia* communities at our study sites. *B. valaisiana* was the most widespread, being present at all sites where we encountered *Borrelia*-infected ticks. That only *B. valaisiana* was identified at sites where *Borrelia* infections were extremely rare may simply reflect the widespread dominance of this species across southern Britain, however, but also likely reflects the dispersal efficiency of this and other avian-adapted species (Vollmer et al. 2011), and thus their enhanced potential as invaders of remote tick communities in which borreliae may or may not be established. This process has been elegantly demonstrated as *B. burgdorferi* emerges in southern Canada (Ogden et al. 2010), but is clearly ongoing throughout the distribution of the spirochete.

One of our most unexpected observations was the apparent absence of *I. ricinus* from some of our survey sites, despite them possessing a flora and fauna at least superficially akin to those of sites where *I. ricinus* was present in abundance. The patchiness of *I. ricinus* distribution on a relatively local scale has been described previously (Milne 1944) and correlated to drainage and vegetation, but this study was restricted to Northumbrian farmland used for livestock grazing rather than woodland. Three of the sites in our study matched the "rough grazing" habitat that Milne (1944) associated with the presence of *I. ricinus*; we encountered ticks at 2 (Graigfechan and Naddle Forest) but not at the 3rd (Crowden). The absence of ticks from Hamsterley Forest in County Durham is particularly bemusing given the high density of roe deer in the vicinity (Andrew Rothwell, Forestry Commission Wildlife Ranger, personal communication). A passive surveillance programme for UK ticks, managed by the Health Protection Agency, has been in place since 2005, and collation of the data this program has assimilated with historical records has provided the most complete picture of *I. ricinus* distribution in the United Kingdom to date (Jameson and Medlock 2011). These data do not currently include any ticks from the vicinity of Hamsterley Forest or, indeed, anywhere in the Pennine Hills in between the Yorkshire Dales and the Tyne valley, perhaps suggesting *I. ricinus* is absent from a large part of this region. However, by its very nature, this is a survey of where ticks are, rather than where they are not. Active survey would clearly help clarify *I. ricinus* distribution in the region.

In conclusion, we demonstrated similar patterns of *Borrelia* infection in tick populations in parts of northern England, north Wales, and southern Scotland to those found in the south of England and Northern Ireland, but differing from those found in the north of Scotland. In addition we identified sites at which (1) ticks were unexpectedly absent, or (2) *B. burgdorferi* appeared not to be established, despite an abundant tick population. Further studies to determine why such differences exist are warranted, as they could help to predict

Lyme borreliosis risk as well as explore the complex ecology of this pathogen.

