

Thèse
présentée devant
L'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Pour l'obtention
Du diplôme de Docteur
Spécialité : microbiologie infectieuse

Détection de bactéries pathogènes dans leur
vecteur, les tiques dures
(Acarien : *Ixodidae*)

Par
Lénaïg Halos

Directeurs de recherche :
Professeur Henri-Jean Boulouis
Docteur Muriel Vayssier-Taussat

Soutenue le 27 septembre 2005 devant le jury composé de :

Président : Professeur Jacques Guillot
Rapporteur : Professeur Philippe Brouqui
Rapporteur : Docteur Benoit Jaulhac
Examineur : Docteur Frédéric Beugnet

Remerciements

Aux membres du jury

Au Professeur Jacques Guillot,

pour me faire l'honneur de présider ce jury de thèse, pour la gentillesse et la disponibilité avec lesquelles il a accompagné toutes mes études depuis les premières heures vétérinaires aux travaux de recherche.

Au Docteur Benoit Jauhlac

pour avoir généreusement donné des extraits d'ADN de *Borrelia* sp., avoir eu l'amabilité d'accepter d'être un de mes rapporteurs et pour ses remarques précises et constructives.

Au Professeur Philippe Brouqui

pour avoir eu l'amabilité d'accepter d'être un de mes rapporteurs.

Au Docteur Frédéric Beugnet

pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail et pour avoir accepté de se joindre à ce jury.

Au Professeur Henri Jean Boulouis

Pour avoir dirigé cette thèse avec confiance et sympathie.

Au Docteur Muriel Vayssier-Taussat

Pour m'avoir guidée tout au long de ce travail, pour sa confiance, sa disponibilité et son dynamisme.

A toutes les personnes qui ont participé à ce travail en alliant professionnalisme et bonne humeur.

A la Bartonella Dream Team pour avoir rempli son rôle d'équipe de rêve : pour les coups de pouces en cas de soucis, pour l'amélioration permanente de la collection de bouteilles vides et pour toutes les tranches de vie partagées :

- A **Corinne**, pour m'avoir initiée à la mystique de la PCR et avoir pris l'auto-stoppeuse de Gagny pendant certains temps difficiles.
- A **Christelle**, pour son franc parler et son merveilleux mauvais caractère et pour tous les rires partagés entre les Algeccos.
- A **Danièle**, pour avoir été un ange gardien toujours de bonne humeur et pour les services inestimables rendus l'air de rien.
- A **Didier**, pour son extrême gentillesse.
- A **Francine**, pour ses précieux conseils.
- A **Henri Jean**, pour son incroyable sens des relations humaines et surtout pour son humour corrosif et sa générosité.
- A **Jean**, pour mon dernier surnom en date et pour son aide dans le labyrinthe obscur de l'administration de l'ENVA (je pense à une certaine 305 en ruine).
- A **Muriel**, une directrice de thèse à en faire baver de jalousie tout doctorant digne de ce nom, qui a su être à la fois disponible et efficace, enseigner tout en restant à l'écoute, travailler avec sérieux et humour, qui a toujours tiré le bon côté des choses et qui m'a appris à croire en ce que je faisais. J'espère devenir un jour une chercheuse et une femme de sa trempe. Merci pour ces trois années d'amitié et de travail réunis.

A tous ceux qui sont passés dans l'équipe :

- A **tous les stagiaires** : Benjamin, Virginie, Mathieu, l'incroyablement efficace Delphine, Franck le funambule, Violaine ma «successeuse», et Sébastien le roi de l'informatique. J'espère avoir répondu à leur attente de « maître de stage auxiliaire ».
- A **Taoufik**, pour notre premier article et pour sa gentillesse permanente.
- A **Renaud**, mon grand frère de thèse, pour son humour pétillant et pour cette inoubliable découverte du Cantal.
- A **Maria**, qui est devenue une véritable amie, dont la présence manque encore dans ce bureau et dont le passage dans l'unité marque les meilleurs moments de ces années de thèse.

A tous les membres de l'UMR BIPAR :

- **Au Docteur Pascal Boireau** pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR, pour son écoute attentive et sa gentillesse.
- **A Adélaïde et Mélanie**, des thésardes de «compét.».
- **A Jacques** (de nouveau) pour avoir planté une forêt phylogénétique un vendredi soir de septembre.
- **A Christine**, un brillant modèle que j'ai essayé de suivre.
- **Au Professeur René Houin** pour m'avoir conseillée avec patience et générosité au tout début de mes travaux et pour m'avoir guidée vers la fonction de moniteur d'enseignement.
- A tous ceux qui m'ont aidé et soutenue : Manjula, Danielle, Madeleine, Patricia, Ambre, Sébastien, René, Karine, qui a mis des couleurs dans cette thèse ! et les autres...

Aux membres de l'équipe d'épidémiologie animale de l'INRA de Clermont Ferrand Theix

- **A Gwenaël** pour cette collaboration fructueuse, tant du point de vue professionnel qu'humain. In the name of ticks, il ne faut pas en rester là !
- **A Michelle** pour les bons moments partagés à Narbonne.
- **A Jacques et Valérie** pour leur accueil toujours chaleureux.
- **A Chloé** pour cette mémorable semaine de congrès à Neuchâtel.
- **Aux membres du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne :**
 - **A Jean-Jacques Godon, Patrick Dabert et Valérie** pour avoir pris le temps de nous enseigner le décryptage des pleins et des déliés des courbes de SSCP avec une disponibilité et une patience incroyables.
 - **A Antonia et Fabien du CNAM** pour m'avoir initiée à l'art de la TTGE.
 - **A Bruno Chomel** pour ses judicieux conseils.
 - **A Jean-Marc Rolain** pour avoir aimablement fourni de l'ADN de *Rickettsia*.
 - **A tous les «captureurs» de tiques** et autres bêtes patibulaires qui nous sont arrivées, parfois par la poste, de tous les coins du monde.
 - **A tous les étudiants de Licence STAPS** de l'UVSQ pour avoir accueilli mes cours d'anatomie avec autant d'enthousiasme.

A tous ceux qui m'ont entourée :

- **A ma mère**, pour tout évidemment, et plus spécifiquement pour les corrections attentives de coquilles oubliées.
- **A ma sœur** pour être ma sœur.

- **A la famille Leduc**, pour son soutien et sa gentillesse à toute épreuve.

- **A tous les amis** qui ont vécu, supporté et soutenu les hauts et les bas de mes états d'âme d'apprentie chercheuse.

- **A Frédéric**, toujours présent, qui a partagé ces années de thèse avec une patience infinie.

Résumé :

Détection de bactéries pathogènes dans leur vecteur, les tiques dures (Acarien : Ixodidae)

Les tiques sont des arthropodes hématophages impliqués dans la transmission de nombreux agents, bactériens, viraux, et protozoaires, pathogènes pour l'Homme et l'animal. Les maladies à tiques sont potentiellement émergentes dans la plupart des pays d'Europe. Or, la première étape pour évaluer le risque de contracter une maladie à transmission vectorielle dans une région donnée est de connaître la prévalence de l'agent responsable dans son vecteur dans cette zone. Dans ce contexte, les techniques moléculaires de détection de l'ADN des agents pathogènes constituent des outils rapides et sensibles.

L'objectif de cette étude est, d'une part, d'étudier le portage d'agents pathogènes bactériens par les tiques *Ixodes ricinus* en milieu naturel afin d'évaluer le risque de transmission de ces agents, et d'autre part d'adapter des techniques de biologie moléculaire innovantes à l'étude du portage bactérien par les tiques.

Nous avons tout d'abord mis au point une technique d'extraction d'ADN à partir des tiques adaptée à la détection d'ADN d'agents pathogènes dans les tiques. Nous avons ensuite détecté l'ADN de *B. burgdorferi* sI, *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp. dans une cohorte de tiques *I. ricinus* collectées en Auvergne et montré la réalité du risque de transmission de ces trois bactéries. Nous avons montré que leur portage était dépendant de facteurs comme l'habitat de la tique, mais aussi son stade ou son sexe. Nous avons également évalué le rôle des tiques comme vecteur potentiel des bactéries du genre *Bartonella* en France et montré l'implication probable d'autres arthropodes hématophages, les hippoboscidés, dans la vectorisation des *Bartonella* infectant les ruminants.

Enfin, nous avons développé une nouvelle stratégie d'étude du portage de bactéries par les tiques en utilisant la PCR universelle-TTGE. Cette technique nous a permis, d'une part de détecter en une seule étape l'ADN de *B. burgdorferi* sI, *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp. dans des extraits d'ADN de tiques, et d'autre part de mettre en évidence dans ces extraits, la présence d'ADN de nombreuses bactéries dont l'association avec les tiques n'avait encore jamais été démontrée. Quatre groupes de séquences ont été identifiés : des séquences appartenant à des bactéries de l'environnement (*Mycobacterium* sp. etc.), des séquences de bactéries symbiontes (*Coxiella* sp., *Spiroplasma* sp.), des séquences de bactéries pathogènes vectorisées par les tiques (*B. burgdorferi*, *Ehrlichia* sp., *Rickettsia* sp., *A. phagocytophilum* etc.) et des séquences sans corrélation phylogénétiques proches. Cette technique offre des perspectives prometteuses en permettant d'associer un volet d'écologie microbienne à la détection d'agents pathogènes dans les tiques.

Mots clés : Tique, bactéries, ADN, détection moléculaire, épidémiologie

Abstract

Detection of bacterial pathogens in their arthropod vector, hard ticks (Acari: Ixodidae)

Ticks are hematophagous arthropods, able to transmit a wide spectrum of bacterial, viral and protozoan pathogens to humans and animals. Tick-borne diseases are considered as potentially emerging diseases in Europe. The first step for arthropod-borne disease risk assessment in a particular area is the detection of the responsible agent within its vector in that area. In this context, techniques for the molecular detection of pathogen DNA are reliable tools.

The aim of this work is to study the carriage of tick-borne bacterial pathogens by *Ixodes ricinus* ticks in field conditions in order to evaluate their risk of transmission and to use innovating molecular biology tools to better understand bacterial carriage.

We set up an efficient and reliable technique for DNA extraction from ticks. This allowed us to detect DNA from *B. burgdorferi* s.l, *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp. in *I. ricinus* ticks collected in the field in the Auvergne area and to demonstrate the transmission risk existing in this area. Moreover, we showed variability between life cycles of the three bacteria, depending on tick habitat, as well as tick gender and stage. We showed that ticks could be involved in the transmission of *Bartonella* sp. in France and that Hippoboscidea flies were also very probably involved in the transmission of these bacteria to ruminants.

Further, we developed new strategies for the study of tick-infecting bacteria using "broad range PCR-TTGE". This technique allowed us to detect *B. burgdorferi* s.l, *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp. in *I. ricinus* ticks in a single-step. Moreover, it allowed us to detect DNA from other tick-infecting bacteria whose presence had never previously been associated with ticks. Four bacterial groups were identified: environmental bacteria (*Mycobacterium* sp. etc.) symbiotic bacteria (*Coxiella* sp., *Spiroplasma* sp.), tick-borne pathogenic bacteria (*B. burgdorferi*, *Ehrlichia* sp., *Rickettsia* sp., *A. phagocytophilum* etc.) and non-identified bacteria. This technique offers new opportunities for the detection of bacterial pathogens in ticks in the context of their natural ecology.

Key words: Ticks, bacteria DNA molecular detection, epidemiology

Table des matières

INTRODUCTION ET OBJECTIFS	11
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I Données bibliographiques générales sur les <i>Ixodidae</i>	13
I.1 Systématique et Anatomie générale.....	13
1 Systématique.	13
2 Morphologie et Anatomie générale des <i>Ixodidae</i>	14
I.2 Tiques présentes en France métropolitaine	15
1 <i>Ixodes</i> spp.	15
2 <i>Rhipicephalus</i> spp.	16
3 <i>Dermacentor</i> spp.	16
4 <i>Haemaphysalis</i> spp.	16
5 <i>Hyalomma</i> spp.	16
I.3 Ecologie et cycle biologique des <i>Ixodidae</i>	18
1 Cycle de développement des <i>Ixodidae</i>	18
2 Cycles parasites.	19
3 Recherche d'un hôte	20
4 Attachement et nutrition	22
I.4 Pouvoir pathogène propre des tiques	23
I.5 Contrôle des populations de tiques	23
I.6 Techniques de collecte des tiques dures	24
II Le rôle de vecteurs des tiques dures	24
II.1 Aspects épidémiologiques généraux de la transmission d'agents pathogènes par les tiques.....	25
1 Influence du mode d'acquisition de l'agent pathogène	25
2 Interaction entre agents pathogènes et vecteurs	26
3 Transmission des agents pathogènes à l'hôte	26
4 Répartition géographiques des zoonoses transmises par les tiques	28
5 Les bactéries considérées comme symbiontes de tiques	29
II.2 Principales bactéries pathogènes transmises par les tiques	31
1 Agents pathogènes dont la transmission par les tiques est avérée	32
2 Agents pathogènes dont la transmission par les tiques est suspectée : le cas de <i>Bartonella</i> sp.	56
3 Co-infections par plusieurs agents pathogènes chez les tiques et leurs hôtes	60
III Outils de détection moléculaire des bactéries pathogènes dans leur vecteur	61
III.1 Famille des Anaplasmataceae	62
1 Amplification de tous les représentants des Anaplasmataceae	62
2 <i>Ehrlichia</i> spp.	63
3 <i>Anaplasma</i> spp.	63
III.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	64
III.3 <i>Rickettsia</i> spp.	65
III.4 <i>Coxiella burnetii</i>	65
III.5 <i>Francisella tularensis</i>	65
III.6 <i>Bartonella</i> spp.....	66
III.7 Détection de plusieurs agents pathogènes dans les tiques	66
1 PCR à large spectre	66
2 Puces à ADN	66
3 PCR multiplexe	67
III.8 Bilan sur la détection moléculaire de bactéries pathogènes dans les tiques	67