Acknowledgments

We would like to thank members of the Forestry Commission GB and the Field Studies Council for their help in identifying and providing access to sampling sites. We also acknowledge funding from the Henry Lester Trust (to F.Z.) and from The Wellcome Trust (to M.R.) and the Veterinary Training and Research Initiative (VTRI) by the Higher Education Funding Council for England and the United Kingdom's Department for the Environment, Food and Rural Affairs (to J.B.).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Alekseev AN, Dubinina AV, van de Pol I, Schouls LM. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2237–2242.
- British Infection Association. The epidemiology, prevention, investigation and treatment of Lyme borreliosis in United Kingdom patients: A position statement by the British Infection Association. *J Infect* 2011; 62:329–338.
- Brownstein JS, Skelly DK, Holford TR, Fish D. Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. *Oecologia* 2005; 146:469–475.
- Couper D, Margos G, Kurtenbach K, Turton S. Prevalence of *Borrelia* infection in ticks from wildlife in south-west England. *Vet Rec* 2010; 167:1012–1014.
- Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3164–3168.
- Davidson MM, Evans R, Ling CL, Wiseman AD, et al. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from ticks in the Highlands of Scotland. *J Med Microbiol* 1999; 48:59–65.
- Dobson ADM, Taylor JL, Randolph SE. Tick (*Ixodes ricinus*) abundance and seasonality at recreational sites in the UK: Hazards in relation to fine-scale habitat types revealed by complementary sampling methods. *Ticks Tick-Borne Dis* 2011; 2:67–74.
- Eisen L, Eisen RJ, Chang CC, Mun J, et al. Acarologic risk of exposure to *Borrelia burgdorferi* spirochaetes: Long-term evaluations in north-western California, with implications for Lyme borreliosis risk-assessment models. *Med Vet Entomol* 2004; 18:38–49.
- Gassner F, van Vliet AJ, Burgers SL, Jacobs F, et al. Geographic and temporal variations in population dynamics of *Ixodes ricinus* and associated *Borrelia* infections in The Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:523–532.
- Ginsberg HS, Buckley PA, Balmforth MG, Zhioua E, et al. Reservoir competence of native North American birds for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* 2005; 42:445–449.
- Gray J S, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, et al. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 2009:593232.
- Guy EC, Stanek G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1991; 44:610–611.
- Halos L, Bord S, Cotté V, Gasqui P, et al. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:4413–4420.
- Hanincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, et al. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 2003a; 126:11–20.
- Hanincová K, Taragelová V, Koci J, Schäfer SM, et al. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol* 2003b; 69:2825–2830.
- Hanincová K, Kurtenbach K, Diuk-Wasser M, Brei B, et al. Epidemic spread of Lyme borreliosis, northeastern United States. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:604–611.
- Health Protection Agency. Lyme borreliosis in England and Wales, 2010. Available at <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/LymeDisease/EpidemiologicalData/lym005Lymeborreliosis2010/>. Accessed January 5, 2013.
- Health Protection Scotland. Lyme disease Scotland, annual totals 2010. <http://www.documents.hps.scot.nhs.uk/giz/10-year-tables/lyme.pdf/>. Accessed January 13, 2013.
- Jameson LJ, Medlock JM. Tick surveillance in Great Britain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:403–412.
- Kirby AD, Smith AA, Benton TG, Hudson PJ. Rising burden of immature sheep ticks (*Ixodes ricinus*) on red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*) chicks in the Scottish uplands. *Med Vet Entomol* 2004; 18:67–70.
- Kirstein F, Rijpkema S, Molkenboer M, Gray JS. The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *Eur J Epidemiol* 1997; 13:67–72.
- Kjelland V, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A. Prevalence and genotypes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in southern Norway. *Scand J Infect Dis* 2010; 42:579–585.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schäfer SM et al. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: The key role of host complement. *Trends Microbiol* 2002; 10:74–79.
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, et al. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:1169–1174.
- Ling CL, Joss AWL, Davidson MM, Ho-Yen DO. Identification of different *Borrelia burgdorferi* genomic groups from Scottish ticks. *Mol Pathol* 2000; 53:94–98.
- Livesley MA, Carey D, Gern L, Nuttall PA. Problems of isolating *Borrelia burgdorferi* from ticks collected in United Kingdom foci of Lyme disease. *Med Vet Entomol* 1994; 8:172–178.
- Mannelli A, Cerri D, Buffrini L, Rossi S, et al. Low risk of Lyme borreliosis in a protected area on the Tyrrhenian coast, in central Italy. *Eur J Epidemiol* 1999; 15:371–377.
- Mejlon HA, Jaenson TG. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1993; 25:449–456.
- Milne A. The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. Distribution of the tick in relation to geology, soil and vegetation in northern England. *Parasitol* 1944; 35:186–196.
- Nazzi F, Martinelli E, Del Fabbro S, Bernardinelli I, et al. Ticks and Lyme borreliosis in an alpine area in northeast Italy. *Med Vet Entomol* 2010; 24:220–226.
- Ogden NH, Nuttall PA, Randolph SE. Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitol* 1997; 115:591–599.
- Ogden NH, Bouchard C, Kurtenbach K, Margos G et al. Active and passive surveillance and phylogenetic analysis of *Borrelia*

- burgdorferi* elucidate the process of Lyme disease risk emergence in Canada. *Environ Health Perspect* 2010; 118:909–914.
- Pietzsch ME, Medlock JM, Jones L, Avenell D, et al. Distribution of *Ixodes ricinus* in the British Isles: investigation of historical records. *Med Vet Entomol* 2005;19:306–314.
- Poupon M, Lommano E, Humair P, Douet V, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:976–979.
- Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:7203–7216.
- Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2923–2931.
- Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, et al. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1995;33:3091–3095.
- Ruzic-Sabljić E, Zore A, Strle F. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by pulsed-field gel electrophoresis after *MluI* restriction of genomic DNA. *Res Microbiol* 2008; 159:441–448.
- Scharlemann JP, Johnson PJ, Smith AA, MacDonald DW, et al. Trends in ixodid tick abundance and distribution in Great Britain. *Med Vet Entomol* 2008; 22:238–247.
- Smith FD, Ballantyne R, Morgan ER, Wall R. Prevalence, distribution and risk associated with tick infestation of dogs in Great Britain. *Med Vet Entomol* 2011;25:377–384.
- Smith R, O'Connell S, Palmer S. Lyme disease surveillance in England and Wales, 1986–1998. *Emerg Infect Dis* 2000; 6:404–407.
- Vollmer SA, Bormane A, Dinnis RE, Seelig F, et al. Host migration impacts on the phylogeography of Lyme borreliosis spirochaete species in Europe. *Environ Microbiol* 2011; 13:184–192.
- Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, de Boer A, et al. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:7594–7601.