ETUDE EXPERIMENTALE CHAPITRE 1 : PORTAGE D'AGENTS PATHOGENES BACTERIENS PAR LES TIQUES <i>IXODES RICINUS</i> EN MILIEU NATUREL	71
I Introduction	71
II Mise au point des techniques de détection : extraction d'ADN total à partir des tiques :	72
II.1 Introduction.....	72
II.2 Article 1: "Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks"	72
II.3 Bilan de la mise au point de la technique d'extraction d'ADN à partir des tiques.....	73
III Détection de <i>Bartonella</i> sp. dans des tiques <i>I. ricinus</i>	74
III.1 Contexte et objectif	74
III.2 Article 2 : "Evidence of <i>Bartonella</i> sp. in questing adult and nymphal <i>Ixodes ricinus</i> ticks from France and co-infection with <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato and <i>Babesia</i> sp.".....	74
III.3 Bilan de la détection d'ADN de <i>Bartonella</i> sp. dans les tiques	75
IV Etude épidémiologique du portage d'agents pathogènes bactériens par <i>Ixodes ricinus</i> dans les Combrailles.	76
IV.1 Contexte et objectif	76
IV.2 Echantillonnage, matériel et méthode	77
1 Zone d'étude	77
2 Tiques	77
3 Extraction d'ADN et contrôle de l'extraction	78
4 Amplification par PCR spécifique de l'ADN des bactéries pathogènes	78
5 Séquençage et analyse des séquences	79
6 Analyses statistiques	79
IV.3 Résultats.....	80
1 Résultats bruts des PCR et analyses des séquences	80
2 Analyse des taux de portage	82
IV.4 Discussion	86
IV.5 Article 3 : Prevalence of <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia</i> sp and <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato DNA in questing <i>Ixodes ricinus</i> ticks from France	91
V Conclusion du premier chapitre	97
ETUDE EXPERIMENTALE CHAPITRE 2 : NOUVELLES APPROCHES MOLECULAIRES POUR L'ETUDE DU PORTAGE BACTERIEN PAR LES TIQUES	99
I Introduction et principe général	99
II Utilisation de la PCR universelle-TTGE pour la détection de plusieurs bactéries pathogènes dans les tiques <i>I. ricinus</i> :	100
II.1 Introduction.....	100
II.2 Article 4 : Use of Broad-Range PCR-TTGE for Detection of Bacterial Pathogens in Ticks in a Single Step.....	100
II.3 Bilan de la mise au point de la détection de plusieurs bactéries pathogènes dans les tiques par PCR universelle-TTGE	116
II.4 Comparaison des résultats de PCR spécifique et de PCR universelle-TTGE pour une cohorte d'échantillons.	116
II.5 Application de la PCR universelle-SSCP à l'étude du portage de bactéries pathogènes par les tiques.	118
II.6 Bilan de la détection de bactéries pathogènes dans leur vecteur par PCR universelle-TTGE	119

III	Analyse de la diversité de la flore bactérienne des tiques par PCR universelle –TTGE	120
III.1	Matériel et méthode.....	121
1	Echantillons de tique étudiés	121
2	ADN bactérien	121
3	PCR universelle-TTGE	122
4	Séquençage et Analyse des séquences	122
III.2	Résultats.....	123
1	Mise au point des conditions de migration	123
2	Profils de migration	124
3	Séquences des bandes	125
III.3	Bilan de l’analyse de la diversité de la flore microbienne des tiques	133
IV	Conclusion du deuxième chapitre	138
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	140
	BIBLIOGRAPHIE	142
	TABLE DES ILLUSTRATIONS	161
	ANNEXES	168
	ANNEXE 1 : COUPLES D’AMORCES UTILISES AU COURS DE CETTE ETUDE	169
	ANNEXE 2 : ARTICLE 5 : <i>HIPPOBOSCIDAE</i> FLIES AS POTENTIAL VECTORS OF <i>BARTONELLA</i> SPP. INFECTING WILD AND DOMESTIC RUMINANTS.	169
	ANNEXE 3 : ARTICLE POINT VETERINAIRE : LA BORRELIOSE DE LYME CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT.	169
	ANNEXE 4 : ARTICLE POINT VETERINAIRE : LES EHRlichioses FELINES : DES BACTERIOSES EMERGENTES.	169
	ANNEXE 5 : APPLICATION DE LA PCR UNIVERSELLE-SSCP A LA DETECTION DE BACTERIES PATHOGENES DANS LES TIQUES	170

Introduction et objectifs

En 1969, William H. Stewart, un chirurgien général New Yorkais affirmait : " Le temps est venu de fermer le livre des maladies infectieuses". A la fin des années 60, le développement de l'antibiothérapie, l'avènement des antiviraux et les progrès toujours croissant de la médecine, offraient au monde des promesses de vie éternelle. Mais la nature est ainsi faite que rien ne peut jamais être considéré comme acquis, et, aujourd'hui, les paroles de monsieur Stewart semblent résolument optimistes et présomptueuses. Dès 1980, la pandémie du SIDA étale son spectre à travers le monde ; des épidémies localisées d'infection par le virus Ebola concourent à créer un climat généralisé d'inquiétude, et l'apparition de plus en plus fréquente d'antibiorésistance redonne aux bactéries le potentiel morbide qu'on leur croyait perdu. A l'aube du troisième millénaire, les épidémies de SARS et de grippe aviaire laissent penser que les microorganismes infectieux ont encore de longues années devant eux. Le mot d'ordre est maintenant de «s'attendre à l'inattendu » (Martha Granström, Karolinska hospital, Stockholm, citation orale troisième congrès de l' «European Society for Emerging Infections») et le concept d'émergence est devenu un maître mot.

Parmi les maladies potentiellement émergentes, celles transmises par les arthropodes, en particulier les tiques, sont très nombreuses. Les tiques sont des arthropodes hématophages dont il existe plus de 860 espèces ou sous-espèces parasitant toutes les classes de vertébrés, dans pratiquement toutes les régions du globe. Si le rôle de parasite des tiques était déjà connu dans l'antiquité comme en témoignent les écrits d'Homère et d'Aristote, la première démonstration de leur capacité à transmettre des maladies infectieuses n'eut lieu qu'à la fin du 19^{ième} siècle, quand Smith et Kilbourne démontrèrent que *Boophilus annulatus* transmettait *Babesia bigemina*, l'agent de la fièvre bovine texane. Par la suite, au cours du 20^{ième} siècle, les tiques se sont révélées être impliquées dans la transmission de nombreux agents, viraux, protozoaires et bactériens, pathogènes pour l'homme et l'animal. Les maladies bactériennes transmises par les tiques ont notamment une grande importance médicale, comme la borréliose de Lyme due à *Borrelia burgdorferi*, actuellement considérée comme la plus importante des maladies vectorisées par les tiques dans l'hémisphère nord, décrite dans les années 80, ou plus récemment, un grand nombre

de rickettsioses émergentes ou encore les bactéries du genre *Ehrlichia* (Parola et Raoult, 2001). Il reste encore de nombreuses inconnues ; par exemple, les tiques sont soupçonnées d'être impliquées dans le cycle de transmission de certaines bactéries du genre *Bartonella* mais aucune preuve formelle n'a pu être avancée jusqu'à présent.

Chaque espèce de tique dépendant d'un biotope particulier, celui-ci détermine la distribution géographique des différentes espèces de tiques. De ce fait, il existe des « zones à risque » pour les maladies transmises par les tiques. Or, on assiste actuellement à des modifications en profondeur des écosystèmes qui découlent notamment des activités humaines ou des changements climatiques. Ces modifications environnementales peuvent conduire à des modifications de la répartition des arthropodes et sont couramment associées à l'émergence de maladies (Morse, 1995).

Il faut noter également que de nombreux cas d'infections concomitantes à plusieurs agents vectorisés par les tiques ont été décrits chez l'Homme et les autres mammifères d'une part et chez les tiques d'autre part, évoquant l'existence de complexes de maladies infectieuses transmises par les tiques. Ces co-infections pourraient expliquer les formes pathologiques atypiques de certaines affections et la résolution incomplète des symptômes après traitement. Toutefois, les données sur l'importance de ces co-infections chez les tiques en milieu naturel et sur leur relation avec des cas de co-infections humaines ou animales font défaut. Il est nécessaire d'évaluer leurs impacts pour connaître le risque réel lié à un agent infectieux.

Dans cette étude nous nous intéresserons en particulier au portage d'agents pathogènes bactériens par les tiques dures (*Ixodidae* ou Ixodidés). De nombreux attributs de cette famille rehausse en effet leur potentiel vecteur, et qui plus est, de vecteur de zoonoses, leur octroyant le rôle de « passeur » de la barrière d'espèce. L'objectif de ce travail de thèse est d'améliorer les connaissances que l'on a du risque de transmission des maladies bactériennes à tiques. Pour cela nous nous proposons tout d'abord (1) d'étudier le portage de plusieurs agents pathogènes bactériens par les tiques dures en milieu naturel, afin d'évaluer les facteurs de risque de transmission de ces agents, et (2) d'adapter des techniques de biologie moléculaire innovantes à l'étude du portage de bactéries pathogènes par les tiques.

Etude Bibliographique

I Données bibliographiques générales sur les *Ixodidae*

I.1 Systématique et Anatomie générale

1 Systématique.

Les tiques appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, à la sous-classe des Acariens et à l'ordre des Ixodida (voir tableau 1). Il existe 3 familles de tiques : les *Ixodidae* ou tiques dures (694 espèces), les *Argasidae* ou tiques molles (177 espèces) et les *Nuttalliellidae* (1 seule espèce).

Dans la classification la plus couramment utilisée, les *Ixodidae* sont divisés en deux groupes majeurs : les Prostriata et les Metastriata et les *Argasidae* sont divisés en deux sous-familles, les *Argasinae* et les *Ornithodorinae* (Hoogstral et Aeschlimann, 1982).

Embranchement	Sous-Embranchement	Classe	Sous Classe	Ordre	Familles	Groupes Sous-Familles	Genres
Arthropode	Chélicérate	Arachnides	Acarien	Ixodida	Argasidae	<i>Argasinae</i>	<i>Argas</i>
						<i>Ornithodorinae</i>	<i>Ornithodoros</i> <i>Otobius</i> <i>Antricola</i> <i>Nothoaspis</i>
					Nuttalliellidae		<i>Nuttalliella</i>
					Ixodidae	Prostriata	<i>Ixodes</i>
						Metastriata	<i>Amblyomma</i> <i>Aponomma</i>
<i>Hyalomma</i> <i>Cosmiomma</i> <i>Dermacentor</i> <i>Rhipicentor</i> <i>Anomalohimalaya</i> <i>Nosomma</i> <i>Rhipicephalus</i> <i>Boophilus</i> <i>Margaropus</i> <i>Haemaphysalis</i>							

Tableau 1 : Classification des tiques selon Hoogstral et Aeschlimann 1982

Les tiques seraient apparues il y a environ 225 millions d'années, à une époque où elles parasitaient exclusivement les reptiles et ont subi depuis une longue évolution (Klompfen *et al.*, 1996). Récemment, l'analyse de séquences géniques de l'ADN ribosomal nucléaire ou mitochondrial (ADNr 16S, ADNr 18S et ADNr 12S) a permis d'établir les lignées phylogéniques des tiques (Black et Piesman, 1994, Black *et al.*, 1997). Dans cette étude

nous nous intéresserons exclusivement à la famille des *Ixodidae* à laquelle différents attributs biologiques confèrent un important potentiel vecteur.

2 Morphologie et Anatomie générale des Ixodidae

Les tiques dures sont des acariens de grande taille (entre 2 et 30 mm selon la stase et la réplétion) au corps globuleux. Le mâle est de taille inférieure à la femelle. La partie antérieure du corps, le gnathosoma, comprend le capitulum, de forme rectangulaire ou hexagonale, qui constitue la zone de liaison au corps, et le rostre qui regroupe les pièces buccales (Fig. 1). Ces pièces buccales comprennent les pédipalpes qui ont une fonction sensitive, les chélicères, organes perforateurs, et un organe immobile médian et ventral, l'hypostome constitué de nombreuses dents incurvées qui permet d'ancrer fermement la tique à la peau de son hôte (Bussieras et Chermette, 1991 ; Estrada-Pena *et al.*, 2004). Les Ixodidés portent un écusson dorsal chitineux très dur, le scutum. Le reste du corps est recouvert d'un tégument extensible qui se distend lors du repas sanguin. Le scutum recouvre l'intégralité de la surface dorsale chez le mâle, alors que seule la partie antérieure est recouverte chez la femelle lui permettant de décupler son volume lors du repas.

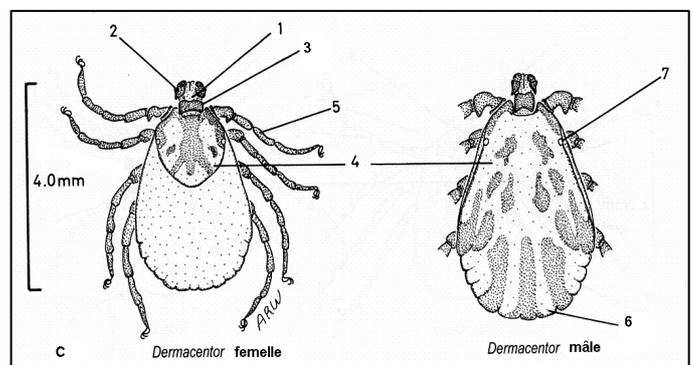
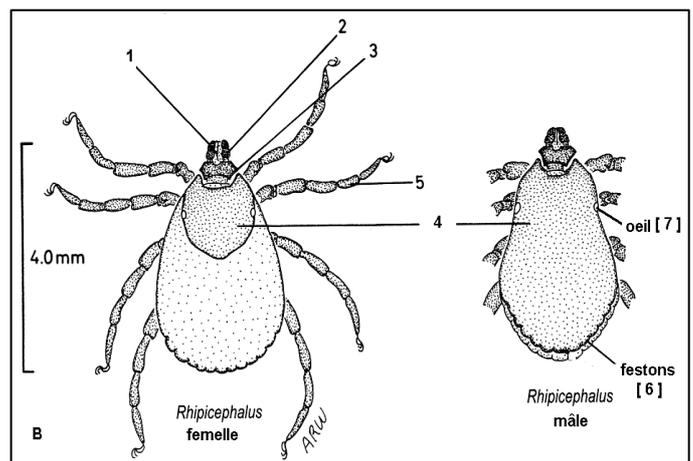
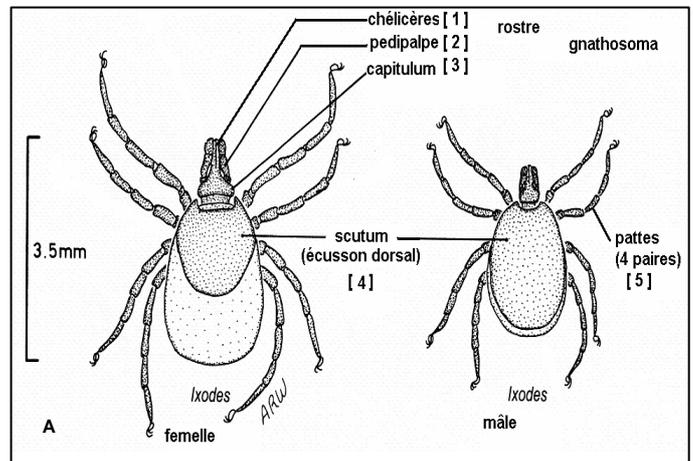


Figure 1 : représentation schématique des tiques *Ixodes* sp., *Rhipicephalus* sp. et *Dermacentor* sp. femelle et mâle en vue dorsale (d'après Estrada-Pena *et al.*, 2004)

L'identification des Ixodidés s'établit à partir de l'étude de structures morphologiques. Elle est largement orientée par la connaissance de l'hôte d'accueil et la provenance géographique de la tique. De manière grossière, la première clé d'identification repose sur l'observation, en face ventrale, du sillon péréal. Chez les *Prostriata*, dont *Ixodes* sp. est le seul genre, le sillon péréal contourne l'anus cranialement, tandis que chez les *Metastriata*, le sillon péréal contourne l'anus caudalement. La longueur du rostre et la forme du capitulum sont ensuite les caractères principaux qui permettent d'identifier un genre (Fig. 2).

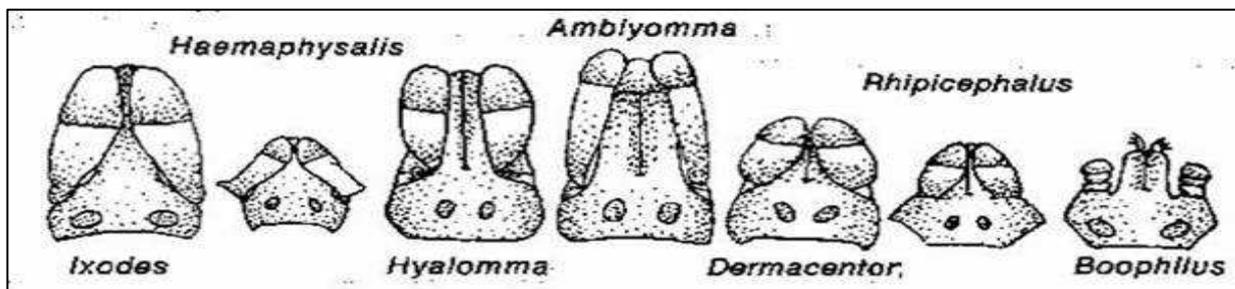


Figure 2 : représentation schématique des rostres et capitulum des principaux genres d'Ixodidés (d'après George, 2005)

I.2 Tiques présentes en France métropolitaine

En France, on retrouve environ 25 espèces appartenant à cinq genres principaux de la famille des Ixodidés. La présence d'autres espèces ponctuellement introduites à la faveur d'un déplacement de leur hôte vertébré, notamment des oiseaux migrateurs, ne peut être exclue. De même, les modifications climatiques pourront dans les années à venir modifier la distribution des tiques en France. (Bussieras et Chermette, 1991 ; Estrada-pena *et al.*, 2004). La figure 3 présente les cartes de répartition supposée de ces espèces au sud de l'Europe (Estrada pena *et al.*, 2004).

1 *Ixodes* spp.

Il existe environ 140 espèces de tiques du genre *Ixodes*. Le principal représentant en Europe occidentale est *I. ricinus* qui est une tique exophile, aux hôtes et habitats variés. Il s'agit également de l'espèce de tique dure la plus représentée en France et en Europe de l'Ouest (Sanogo *et al.*, 2003b). Une douzaine d'autres espèces appartenant au genre *Ixodes*

existent sur le territoire français. Les plus fréquemment rencontrées sur plusieurs classes de mammifères, notamment domestiques, sont *I. (Pholeoixodes*) hexagonus*, et dans une moindre mesure, *I. (Pholeoixodes) canisuga* et *I. ventalloi*. Les autres espèces d'*Ixodes* sont souvent moins connues. Elles ont une biologie très spécialisée et sont inféodées aux terriers ou aux nids de leurs hôtes. Trois d'entre elles, *I. (Ceraticoxodes) uriae*, *I. (Scaphixodes) rotschildi* et *I. (Scaphixodes) unicavatus* parasitent exclusivement les oiseaux marins ; d'autres espèces sont spécifiques d'oiseaux de terre comme *I. (Pholeoixodes) arboricola*, *I. frontalis* ou *I. lividus*. *I. (Scaphixodes) simplex* et *I. (Eschatocephalus) vespertilionis* parasitent les chiroptères ; *I. (Exopalpiger) tiranguliceps*, *I. acuminatus*, *I. aprophorus* et *I. (Pholeoixodes) rugicollis* parasitent les petits mammifères sylvoles, rongeurs et mustélidés.

2 *Rhipicephalus spp.*

Le principal représentant du genre est la tique brune du chien, *R. sanguineus*, qui colonise principalement le pourtour méditerranéen mais qui peut être retrouvée au nord du pays dans des chenils. *R. bursa*, est présente au sud de la Loire. *R. pusillus* et *R. turanicus* colonisent la région méditerranéenne.

3 *Dermacentor spp.*

Les deux espèces du genre *Dermacentor* présentes sur le territoire français sont *D. reticulatus* et *D. marginatus*.

4 *Haemaphysalis spp.*

H. punctata et, dans une bien moindre mesure, *H. concinna*, *H. hispanica* et *H. inermis* sont présentes en France.

5 *Hyalomma spp.*

H. marginatum marginatum, peut être retrouvée de manière sporadique sur le territoire français. Une seconde espèce *Hyalomma detritum scupense* serait présente sur la cote Atlantique (Boussieras et Chermette, 1991).

* Les noms entre parenthèse correspondent à d'anciennes dénominations qui caractérisent des sous-groupe d'*Ixodes*

Au cours de cette étude, nous porterons en particulier notre attention sur les tiques de l'espèce *I. ricinus*. En effet, outre le fait que cette espèce compte parmi les espèces les plus répandues en Europe de l'ouest, il s'agit également de l'espèce la plus impliquée dans la transmission de zoonoses bactériennes en raison de caractéristiques propres de son cycle parasitaire (Sanogo *et al.*, 2003).

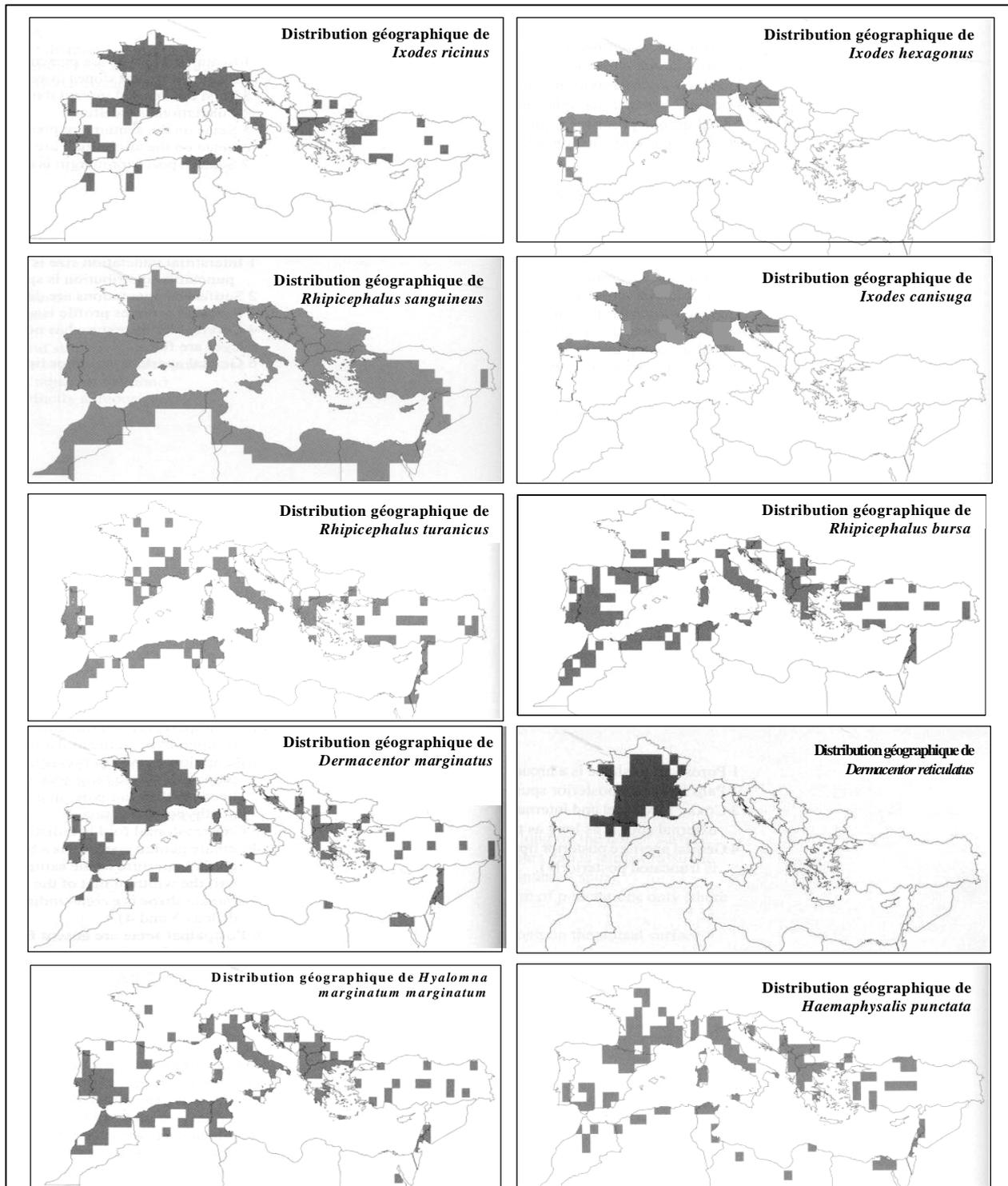


Figure 3 : Distribution géographique sur le pourtour méditerranéen des principales espèces de tiques présentes en France (d'après Estrada pena *et al.*, 2004)

I.3 Ecologie et cycle biologique des Ixodidae

1 Cycle de développement des Ixodidae

Le cycle évolutif des tiques dures comporte 3 stades biologiques, encore appelés stases : larvaire, nymphal(e) et adulte (Fig 4). Chaque stase est séparée par un repas sanguin qui peut durer plusieurs jours et qui est suivi d'une mue.

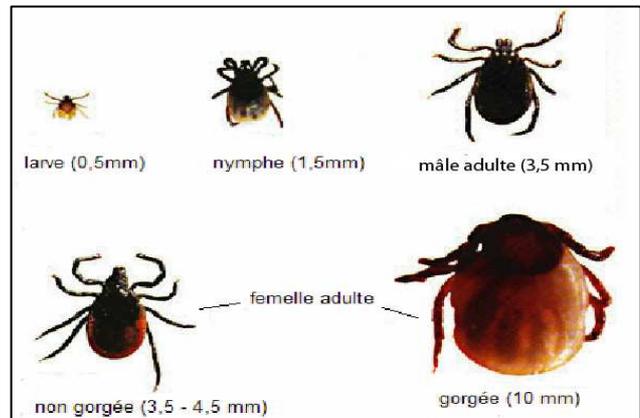


Figure 4 : Les différents stades évolutifs
chez *I. ricinus* (Photo: Dr. Gabazzi)

L'accouplement a lieu sur l'hôte pour la plupart des espèces d'Ixodidés. Les adultes mâles se nourrissent peu et brièvement, voire pas du tout, comme chez *I. ricinus*. La femelle se gorge pendant plusieurs jours (7 à 13 jours chez *I. ricinus*). Une fois repue, elle se détache de l'hôte et cherche un endroit ombragé pour effectuer sa ponte (environ 2000 œufs chez *I. ricinus*) et mourir. Des larves hexapodes éclosent après une incubation d'environ un mois, partent en quête d'un hôte sur lequel elles se nourriront quelques jours avant de se détacher et de chercher une zone de mue pour se transformer en nymphe octopode. La nymphe, à son tour, se nourrira sur un nouvel hôte, subira une mue et donnera un adulte mâle ou femelle.

Le cycle de vie des *Ixodidae* dure de 6 mois à 6 ans avec une durée moyenne d'environ 2 à 3 ans. Les variations de durées découlent des conditions environnementales comme la température, l'humidité relative, et la photopériode. Les tiques dures sont notamment très sensibles à la dessiccation. Si les conditions climatiques ne sont pas favorables, la tique entre en diapause, un état caractérisé par une chute du métabolisme et un développement retardé. L'activité des *I. ricinus* est conditionnée par des températures comprises entre 7 et 25°C. Elles sont presque inactives pour les températures inférieures ou lorsque la chaleur est intense et l'hygrométrie basse. Dans le quart Nord-Est de la France, leur période d'activité s'étend de mai à octobre, avec une accalmie en juillet-août (George, 2005).