Address correspondence to:

Richard J. Birtles
School of the Environment and Biological Sciences
Peel Building
University of Salford
Salford M5 4WT
United Kingdom

E-mail: r.j.birtles@salford.ac.uk

Toulouse, 2013

NOM et Prénom : RENARD Marine

ÉCOLOGIE DE LA BORRELIOSE DE LYME : ÉTUDE DANS DES POPULATIONS DE TIQUES DU GENRE *IXODES* DANS LE CENTRE DE LA GRANDE-BRETAGNE

La borréliose de Lyme est la maladie transmise par les tiques la plus commune de l'hémisphère Nord. Elle est causée par les spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, transmis par les tiques du genre *Ixodes* à l'homme et à l'animal. Les manifestations cliniques de la maladie présentent quelques similarités entre l'homme et les espèces animales sensibles, notamment le chien et le cheval, mais aussi des particularités spécifiques. Ce travail s'intéresse aux relations entre l'agent pathogène, le vecteur et l'hôte, de façon à comprendre la dynamique de transmission de la maladie et les effets de facteurs environnementaux sur cette triade. La borréliose est actuellement considérée comme une maladie émergente dans l'hémisphère Nord, car mieux diagnostiquée mais aussi parce que sa présence s'est accrue dans le milieu naturel, fruit du jeu entre de nombreux changements environnementaux et sociétaux. Ce travail rapporte en dernier lieu une étude menée sur la prévalence de l'infection dans des populations de tiques prélevées en différents sites du centre de la Grande-Bretagne. Le type d'habitat rencontré est corrélé à la prévalence de *Borrelia burgdorferi*, avec des tiques provenant de forêts décidues ou mixtes à dominante décidue significativement plus infectées que celles provenant d'autres types d'habitats. L'identification des espèces de *Borrelia* impliquées indique que *Borrelia valaisiana* est la plus répandue, *Borrelia garinii* se retrouve communément dans les sites à forte prévalence et *Borrelia afzelii* de façon occasionnelle. L'étude révèle également que la présence et l'abondance d'*Ixodes* n'est pas forcément indicatrice de la présence de *Borrelia*.

MOTS-CLES : borréliose de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, tique, zoonose, écologie, Reverse Line Blot, PCR

THE ECOLOGY OF LYME BORRELIOSIS: SURVEY IN *IXODES* TICK POPULATIONS ACROSS CENTRAL BRITAIN

Lyme borreliosis is the most common tick-borne disease in the Northern Hemisphere. It is caused by the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group of spirochetes, which are transmitted by *Ixodes* ticks to humans and animals. Clinical manifestations of the disease include similarities between humans and susceptible animal species, mainly dogs and horses, as well as specific features. This work scans the relationships between the pathogen, the vector and the host in order to clarify the transmission dynamics of the disease and the effects of environmental factors on this triad. Lyme disease is currently considered as an emerging disease not only thanks to improvements in medical awareness but also because of an increased natural presence of *Borrelia burgdorferi* as a result of environmental and societal changes. This work eventually reports a study on *Borrelia* infection in tick populations sampled in different sites of Central Britain. Habitat type was associated with *Borrelia burgdorferi* prevalence, with ticks from deciduous or mixed deciduous woodland significantly more likely to be infected than those from other habitat types. Identification of infecting *Borrelia* species indicated that *Borrelia valaisiana* was the most widespread species, that *Borrelia garinii* was common at sites where infection prevalence was high, and that *Borrelia afzelii* was occasionally encountered at these sites. The survey also reveals that the presence or abundance of *Ixodes* does not necessarily mean the presence of *Borrelia*.

KEY-WORDS: Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, tick, zoonosis, ecology, Reverse Line Blot, PCR