Chaque espèce de tique est caractérisée par un biotope et un environnement optimal qui lui sont propres et qui déterminent la distribution géographique des individus. *R. sanguineus* est, par exemple, bien adaptée à la végétation et aux conditions climatiques méditerranéennes. Elle est donc endémique dans la zone méditerranéenne et absente dans le Nord de l'Europe, sauf dans les maisons et les chenils, où les conditions lui permettent de survivre. *I. ricinus* préfère quant à elle les bois et les forêts avec une forte humidité relative. Elle est absente des zones sèches comme le pourtour méditerranéen en France.

2 Cycles parasites.

Suivant le nombre d'hôtes nécessaires au cycle de développement, on distingue 3 types de cycles parasites. Les mono, di ou triphasiques.

Dans les cycles monophasiques, tous les stades se succèdent sur un unique et même hôte vertébré. Dans les cycles diphasiques, les trois stades se déroulent sur deux hôtes : un premier hôte, où se développent la larve et la nymphe et un second, parasité par les adultes.

La plupart des espèces de tiques d'intérêt médical et vétérinaire, comme *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* ou *Dermacentor reticulatus* ont un cycle parasite triphasique. Dans les cycles triphasiques, les trois stades évolutifs parasitent trois hôtes différents. Le type de cycle parasite est caractéristique de l'espèce de tique (Bussieras et Chermette, 1991; Estrada Pena *et al.*, 2004).

On distingue des cycles triphasiques monotropes dans lesquels les trois hôtes font partie du même groupe zoologique. C'est le cas par exemple de *R. sanguineus* dont toutes les stases se nourrissent préférentiellement sur les chiens.

D'autres espèces de tiques ont des préférences de nutrition propres à chaque stade évolutif et la spécificité d'hôte varie entre les différentes stases dans la même espèce. Dans les cycles triphasiques ditropes, les stades immatures parasitent des micromammifères, les adultes, des carnivores ou des ongulés.

Enfin, certaines espèces ont une faible spécificité d'hôte. On parle alors de tiques télotropes. Ainsi les différentes stases d'*I. ricinus* (Fig 5) peuvent se nourrir sur plus de 300 espèces d'hôtes qui vont des oiseaux aux grands mammifères. Si les larves se nourrissent

de préférence (90 %) sur les micromammifères et les oiseaux de petite taille, les nymphes sont plus ubiquistes et se nourrissent indifféremment sur les petits et grands mammifères (ruminants sauvages ou domestiques) et ce sont elles qui sont les principaux vecteurs de maladies humaines à tiques. Les adultes, eux, se nourrissent de préférence sur des animaux de grande taille (Parola et Raoult, 2001, Estrada pena *et al*, 2004).

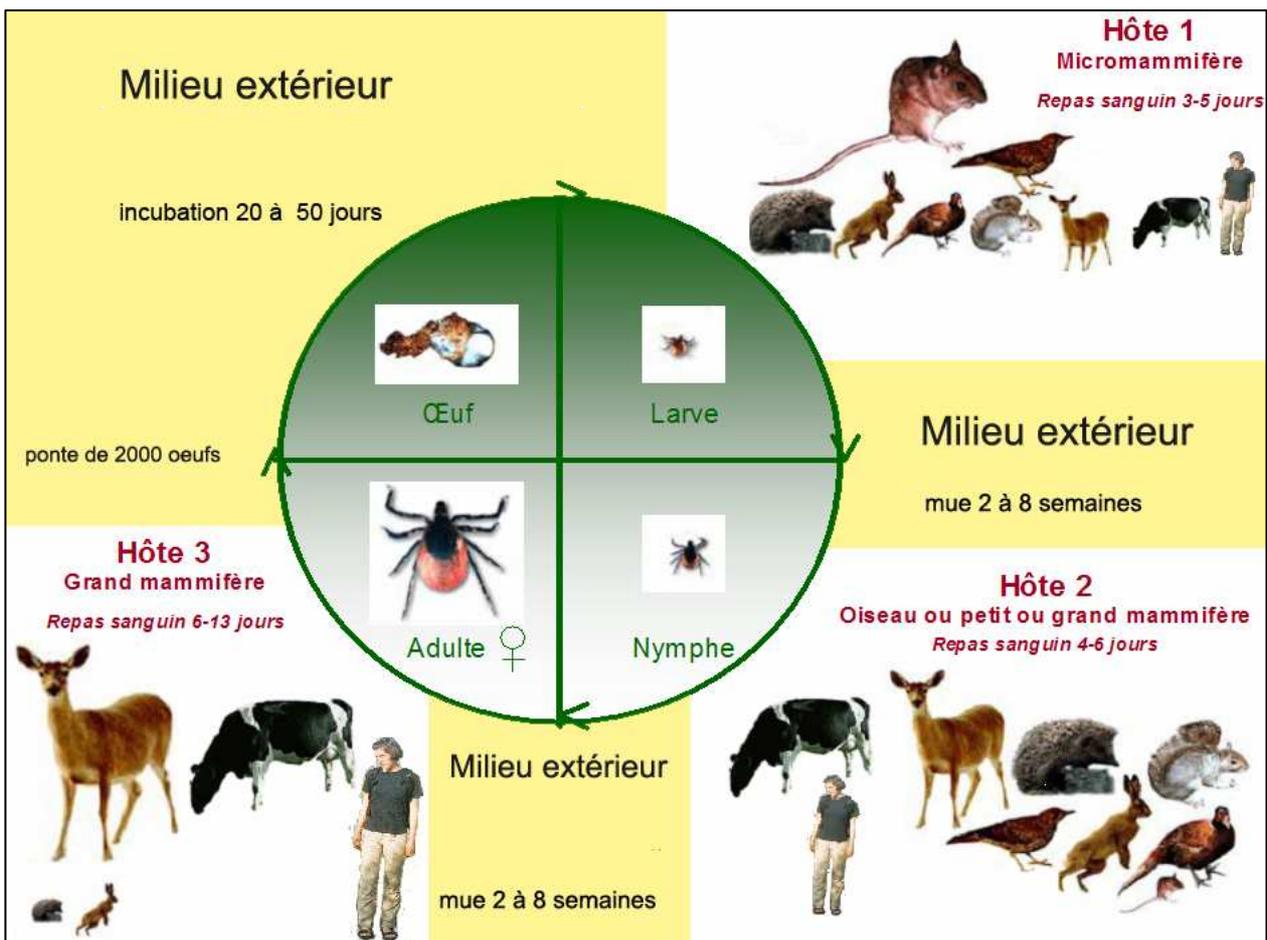


Figure 5 : cycle évolutif et hôtes préférentiels des différentes stases d'*I. ricinus*. Les zones de couleur jaune représentent les passages dans le milieu extérieur. La taille relative des différents hôtes représente la préférence alimentaire de la stase.

3 Recherche d'un hôte

Les tiques dures passent plus de 90% de leur temps en vie libre (Needham *et al.*, 1991).

La plupart d'entre elles sont, comme *I. ricinus*, exophiles. Ceci signifie qu'elles vivent dans des environnements ouverts, prairies ou forêts, où elles ont une activité saisonnière,

partant à la recherche d'un hôte quand les conditions environnementales sont les plus favorables. Dans cette optique, elles ont développé une stratégie de détection à distance, qui revêt la plus grande importance. Elles sont très sensibles à divers stimuli indiquant la présence de l'hôte (stimuli chimiques, vibrations de l'air, variation de température associée avec la présence d'un animal à sang chaud (Parola et Raoult, 2001).

Deux schémas comportementaux de recherche de l'hôte caractérisent les tiques exophiles (Estrada pena *et al*, 2004). Dans la stratégie la plus fréquente, dite « de l'affût », les tiques grimpent sur les parties supérieures de la végétation et attendent qu'un hôte passe, les premières pattes tendues dans le vide. C'est la stratégie adoptée par *R. sanguineus* et *I. ricinus* (fig 6) en Europe (Parola et Raoult, 2001 ; Estrada pena *et al*, 2004).



Figure 6 : Femelle *I. ricinus* pratiquant l'affût sur la végétation (photo : unité d'épidémiologie animale INRA clermont-Theix)

Dans la stratégie dite « de chasse », les tiques, comme *Amblyomma hebraeum* et *A. variegatum* en Afrique, attaquent leurs hôtes ; elles jaillissent de leur habitat et courent vers lui quand il passe à proximité. Certaines espèces utilisent les deux stratégies (Parola et Raoult, 2001 ; Estrada pena *et al*, 2004).

D'autres tiques, comme les *Ixodes* sp. du sous-groupe *pholeoixodes*, sont dites endophiles ou pholéophiles. Elles restent cachées dans les nids et terriers de leurs hôtes, attendant leur arrivée.

De nombreuses espèces de tiques sont « mixtes » ; elles sont pholéophiles aux stases larvaires et nymphales et exphophiles à la stase adulte. C'est par exemple le cas de *D. reticulatus* dont le cycle est alors caractérisé de pholéo-exophile.

On peut séparer les hôtes d'une tique en deux catégories. Les hôtes « de maintenance » sont ceux dont la présence est nécessaire à la survie d'une population de tiques. La sélection de ces hôtes dépend du type d'habitat qui doit être le biotope partagé par les tiques et ces hôtes. Leur variété est moins grande que celle des hôtes sur lesquels les tiques peuvent potentiellement se nourrir (Estrada Pena *et al*, 2004). Les hôtes accidentels sont ceux sur lesquels les tiques télotropes pourront se nourrir s'ils pénètrent

dans leur biotope. L'Homme, et bien souvent les animaux domestiques, appartiennent à cette catégorie (Estrada Pena *et al*, 2004).

4 Attachement et nutrition

Avant le repas, une tique se déplace sur son hôte pendant plusieurs heures à la recherche d'un site de fixation dans une zone de peau fine. Les sites d'attachement des tiques varient en fonction de la stase, de l'espèce et des hôtes. Sur les hommes, les sites préférentiels d'attachement sont la tête, le cou et l'aine. Sur les animaux, le fanon, l'aine, la mamelle et le scrotum portent les adultes d'espèces à hypostome long (*I. ricinus*, *Amblyomma* sp.). Les *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp. et *Haemaphysalis* sp. adultes se fixent plus fréquemment sur le pavillon auriculaire. Les stases immatures sont beaucoup plus ubiquistes.

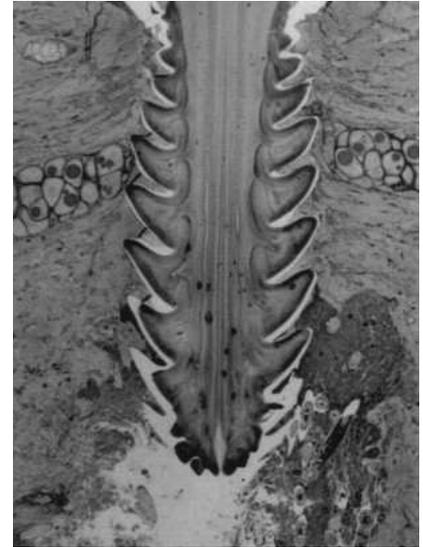


Figure 7 : Hypostome d'Ixodidé ancré dans la peau de son hôte. (Photo : Pr Aeschlimann)

Chez les oiseaux, les tiques sont, en général, fixées sur les tête ou à la base des ailes. Elles se trouvent au niveau des ceintures articulaires chez les lézards.

La fixation se fait en deux temps. Au cours de la première phase, mécanique, la tique perfore la peau grâce à ses chélicères puis insère son hypostome dans la plaie. Les dents de l'hypostome dirigées vers l'arrière assurent à la tique un ancrage solide dans les tissus (fig 7). La seconde phase est une phase chimique au cours de laquelle les glandes salivaires secrètent un liquide appelé ciment, permettant de renforcer la fixation de la tique, ainsi que des enzymes, des substances vasodilatatrices, anti-inflammatoires anticoagulantes immunosuppressives et protéolytique qui créent une « lacune de nutrition ». La présence d'une substance anesthésiante dans la salive de la tique rend la morsure indolore. (Parola et Raoult, 2001 ; Estrada pena *et al*, 2004).

Pendant les premières 24 à 36 heures d'attachement, la pénétration et l'attachement sont les activités prédominantes et il n'y a pas ou très peu d'ingestion de sang. Le risque de transmission d'agents pathogènes est très faible durant cette période (Parola et Raoult, 2001).

Contrairement à la plupart des autres arthropodes hématophages qui se nourrissent directement, la tique ne commence donc son repas qu'après 2 ou 3 jours. Les tiques dures se nourrissent pendant de longues périodes. En fonction du stade, de l'espèce, du type d'hôte et du site d'attachement, l'ingestion d'un repas sanguin complet nécessite de 2 à 15 jours. A une période initiale de nutrition lente (de 3 à 4 jours) succède une période d'engorgement rapide (1 à 3 jours) au cours de laquelle les tiques, en particulier les femelles, peuvent voir augmenter 120 fois le poids initial de leur corps.

I.4 Pouvoir pathogène propre des tiques

Chez l'animal, la fixation d'un grand nombre de tiques est à l'origine de cas d'anémies graves (Morel *et al.*, 2000). En outre, il arrive que l'attachement de tiques de certaines espèces provoque la paralysie de leur hôte (Dworkin *et al.*, 1999). Ceci est dû à la sécrétion de substances salivaires neurotoxiques par les femelles de plus de 40 espèces de tiques dont *I. ricinus* en Europe .

I.5 Contrôle des populations de tiques

Le contrôle des populations de tiques est extrêmement difficile à mettre en œuvre à grande échelle. Les techniques de lutte indirecte qui consistent à intervenir sur l'environnement naturel des tiques sont, soit difficiles à mettre en œuvre (débroussaillage, taille et traitement herbicide, drainage des aires humides), soit écologiquement inacceptables (réduction des populations d'hôtes). (Morel *et al.*, 2000, Parola et Raoult, 2001).

Les techniques de lutte directe, consistant à détruire la tique elle-même, à l'aide de moyens chimiques, mécaniques ou biologiques, sont limitées et peuvent également présenter des risques pour l'environnement (contamination environnementale et toxicité pour les animaux et les hommes). En médecine vétérinaire, le traitement acaricide des animaux pour limiter l'attachement des tiques est largement pratiqué dans les zones infestées. Mais il conduit à l'apparition de résistance et constitue une contrainte économique d'envergure (Willadsen, 2000 ; Morel *et al.*, 2000). Les méthodes de contrôle biologique comprennent le développement de prédateurs naturels (scarabées, araignées et fourmis)

des parasitoïdes comme les hyménoptères du genre *Ixophagus* et des bactéries pathogènes pour les tiques. Leur application est encore limitée (Parola et Raoult, 2001).

Enfin, une stratégie de lutte prometteuse, mais actuellement confinée à une seule espèce d'Ixodidé, consiste à utiliser un vaccin « anti-tique » dirigé contre des antigènes de l'intestin des tiques (Willadsen, 2000). L'application pratique de ce vaccin est actuellement limitée à la lutte contre *Boophilus microplus*, une tique du bétail, en Australie et dans certains pays d'Amérique centrale. Des recherches sont menées actuellement dans de nombreux laboratoires pour développer des vaccins contre *R. sanguineus*, ou *Ixodes* sp.. Parmi les molécules candidates, des antigènes sécrétés (antigènes salivaire ou du ciment) et internes (cellules digestives) sont à l'étude (Mather *et al.*, communication orale, 2005; Nutall *et al.*, communication orale, 2005).

I.6 Techniques de collecte des tiques dures

Les tiques peuvent être récoltées sur leur hôte lors de campagne de piégeage (notamment de micromammifères), ou au cours de leur vie libre, dans les terriers des hôtes pour les tiques endophiles, ou lors de leur « quête » d'hôte pour les tiques exophiles. Pour ces dernières, la technique de récolte la plus utilisée est la technique du drapeau. Elle consiste à draguer la végétation à l'aide d'une pièce de tweed blanc d'un diamètre fixé, appelé drapeau, qui fait office de leurre (Vassallo *et al.* 2000). Le drapeau est passé sur une tranche de végétation aux dimensions calibrées et les tiques sont récoltées à la pince dans les peluches du tissu et peuvent être immédiatement conservées dans l'éthanol. La capture « à vue » concerne essentiellement les adultes visibles en position d'affût. C'est une technique peu efficace.

II Le rôle de vecteurs des tiques dures

Nombre des caractéristiques des Ixodidés présentées jusqu'à présent rehaussent leur potentiel vecteur. Elles se nourrissent pendant de longues périodes et leur morsure indolore leur permet de passer inaperçues. Chaque stade évolutif ne se nourrit qu'une seule fois mais ce repas peut être pris sur une grande variété d'hôtes. Ce cycle biologique favorise donc la transmission des agents pathogènes de la tique à son hôte, mais aussi d'une espèce d'hôtes

à une autre. Et, de fait, les tiques dures sont les vecteurs d'un très grand nombre d'agents pathogènes qui pour la plupart sont agents de zoonoses. Le rôle des tiques dans la transmission de maladies infectieuses bactériennes est connu depuis la fin du 19^{ème} siècle et leur importance en santé publique n'a cessé de croître depuis les années 1980, date de la description de *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme. De nombreuses bactéries transportées par les tiques et considérées comme non pathogènes se sont révélées être impliquées dans des processus pathologiques. Les tiques sont considérées comme le second vecteur arthropode mondial de maladies infectieuses juste après les moustiques (Parola et Raoult, 2001). Nous verrons, dans un premier temps, les caractéristiques épidémiologiques générales qui gouvernent les modes de transmission et de propagation des affections transmises par les tiques en nous appuyant sur des exemples de bactéries, puis nous nous intéresserons aux principales bactéries pathogènes transmises par les tiques.

II.1 Aspects épidémiologiques généraux de la transmission d'agents pathogènes par les tiques

1 Influence du mode d'acquisition de l'agent pathogène

L'acquisition des agents pathogènes par une tique peut emprunter trois voies principales.

Tout d'abord une tique peut s'infecter lors de son repas sanguin. Il s'agit alors de transmission dite « horizontale ». La durée de l'attachement à l'hôte réservoir et donc du repas est déterminante pour que cette transmission soit efficace, la proportion de tiques qui s'infectent étant souvent directement proportionnelle au temps d'attachement (Piesman *et al.*, 1991).

Pour un même individu, la transmission peut également avoir lieu au cours de la mue, lors du passage d'un stade à l'autre. Elle est alors nommée transmission transstadiale. Ce mode de transmission doit nécessairement exister pour que la tique ait un rôle de vecteur puisqu'un seul repas sanguin est pris par stade évolutif. Les bactéries acquises pendant le repas ne pourront être transmises à un second hôte qu'une fois la mue effectuée et le stade suivant atteint.

Enfin, une femelle infectée peut, par transmission dite transovarienne, transmettre les agents pathogènes à sa descendance.

Pour certains agents pathogènes, toutes les voies de transmissions sont possibles. Dans ce cas, les tiques jouent alors, en plus du rôle de vecteur, celui de réservoir de la maladie. La distribution de la maladie sera intimement liée à celle de la tique en cause (Parola et Raoult, 2001).

Bien que cela soit anecdotique, il est possible pour les tiques de s'infecter par « co-nutrition » lors d'un repas à proximité sur le même hôte. L'agent pathogène peut être transmis d'une tique infectée à une tique saine sans infecter l'hôte (Randolph *et al.*, 1996). Enfin, pour certaines *Rickettsia* sp. et certaines *Borrelia* sp., agents de fièvres récurrentes, une transmission sexuelle lors de l'accouplement a été décrite (Raoult et Roux, 1997).

2 Interaction entre agents pathogènes et vecteurs

On ne sait que peu de choses sur les conséquences des infections au sein de la tique elle-même. Une baisse de fertilité et une plus grande mortalité ont été décrites chez des tiques infectées par *R. rickettsii* (Niebylski *et al.*, 1999). Il reste également à établir si les propriétés des agents pathogènes, en particulier leur virulence, évoluent lorsqu'elles infectent la tique. C'est par exemple le cas pour *R. rickettsii* qui perd sa virulence chez le cochon d'Inde si la tique est soumise à un stress physiologique (Raoult et Roux, 1997).

3 Transmission des agents pathogènes à l'hôte

Voies de transmission

Les tiques transmettent les agents pathogènes à leur hôte de différentes façons au niveau du site de nutrition. Les agents pathogènes peuvent être transmis via des sécrétions salivaires infectées ou si du contenu intestinal infecté est régurgité dans la lacune de nutrition ou si le site de nutrition est contaminé avec des fèces. Le risque de transmission augmente proportionnellement avec le temps d'attachement (Piesman *et al.*, 1991, Raoult et Roux 1997, Parola et Raoult, 2001).

La transmission peut également emprunter d'autres voies comme la contamination de muqueuses (peau scarifiée, yeux etc..) après écrasement ou manipulation de tiques infectées.

Le fait que la morsure de tique soit indolore rend les tiques, en particulier les stases immatures, pratiquement indétectables et dans les cas cliniques avérés de maladies transmises par les tiques, il arrive fréquemment qu'il n'y ait pas d'anamnèse de morsure de tiques (Parola et Raoult, 2001).

Compétence vectorielle

La compétence vectorielle est l'aptitude physiologique individuelle d'un vecteur à acquérir un agent pathogène et à le transmettre. La compétence vectorielle varie en fonction de nombreux facteurs qui découlent directement de la relation entre le vecteur et l'agent pathogène. Ainsi, par exemple, il semble que l'efficacité de transmission d'*Anaplasma phagocytophilum* par *Ixodes scapularis* soit plus faible que celle de *Borrelia* sp. (Des vignes et Fisch, 1997 ; Levin et Fish, 2000). Cependant, la compétence vectorielle des tiques par rapport aux différentes bactéries pathogènes vectorisées est en général mal connue d'autant plus que les études expérimentales de transmission sont le plus souvent réalisées avec des groupes de tiques plutôt que des individus seuls (Levin et Fish, 2000). Certaines protéines immunomodulatrices de la salive des tiques *I. ricinus* semblent favoriser la transmission de *B. burgdorferi* si chez la souris en inhibant la phagocytose des spirochètes et en accélérant la prolifération des bactéries dans la peau (Kopecky *et al.*, communication orale, 2005)

Facteurs favorisant l'établissement d'une maladie à tique

Le système épidémiologique d'une maladie à tiques, comme toute autre maladie vectorisée, dépend d'une triade « hôte, vecteur, agent pathogène » dont le "rendez vous" constitue le facteur de risque (Combes, 1995). Le taux d'infection des tiques, celui des hôtes réservoirs, et la densité de ces derniers, sont les variables majeures qui déterminent l'incidence d'une maladie à tiques dans une région donnée. Ces variables sont sous la dépendance complexe de nombreux facteurs physiologiques et écologiques incluant la

préférence d'hôtes, le degré de contact entre la tique et son hôte, la susceptibilité et l'immunité des hôtes, et les conditions environnementales (Parola et Raoult, 2001).

Les facteurs favorisant liés à la tique comprennent la densité des tiques et leur taux de portage de l'agent pathogène, leur capacité à se nourrir sur l'homme ou l'animal domestique et la prévalence de leur hôte habituel.

Les facteurs liés à l'homme ou l'animal domestique sont la fréquence d'entrée dans le biotope de la tique et la susceptibilité à l'infection. Le développement récent des activités de loisir en plein air est considéré comme un des facteurs majeurs expliquant l'augmentation de l'incidence des maladies à tiques humaines (Lane *et al.*, 2004 ; Parola, 2004).

Caractères zoonotiques des maladies à tiques

Les hommes sont la plupart du temps des hôtes accidentels pour les tiques et c'est à l'occasion de ce parasitisme aléatoire que se déclenche le cycle infectieux humain (Parola et Raoult, 2001). Le potentiel de vecteur de zoonose d'une espèce de tique est directement lié à son spectre d'hôte. Ainsi, *I. ricinus* qui est télotrope et anthropophile est davantage impliquée dans la transmission de maladies zoonotiques que *R. sanguineus*.

4 Répartition géographiques des zoonoses transmises par les tiques

Les hypothèses expliquant l'origine et la dissémination des zoonoses transmises par les tiques reposent principalement sur le concept de co-évolution du micro-organisme pathogène, de la tique et de l'animal hôte (Parola et Raoult, 2001). Ainsi, les maladies transmises par les tiques ont une détermination géographique et ne sévissent que dans les zones optimales pour le développement de la tique vecteur et des hôtes réservoirs nécessaires à la circulation de l'agent pathogène. Dans ce contexte précis, l'hôte et la tique sont soumis à des pressions de sélection qui conduisent à une co-évolution. Cette hypothèse s'appuie sur la distribution continentale de la plupart des maladies transmises par les tiques. C'est par exemple le cas des rickettsioses, *R. rickettsi* sévit en Amérique du nord, *R. conorii* est retrouvée de l'Europe du sud à l'Asie du sud l'Inde et l'Afrique (Raoult et Roux, 1997). C'est aussi celui de la borréliose de Lyme (Stanek et Steere, 2003).

Un certain nombre de facteurs, comme les macro-modifications climatiques, l'urbanisation et la déforestation, peut cependant modifier cette répartition. La dissémination des maladies transmises par les tiques implique obligatoirement la dispersion de la tique vectrice et/ou de l'hôte réservoir. Pour permettre la maintenance des infections dans de nouvelles régions, la tique et/ou l'hôte, doivent trouver respectivement des hôtes ou des tiques qui sont susceptibles de porter l'infection et qui peuvent assurer le maintien de l'organisme pathogène (Parola et Raoult, 2001).

Les tiques ne se déplacent pas au delà d'un rayon d'en moyenne 50 mètres mais peuvent être dispersées alors qu'elle sont attachées à l'hôte lors des déplacements de celui-ci. Suivant l'hôte, les distances parcourues peuvent être très grandes. C'est, en particulier le cas des oiseaux ou des mammifères migrateurs (Smith *et al*, 2004).

Les hommes peuvent aussi avoir une influence sur la dispersion des tiques en modifiant l'habitat des tiques ou par le transport d'animaux sur de longues distances. La dispersion de la fièvre à tique africaine à *Rickettsia africae* dans les Caraïbes est un exemple d'introduction anthropique d'une maladie dans une zone où elle était absente (Parola *et al.*, 1999).

5 Les bactéries considérées comme symbiotes de tiques

Les tiques représentent un écosystème à part entière et de nombreuses études ont révélé l'existence de bactéries régulièrement associées aux tiques et considérées comme des symbiotes (Nibilsky *et al.*, 1997 ; Noda *et al.*, 1997; Azad et Beard, 1998 ; Simser *et al.*, 2001). Les termes de symbiote (littéralement « vivant ensemble ») ou endosymbiotes (ceux qui vivent dans des symbioses endocellulaires) ont été attribués aux bactéries associées aux arthropodes. La présence de ces symbiotes chez les arthropodes est fréquemment associée à un régime alimentaire non diversifié. Ainsi les arthropodes strictement hématophages, dont l'unique source alimentaire tout au long de leur cycle de développement est le sang, dépendraient d'une grande diversité de symbiotes pour obtenir les nutriments manquants qu'ils n'ont pas la capacité de synthétiser seuls (Eicher et Shaub, 2002 ; Aksoy, 2003).

Ces symbiontes peuvent être retrouvés dans une grande variété de tissus et sont souvent intimement liés à la physiologie de leur hôte arthropode. Leurs effets, souvent mal connus, peuvent être bénéfiques ou néfastes pour l'arthropode. Une distorsion du sex-ratio ainsi que l'altération du déterminisme sexuel chez l'arthropode ont été décrites (Fialho et Stevens., 2000). En revanche leur élimination peut également rendre certains arthropodes stériles (Aksoy, 2003).

Des représentants des genres *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Coxiella* et *Francisella* (tableau 2) ont été reconnus comme des symbiontes maintenus dans les populations de tiques dures à la fois par transmission transtadiale et transovarienne. Ainsi des *Rickettsia* du groupe boutonneux ont été retrouvées chez *Ixodes scapularis* et *Dermacentor andersoni*, et des symbiontes du genre *Coxiella* ont été identifiés chez *R. sanguineus*, *Haemaphysalis longicornis* et *Ornithodoros moubata*. (Noda et al, 1997 ; Simser et al., 2001).

Le pouvoir pathogène propre des symbiontes sur l'hôte mammifère de la tique reste méconnu (Noda et al., 1997, Azad et Beard 1998). Certaines bactéries étaient considérées comme des symbiontes stricts avant d'être associées à des pathologies définies (Parola et Raoult, 2001). En revanche, si le symbionte en question colonise exclusivement le tissu ovarien de la tique, la transmission à l'hôte vertébré est hautement improbable (Raoult et Roux, 1997).

Les bactéries symbiontes peuvent également avoir un rôle indirect en influant sur l'installation ou la transmission des agents pathogènes vectorisés par l'arthropode qu'elles colonisent. On sait par exemple que, chez les glossines, les micro-organismes symbiontes intestinaux du genre *Sodalis* favorise l'installation des parasites du genre *Trypanosoma* (Welburn et Maudlin, 1999). En revanche, cette influence potentielle est peu connue chez les tiques. Chez *Dermacentor andersoni*, il a été démontré que la présence du symbionte *Rickettsia peacockii* dans les ovaires des femelles limitait l'installation de l'espèce pathogène *Rickettsia rickettsi* et donc la transmission transovarienne de l'agent pathogène (Simser et al., 2001).

Les relations phylogéniques des symbiontes avec les agents pathogènes auxquels ils sont apparentés restent à définir. Les symbiontes et les agents pathogènes descendraient d'un ancêtre commun qui aurait évolué en deux lignées : la lignée endosymbiotique,

« spécialiste », complètement adaptée à l'environnement interne de la tique et la lignée pathogène, « généraliste », capable d'infecter et de coloniser à la fois les tiques et leurs hôtes. (Noda *et al.*, 1997). Selon cette hypothèse, le potentiel d'émergence ou de réémergence en tant que pathogènes de ces endosymbiontes reste à évaluer (Noda *et al.*, 1997 ; Weller *et al.*, 1998).

Tableau 2 : Principaux symbiontes identifiés par biologie moléculaire ou isolés de tiques dures.

Tique	Symbionte identifié et Affiliation phylogénétique		Référence
<i>Ixodes scapularis</i>	<i>Rickettsia</i> sp.	Alphaproteobacteria Spotted Fever Group <i>Rickettsia</i>	Noda <i>et al.</i> , 1997
<i>Ixodes scapularis</i>	?	Cytophaga-Flavobacterium- bacteroides ?	Kurtti <i>et al.</i> , 1996
<i>Dermacentor andersoni</i>	<i>Rickettsia peacockii</i>	Alphaproteobacteria Spotted Fever Group <i>Rickettsia</i>	Simser <i>et al.</i> , 2001
<i>Amblyomma americanum</i>	<i>Rickettsia</i> sp.	Alphaproteobacteria Spotted Fever Group <i>Rickettsia</i>	Weller <i>et al.</i> , 1998
<i>Ixodes ricinus</i>	IRicES1	Alphaproteobacteria Rickettsiales	Beninati <i>et al.</i> , 2004
<i>Dermacentor andersoni</i>	<i>Francisella</i> sp.	Alphaproteobacteria <i>Rickettsiaceae</i>	Niebylski <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Coxiella</i> sp.	Gammaproteobacteria <i>Coxiellaceae</i>	Noda <i>et al.</i> , 1997
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	<i>Coxiella</i> sp.	Gammaproteobacteria <i>Coxiellaceae</i>	Noda <i>et al.</i> , 1997
<i>Ixodes woodi</i>	<i>Rickettsiella</i> sp.	Gammaproteobacteria <i>Coxiellaceae</i>	Kurtti <i>et al.</i> , 2002

II.2 Principales bactéries pathogènes transmises par les tiques

Les bactéries pathogènes transmises par les tiques appartiennent majoritairement à deux groupes d'eubactéries, les spirochètes et les protéobactéries (voir tableau 3).

Tableau 3 : Position phylogénétique des principales bactéries associées aux tiques

groupe	sous groupe	ordre	famille	genre
Proteobacteria	alphaproteobacteria	Rickettsiales	<i>Anaplasmataceae</i>	<i>Neorickettsia</i> <i>Aegyptionella</i> <i>Ehrlichia</i> <i>Anaplasma</i>
			<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Rickettsia</i> <i>Wolbachia</i>
		Rhizobiales	<i>Bartonellaceae</i>	<i>Bartonella</i> <i>Francisella</i>
	gammaproteobacteria	Pasteurellales	<i>Francisellaceae</i>	<i>Wolbachia persica</i>
		Legionellales	<i>Coxiellaceae</i>	<i>Coxiella</i> <i>Rickettsiella</i>
Spirochaete		Spirochaetales	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Borrelia</i>

Il faut noter que les alpha-protéobactéries transmises par les tiques ont toutes appartenu au genre *Rickettsia* à un moment ou à un autre de leur description. Ceci conduit à un certain flou dans les dénominations des maladies induites par ces bactéries.

1 Agents pathogènes dont la transmission par les tiques est avérée

Spirochaete : *Borrelia* sp.

Éléments de bactériologie

Les *Borrelia* sont des bactéries spiralées, Gram négatif, qui, parmi les spirochètes, ont la particularité d'avoir un cycle de développement requérant à la fois des hôtes mammifères et arthropodes.

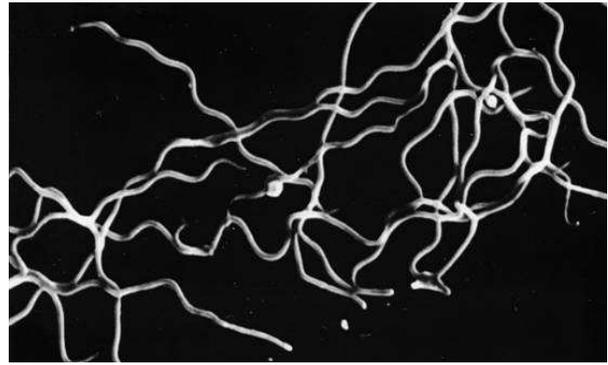


Figure 8 : Photographie en microscopie électronique à balayage de *Borrelia burgdorferi* sl. (Photo : Pr Baranton)

Il existe deux groupes de *Borrelia* : Le complexe d'espèce *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) dont les membres sont transmis par les tiques dures du genre *Ixodes* et le groupe des *Borrelia* associées aux tiques molles. Nous nous intéresserons ici exclusivement aux bactéries du complexe *B. burgdorferi* sl, dont certaines sont les agents de la maladie de Lyme.

Quatre espèces du complexe d'espèces *Borrelia burgdorferi* sl ont un pouvoir pathogène reconnu (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ss), *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* et *Borrelia japonica*) (tableau 4). Aux États-Unis seule *Borrelia burgdorferi* ss est retrouvée. En Europe on retrouve *Borrelia burgdorferi* ss, *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii* et deux autres espèces *B. valaisiana* et *B. lusitaniae*.

La culture de *Borrelia burgdorferi* sl est possible sur milieu spécifique. Le milieu BSK (milieu Barbour-Stoenner-Kelly) modifié avec une température optimale de 33°C est le milieu de culture le plus utilisé.

Éléments d'épidémiologie

• Vecteurs et réservoirs

En Europe, *Ixodes ricinus* est l'espèce majeure impliquée dans la transmission des *Borrelia*. La bactérie a été isolée chez d'autres genres de tiques comme *Dermacentor* spp. et chez d'autres arthropodes (*Ctenocephalides felis*), mais ils ne sont sans doute pas impliqués dans la transmission (Euzéby, 1989 ; Hubalek et Halouzka, 1997).

Chez leur vecteur, les *Borrelia* subissent un grand nombre de modifications à la fois quantitatives et qualitatives qui conditionnent la transmission des bactéries à l'hôte

mammifère. Quand une larve ou une nymphe ingère des *Borrelia*, les spirochètes sont d'abord localisées dans l'intestin où elles se multiplient activement jusqu'à la mue de la tique. Le nombre de spirochètes décroît ensuite et les individus à l'affût sont faiblement infectés (Schwan et Piesman, 2002). Une fois la tique infectée fixée sur un nouvel hôte, les spirochètes se multiplient à nouveau rapidement dans la lumière de l'intestin moyen, où a lieu une modification d'expression de leurs protéines membranaires (expression d'ospA au détriment d'ospC) (Piesman *et al.*, 2003). Les spirochètes migrent ensuite dans l'hémocœle de la tique jusqu'aux glandes salivaires d'où elles peuvent être transmises à l'hôte. Ce cycle nécessite environ deux à trois jours, c'est pourquoi le risque de transmission est très faible avant 48 heures de fixation (Stanek et Steere, 2003). La transmission de la bactérie chez le vecteur se fait essentiellement de manière trans-stadiale (fig 9). La transmission transovarienne existe mais reste anecdotique. Moins de 5 % des larves issues d'une femelle infectée sont porteuses de *Borrelia burgdorferi* (Bellet-Edimo, 1997).

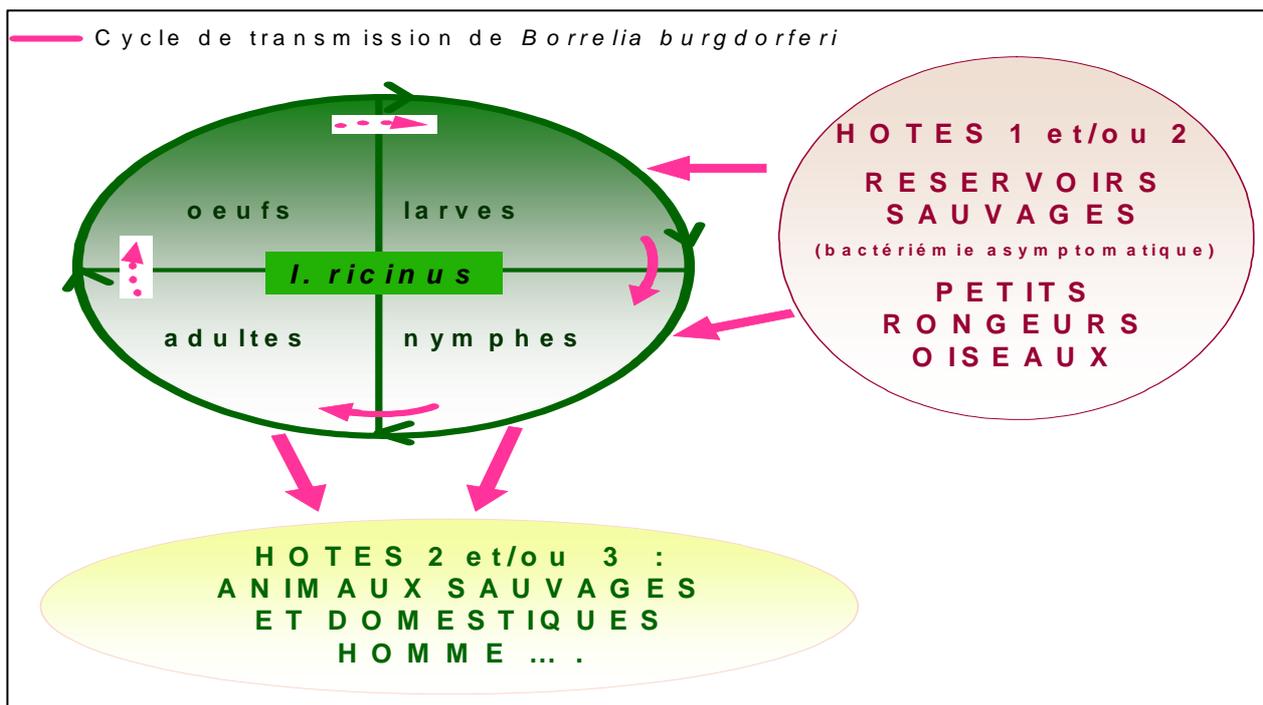


Figure 9 : Cycle de transmission de *B. burgdorferi*

Le réservoir principal de *B. burgdorferi* *sl* en Europe est constitué par les petits rongeurs de forêt, ainsi que par les insectivores comme le hérisson ou la musaraigne.

Le rôle des oiseaux, notamment les merles et les faisans, est de plus en plus évoqué. Les espèces migratrices sont, de plus, soupçonnées diffuser largement la bactérie (Smith *et al.*, 2003 ; Stanek et Steere, 2003)

- Répartition géographique de *B. burgdorferi* s.l

La distribution de *B. burgdorferi* recouvre la zone tempérée de l'hémisphère Nord et comprend la majeure partie de l'Eurasie et des États-Unis, zones d'endémie de la maladie. Tous les pays d'Europe du Nord sont touchés de manières variables selon les régions et avec de grandes différences de risque à l'intérieur d'une même zone (Stanek et Steere, 2003).

En France, des foyers de maladie de Lyme ont été signalés dans le Nord-Est (Alsace et Lorraine) et l'Ouest (Bretagne) et, dans une moindre mesure, dans le Centre, en Auvergne, en Ile-de-France notamment à Rambouillet, dans le Sud-Ouest (Landes, Midi-Pyrénées) et en Corse (Dournon *et al.*, 1989 ; Euzéby, 1989). En fait, toutes les zones rurales de moins de 1500 mètres d'altitude sont exposées, à l'exception d'une bande de territoire sur le pourtour méditerranéen : ceci correspond à l'aire de répartition du vecteur *I. ricinus*.

Des études moléculaires menées dans différentes régions en France ont montré que le portage existe sur l'ensemble du territoire. En moyenne 10 à 12% des *I. ricinus* adultes sont porteuses d'ADN de *Borrelia burgdorferi* s.l, avec des variations en fonction de la zone étudiée (Gilot *et al.*, 1996). Ces résultats corroborent l'affirmation que la borréliose de Lyme est endémique sur tout le territoire français.

- Importance

La maladie de Lyme est la première maladie à vecteur de l'hémisphère Nord. Sa prévalence, tant chez l'Homme que chez l'Animal reste mal connue et l'incidence en très forte augmentation depuis une dizaine d'années serait en partie due à l'amélioration des connaissances à son sujet.

Chez l'Homme, selon les statistiques du CDC (Center for disease control and prévention, Atlanta), l'incidence annuelle de la maladie atteint 5,1 cas pour 100.000

personnes par an aux Etats-Unis et une prévalence de 1.070.000 cas sur la période 1925-2000 soit 2% de la population américaine. Ce chiffre serait applicable à l'ensemble du globe (Harvey et Salvato, 2003).

Manifestations cliniques : la maladie de Lyme

Chez l'homme, la maladie de Lyme évolue en général en trois phases bien définies. La première de ces phases correspond aux manifestations cutanées précoces localisées au point d'inoculation du germe. Le marqueur clinique de cette phase, considéré comme pathognomonique, est l'érythème migrant. La seconde phase peut survenir de quelques semaines à quelques mois après l'infection avec des manifestations cutanées, nerveuses, articulaires ou cardiaques. Les manifestations les plus courantes en Europe sont de type neurologique. Les manifestations de la phase tertiaire sont les mêmes qu'en phase secondaire mais chroniques et peuvent survenir des mois après l'inoculation.

Les divers aspects pris par la maladie seraient à mettre en relation avec les espèces en cause : *B. burgdorferi* ss serait plutôt impliquée dans les affections articulaires et cutanées, *B. garinii* entraînerait des manifestations neurologiques et *B. afzelii* serait en cause lors de symptômes cutanés tardifs (acrodermatites chroniques atrophiantes) .

La borréliose de Lyme a été décrite chez le chien, le chat, le cheval les bovins et les petits ruminants. Les animaux développent un tableau clinique frustré, varié et non spécifique, dominé par de la fièvre, de l'asthénie, de l'anorexie et des boiteries. Les trois stades de la maladie décrits chez l'homme ne sont pas retrouvés et de nombreux animaux restent asymptomatiques malgré des titres sérologiques élevés (Euzéby, 1989). L'article présenté en annexe 3, rappelle l'état des connaissances actuelles sur la borréliose chez le chien, espèce pour laquelle l'affection est la plus documentée en médecine vétérinaire.

Tableau 4 : Répartition, vecteurs, hôtes mammifères et et pouvoir pathogène des différentes espèces de *Borrelia burgdorferi* sl (d'après Euzéby 2005 ; Parola et Raoult, 2001).

Les *Borrelia* rencontrées en France sont représentées en gras-grisé

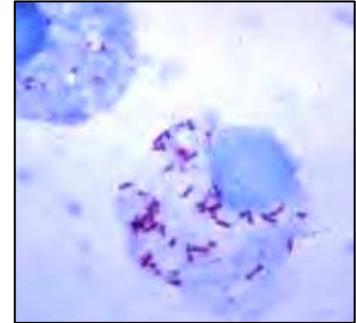
Bactérie	Hôte	Vecteur	Pathologie	Répartition géographique
<i>B. afzelii</i>	Réservoir principal : rongeur	<i>I. persulcatus</i> (Asie), <i>I. ricinus</i> (Europe).	Borréliose de Lyme : lésions cutanées tardives de l'acrodermatite chronique atrophiante.	Europe, Asie
<i>B. andersonii</i>		<i>I. dentatus</i>	Non pathogène	Amérique du Nord.
<i>B. bissetti</i>		<i>I. pacificus</i> , <i>I. scapularis</i> <i>I. spinipalpis</i>	Non pathogène	Amérique du Nord.
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>		<i>I. pacificus</i> (U.S.A.) <i>I. ricinus</i> (Europe) <i>I. scapularis</i> (U.S.A.) <i>I. uriae</i> (Suède)	Borréliose de Lyme : arthrites.	Europe, Amérique du Nord
<i>B. garinii</i>	Réservoir principal : oiseaux	<i>I. ricinus</i> (Europe) <i>I. persulcatus</i> (Asie)	Borréliose de Lyme : manifestations neurologiques.	Europe (espèce la plus fréquente) Asie
<i>B. japonica</i>		<i>I. ovatus</i>		Japon
<i>B. lusitaniae</i>		<i>I. ricinus</i>	Récemment identifiée chez un patient présentant des symptômes de neuroborréliose (Diza et al., 2004)	Europe Amérique du Nord.
<i>B. spielmani</i>	Muscardin	<i>I. ricinus</i>	Borréliose de Lyme (Richter et al., 2004)	Europe
<i>B. tanukii</i>		<i>I. tanuki</i>	Non pathogène	Japon
<i>B. turdi</i>		<i>I. turdi</i>	Non pathogène	Japon
<i>B. valaisiana</i>		<i>I. columnae</i> (Asie), <i>I. nipponensis</i> (Asie), <i>I. ricinus</i> (Europe).	identifiée chez un patient présentant des lésions cutanées (Collares-Pereira et al., 2004)	Europe Chine, Corée, Taiwan, Japon
<i>candidatus B. texasensis</i>	?	<i>D. variabilis</i>	Non pathogène	Amérique du Nord

Alphaprotéobactéries : Rickettsiales

• *Rickettsia* sp. du groupe boutonneux

Éléments de bactériologie

Le genre *Rickettsia* (da Rocha-Lima, 1916) rassemble de courts bacilles à Gram négatif, intracellulaires obligatoires qui se multiplient dans le cytoplasme ou parfois dans le noyau des cellules de certains vertébrés et de certains arthropodes (fig 10) (Raoult et Roux, 1997). Le genre *Rickettsia* a connu de nombreux remaniements au cours du XX^{ème} siècle et à l'heure actuelle, il n'existe pas de réel consensus sur la notion d'espèce au sein de ce genre.



**Figure 10 : *Rickettsia* sp. infectant une cellule
(photo : www.vet.uga.edu)**

Sur la base de caractères phénotypiques, les espèces du genre *Rickettsia* sont classiquement séparées en deux groupes. Les espèces du groupe typhus ont une localisation exclusivement intracytoplasmique et ont des insectes pour habitat et/ou vecteurs. Les espèces du groupe boutonneux sont localisées dans le cytoplasme et le noyau des cellules infectées et ont pour habitat et/ou vecteurs des acariens (tableau 5).

Les études génomiques montrent que les espèces du groupe boutonneux possèdent le gène *rompA* alors que celui-ci est absent ou non exprimé chez les espèces du groupe typhus. De plus, sur critère génomique, des espèces au phénotype moins caractéristique ont été classées dans des groupes apparentés au groupe boutonneux (par exemple *R. helvetica*, *R. australis*, *R. akari* et *R. felis*) (Euzéby, 2005). Dans cette étude nous nous intéresserons exclusivement aux *Rickettsia* du groupe « boutonneux », appelée aussi SFG *Rickettsia* sp., d'après le terme anglais « Spotted Fever Group » .

En tant que bactéries strictement intracellulaires, la culture des *Rickettsia* sur milieu inerte n'est pas possible. En revanche, la plupart des espèces poussent en cultures cellulaires (Raoult et Roux, 1997).

Eléments d'épidémiologie

- Vecteurs et Réservoirs des *Rickettsia* du groupe boutonneux

Les *Rickettsia* se maintiennent dans les populations de tiques à la fois par transmission transtadiale et par transmission transovarienne. Ainsi, la tique joue à la fois le rôle de vecteur et de réservoir de la bactérie. Les *Rickettsia* se multiplient dans pratiquement tous les organes de leur hôte invertébré y compris les ovaires et les oocytes chez la femelle, ce qui explique la transmission trans-ovarienne. Le taux d'œufs infectés par femelle de la même espèce de tique infectée par la même souche de *Rickettsia* varie sous l'influence de facteurs encore inconnus (Raoult et Roux, 1997). Chaque espèce étant étroitement liée à son vecteur, l'identification de la tique revêt aussi une très grande importance. De nombreux animaux, oiseaux et mammifères sont sensibles à l'infection par les *Rickettsia* du groupe boutonneux mais leur rôle de réservoir potentiel dans le maintien de zones d'endémie demeure inconnu (Raoult et Roux, 1997).

- Répartition géographique

Le lien étroit entre la bactérie et son vecteur fait que la distribution géographique des rickettsioses transmises par les tiques épouse celle des tiques (Brouqui *et al.*, 2004). La distribution des SFG *Rickettsia* sp. est mondiale, chaque espèce ayant une répartition géographique propre.

- Importance

L'importance des rickettsioses, comme celle de la plupart des maladies à tiques, reste mal connue et parcellaire. Des données ponctuelles provenant de campagnes d'épidémiosurveillance permettent d'avoir un aperçu de l'importance de ces maladies. Dans le sud de la France, jusqu'à 12% des *Rhipicephalus sanguineus* sont porteuses de *Rickettsia conorii*. Ces tiques, bien adaptées à l'environnement urbain, ne se nourrissent que très rarement sur les hommes auxquels elles préfèrent les chiens. L'incidence de la fièvre boutonneuse méditerranéenne chez l'homme est relativement basse dans cette région (Raoult et Roux, 1997). En Europe de l'Ouest la détection de *R. helvetica* dans des tiques *I. ricinus* donnent des taux de portage compris entre 2% et 9% (Parola *et al.*, 1998a ; Beninati *et al.*, 2002 ; Nielsen *et al.*, 2004 ; Hartelt *et al.*, 2004). Aux Etats-Unis, dans les états de

Caroline du Nord et du Sud, les tiques *Dermacentor variabilis* ont un taux de portage de *Rickettsia rickettsi* de seulement 0,5 % mais ces tiques se nourrissent fréquemment sur les hommes et la fièvre boutonneuse des montagnes Rocheuses est commune dans cette zone. Ainsi entre 1981 et 1992, le CDC a répertorié 9223 cas de fièvre des Montagnes rocheuses (Dalton *et al.*, 1995).

Manifestations cliniques

Lors de transmission à l'Homme ou à l'hôte mammifère, les *Rickettsia* pathogènes se multiplient à leur point d'inoculation pour donner un escarre suivi de vascularite, d'inflammation péri-vasculaire et de thrombose et éventuellement d'atteintes viscérales (Brouqui *et al.*, 2004). Les rickettsioses se manifestent aussi par une fièvre importante (> 39 °C) des myalgies, arthralgies, et céphalées. Les deux rickettsioses historiquement les plus connues sont la fièvre pourprée des montagnes rocheuses à *R. rickettsi* principalement transmise par *Dermacentor* sp. sur le continent américain et la fièvre boutonneuse méditerranéenne sur le pourtour de la Méditerranée, qui jusqu'à très récemment, était considérée comme la seule rickettsiose prévalente en Europe. Cette maladie est causée par *R. conorii* et est transmise par la tique *R. sanguineus*. (Brouqui *et al.*, 2004). Depuis dix ans, cinq nouvelles rickettsioses transmises par les tiques ont été décrites en Europe. Parmi ces rickettsioses, une infection à *R. mongolotimonae* transmise par *Hyalomma asiaticum*, vraisemblablement importé par un oiseau migrateur a été décrite dans le sud de la France (Fournier *et al.*, 2000 b). Une infection appelée TIBOLA (tick-borne Lymphadénopathie) à *R. slovaca* transmise par la tique *Dermacentor variabilis* a été décrite pour la première fois chez un patient en 1980 et est maintenant reconnue dans toute l'Europe (Mittermayer *et al.*, 1980 ; Lakos, 2002 ; Raoult *et al.*, 2002). *R. helvetica* est transmise par *Ixodes ricinus* dans toute l'Europe et est responsable de fièvre et peut conduire à la mort (Nilsson *et al.*, 1999 a et b ; Fournier *et al.*, 2000a).

Les manifestations cliniques de rickettsioses animales sont rares et sont limitées à la fièvre pourprée des montagnes rocheuses à *R. rickettsi* chez le chien (Gasser *et al.*, 2001) même si des études sérologiques ont pu mettre en évidence la présence d'anticorps anti-*Rickettsia* du groupe boutonneux dans le sang d'autres animaux domestiques comme les chevaux et les chats (Matthewman *et al.*, 1997 ; Shaw *et al.*, 2001a ; Sangioni *et al.*, 2005).

Tableau 5 : Répartition, vecteurs, et pouvoir pathogène des différentes espèces de *Rickettsia* du groupe boutonneux (d'après Euzéby 2005, et Parola et Raoult, 2001). Les *Rickettsia* rencontrées en France sont représentées en gras-grisé.

Bactérie	Vecteur	Maladie induite	Répartition géographique
<i>R. aeschlimannii</i>	<i>Hyalomma marginatum</i>	?	Maroc
<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> <i>Amblyomma hebraeum</i>	Fièvre à tique africaine	Afrique subsaharienne
<i>R. amblyommi</i> "	<i>Amblyomma americanum</i>	?	U.S.A.
<i>R. australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i>	Fièvre à tique du Queensland	Queensland
<i>R. bellii</i>	<i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Dermacentor sp.</i> , <i>Ornithodoros concanensis</i> , <i>Argas cooleyi</i> <i>Haemaphysalis leporipalustris</i>	?	U.S.A.
<i>R. conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Fièvre boutonneuse méditerranéenne	Pourtour méditerranéen, France, Afrique, Inde, Géorgie
<i>R. heilongjiangii</i>	<i>Dermacentor silvarum</i>	?	Chine
<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Fièvre, péricardite, mort subite	Europe : notamment France, Suisse, Suède
<i>R. honei</i>	? (Îles Flinders) <i>Ixodes granulatus</i> (Thaïlande)	Fièvre boutonneuse des îles Flinders	Îles Flinders (Australie), Thaïlande
<i>R. hulinii</i>	<i>Haemaphysalis concinna</i>	?	Chine
<i>R. japonica</i>	Diverses espèces du genre <i>Haemaphysalis</i> <i>Dermacentor taiwanensis</i> , <i>Ixodes ovatus</i>	Fièvre boutonneuse orientale	Japon
<i>R. massiliae</i>	<i>Rhipicephalus turanicus</i>, <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	?	France, Grèce, Espagne, Portugal, Centrafrique
<i>R. mongolotimonae</i>	<i>Hyalomma asiaticum</i>, autres espèces de tiques encore inconnues	Fièvre boutonneuse	Mongolie, France
<i>R. montanensis</i>	<i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Dermacentor andersoni</i>	?	U.S.A.
<i>R. parkeri</i>	<i>Amblyomma maculatum</i>	?	U.S.A.
<i>R. peacockii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	?	U.S.A.
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>, <i>Dermacentor andersoni</i>	?	U.S.A., France, Portugal, République Centrafricaine
<i>R. rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Amblyomma canjennense</i> ,	Fièvre pourprée des Montagnes rocheuses	Amérique
<i>R. sibirica</i>	<i>Dermacentor nuttallii</i> , <i>Dermacentor marginatus</i> , <i>Haemaphysalis concinna</i>	Typhus à tique de Sibérie, typhus à tique d'Asie du Nord	Sibérie, Pakistan, Chine du Nord, Mongolie
<i>R. slovaca</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>	TIBOLA Fièvre avec escarres au niveau de la tête	Europe : notamment France, Suisse, Portugal, Russie, Slovaquie, Hongrie
<i>R. thailandii</i>	<i>Ixodes granulatus</i>	?	Thaïlande
<i>R. texiana</i> "	<i>Amblyomma americanum</i>	?	U.S.A.
<i>Rickettsia</i> sp. (AB bacterium)	<i>Adalia bipunctata</i>	?	Royaume-Uni, Russie
<i>Rickettsia</i> sp. (Astrakhan fever rickettsia)	<i>Rhipicephalus pumilio</i>	Fièvre d'Astrakan	Russie
<i>Rickettsia</i> sp. (génotype (RpA4)	<i>Rhipicephalus pumilio</i>	?	Russie
<i>Rickettsia</i> sp. (génotype Cooleyii)	<i>Ixodes scapularis</i>	?	Texas
<i>Rickettsia</i> sp. (génotypes DnS14 et DnS 28)	<i>Dermacentor nuttallii</i>	?	Russie
<i>Rickettsia</i> sp. (Israéli tick typhus rickettsia)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Fièvre boutonneuse d'Israël	Israël
<i>Rickettsia</i> sp. (souches Bar 29, JC880 et S)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	?	Espagne (bar 29) Pakistan (JC880) Arménie (S)
<i>Rickettsia</i> sp. (Pea aphid rickettsia)	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	?	U.S.A.
<i>Rickettsia</i> sp. (souche BJ-90)	<i>Dermacentor sinicus</i>	?	Chine
<i>Rickettsia</i> sp. (Thai tick typhus rickettsia)	<i>Ixodes</i> sp. ou <i>Rhipicephalus</i> sp.	?	Thaïlande

• Anaplasmataceae

***Ehrlichia* sp.**

Éléments de bactériologie

Les *Ehrlichia* sp., sont de petits bacilles polymorphes Gram négatif, immobiles, apparentés aux rickettsies. Leur localisation est strictement intracellulaire (fig 11). Ils peuvent être retrouvés de manière isolée dans des vacuoles intracytoplasmiques mais sont le plus souvent regroupés sous la forme d'inclusions denses contenant un matériel fibrillaire, les morulas.



Figure 11 : Morula d'*E. canis* dans un granulocyte de chien (photo : www.cvm.okstate.edu)

Les cellules infectées sont principalement les cellules matures ou immatures des lignées monoblastiques et myéloblastiques.

Le genre *Ehrlichia* n'a pas échappé à la réorganisation de l'ordre des rickettsiales, fondée sur l'analyse du gène de l'ARN ribosomal 16S (Dumler *et al*, 2001) et les bactéries ont été placées dans trois genres différents. Le genre *Ehrlichia* ne regroupe donc actuellement plus que cinq espèces : *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* et *E. ruminantium* (ex *Cowdria ruminantium*). Cependant, d'autres souches ont été caractérisées et pourraient constituer de nouvelles espèces.

La culture des espèces du genre *Ehrlichia* ne peut être obtenue ni sur des milieux inertes ni dans des œufs embryonnés mais certaines espèces se multiplient en cultures cellulaires (Euzéby, 2005).

Éléments d'épidémiologie

• Vecteurs et réservoirs

Les vecteurs de *Ehrlichia* sp. sont des tiques dures de différents genres (voir tableau). Le micro-organisme se multiplie chez les vecteurs mais ceux-ci ne sont pas réservoir (Parola et Raoult, 2001) Des essais expérimentaux de transmission transovarienne

de *E. chaffeensis* chez son vecteur *A. americanum* n'ont jamais abouti (Long *et al.*, 2003). Les réservoirs sauvages des différentes espèces d'*Ehrlichia* ne sont pas toujours connus mais sont souvent des ruminants sauvages comme le cerf à queue blanche de Virginie (*Odocoileus virginianus*) pour *E. chaffeensis* (Lockhart *et al.*, 1997) ou les cervidés sauvages africains pour *R. ruminantium* (Kock *et al.*, 1995) ou encore éventuellement des canidés pour *E. canis* (Amyx et Huxsoll, 1973).

- Répartition géographique

Les différentes espèces d'*Ehrlichia* ont une répartition mondiale avec des zones d'endémie pour chaque espèce, en particulier en zone tropicale (tableau 6).

- Importance

Les ehrlichioses humaines n'ont été détectées que sur le continent américain, principalement aux Etats-Unis. De 1986 à 1997, environ 800 cas d'ehrlichioses monocytaires ont été reportés au CDC qui note une croissance nette du nombre de cas entre 1992 et 1997 (de moins de 50 cas par an à plus de 200) (source : <http://www.cdc.gov>).

L'importance des ehrlichioses animales est variable suivant l'espèce en cause et la localisation géographique. Pour *Ehrlichia canis*, en France, la séroprévalence peut atteindre 9% (Davoust, 2003a). Pour *Ehrlichia ruminantium*, la séroprévalence en zone d'endémie est d'environ 50% (Faburay *et al.*, 2005).

Manifestations cliniques

Les Ehrlichioses à *Ehrlichia* sp. sont des maladies animales avant d'être des maladies humaines (Dumler *et al.*, 1993). Le tableau 6 résume les différents aspects cliniques des ehrlichioses chez leurs hôtes respectifs. La gravité de la maladie varie d'un animal à l'autre.

Chez l'homme, le premier cas d'ehrlichiose monocyttaire fut décrit en 1987, chez un malade américain qui présentait des morsures de tiques et souffrait de fièvre, de céphalées et de myalgie (Maeda *et al.*, 1987). Les inclusions caractéristiques du genre *Ehrlichia* dans le cytoplasme des monocytes et des macrophages et le taux d'anticorps anti-*E. canis* élevé ont conduit les auteurs à assimiler la bactérie pathogène à *E. canis*. La bactérie incriminée a été isolée en 1991. Les auteurs ont démontré qu'il s'agissait en fait d'une nouvelle espèce du genre *Ehrlichia* : *E. chaffeensis* (Anderson *et al.*, 1991). Depuis de nombreux cas humains

ont été répertoriés (Arraga-Alvarado, 1994 ; McQuiston *et al.*, 1999). Avec la caractérisation de *E. chaffeensis*, *E. canis* n'était plus considérée comme responsable de zoonoses. Toutefois, une souche de *Ehrlichia* sp., décrite au Venezuela et appelée agent de l'ehrlichiose humaine du Venezuela, pourrait être une souche ou une sous-espèce de *E. canis*. (Perez *et al.*, 1996).

Tableau 6 (page suivante) : Répartition, vecteurs, hôtes mammifères et pouvoir pathogène des différentes espèces de *Ehrlichia* sp. (d'après Euzéby 2005 et Parola et Raoult, 2001). Les *Ehrlichia* rencontrées en France sont représentées en gras-grisé

Bactérie	Ancienne dénomination	Tropisme cellulaire	Hôte mammifère	Vecteur	Pathologie	Répartition géographique
<i>E. ruminantium</i>	<i>Cowdria ruminantium</i>	cellules endothéliales	Ruminants : bovin, ovin Cervidés	<i>Amblyomma</i> sp.	cowdriose ou heartwater maladie septicémique : fièvre brutale (41 C) qui rétrocede en quelques jours ou suivie d'autres symptômes nerveux ou digestifs. Forme suraiguë avec mort possible autopsie : épanchement thoracique et abdominal, hydropéricarde (plus fréquent chez les petits ruminants)	Afrique, Caraïbes
<i>E. canis</i>		monocytes macrophages lymphocytes	Chien autres Canidés Chat	<i>R. sanguineus</i>	« pancytopenie tropicale canine » "typhus du chien", "fièvre hémorragique du chien" fièvre d'apparition brutale, anorexie, perte de poids, léthargie, dyspnée, jetages, adénopathie généralisée, œdème, anémie non régénérative, thrombopénie, hémorragies	mondiale zones d'enzootie tropicales et subtropicales
<i>E. chaffeensis</i>		monocytes, macrophages	Cervidés (réservoir) Canidés, Chèvre, Homme,	Vecteur principal : <i>A. americanum</i> <i>D. variabilis,</i> <i>I. scapularis,</i> <i>A. testudinarium</i> <i>H. yeni</i>	infection humaine souvent grave fièvre, anorexie, céphalées, myalgies, arthralgies, nausées, vomissements, douleurs abdominales, parfois éruption maculopapuleuse peu pathogène chez les animaux (porteurs sains)	USA Europe ? Soupçons sérologiques Asie ? Identification moléculaire dans des tiques en Chine
<i>E. ewingii</i>		granulocytes	Chien, Homme	<i>A. americanum</i> <i>D. variabilis</i> ? <i>R. sanguineus</i> ?	Chez le chien : ehrlichiose cliniquement moins grave qu'une ehrlichiose à <i>E. canis</i> . chez l'homme Infection proche de l'HEG à <i>A. phagocytophilum</i>	USA
<i>E. muris</i>		monocytes, macrophages	rongeurs autres espèces ? Homme ?	<i>H. flava,</i> <i>I. persulcatus</i> ?	Chez les souris de laboratoire anorexie, abattement, moins de 1% de létalité Homme : sérologie évocatrice	Japon, Russie ?
<i>Ehrlichia</i> sp. souches HF et Anan		monocytes, macrophages, éosinophiles	Souris, Rat	<i>I. ovatus</i>	?	Japon
Agent de l'ehrlichiose humaine du Venezuela	pourrait être une souche ou une sous-espèce de <i>Ehrlichia canis</i>	monocytes	Homme	?	Signes cliniques chez l'homme proches de ceux de <i>E chaffeensis</i> (Perez et al., 1996)	Venezuela
<i>Candidatus E. walkerii</i>		Espèces identifiées dans des tiques par techniques moléculaires	?	<i>I. ricinus</i>	Pas de pathologie associée	Italie
<i>Ehrlichia</i> sp. variant Schotti			Chevreuil ?	<i>I. ricinus</i>		Pays Bas

Anaplasma sp.

Eléments de bactériologie

Les *Anaplasma* sont de petites bactéries à Gram négatif partageant avec les *Ehrlichia* la caractéristique d'être présentes dans des vacuoles intracytoplasmiques, soit de manière isolée, soit regroupées dans des morulas (fig 12 ; fig 13 ; fig 14). Les cellules infectées par *Anaplasma sp.* sont les cellules matures ou immatures du système hématopoïétique notamment des globules rouges, des plaquettes, des granulocytes neutrophiles, des monocytes ou des macrophages.

La description phénotypique du genre *Anaplasma* est très proche de celle du genre *Ehrlichia*. Les différences sont liées au spectre d'hôtes et de cellules infectés.

Classiquement, le genre *Anaplasma* (Theiler, 1910) regroupait quatre espèces (*Anaplasma caudatum*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma marginale* et *Anaplasma ovis*), transmises par des arthropodes vecteurs (tiques) et aptes à infecter les globules rouges des ruminants.

La réorganisation de l'ordre des rickettsiales (Dumler *et al.*, 2001) a conduit à inclure dans le genre *Anaplasma* des espèces appartenant préalablement au genre *Ehrlichia* : *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent apparenté de l'éhrlichiose granulocytaire humaine, ont été regroupés en une seule espèce, *Anaplasma phagocytophilum*. Deux

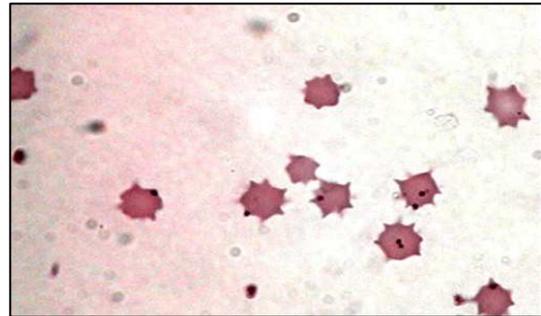


Figure 12 : *A. marginale* dans des érythrocyte de bovin (photo : www.cvm.okstate.edu)

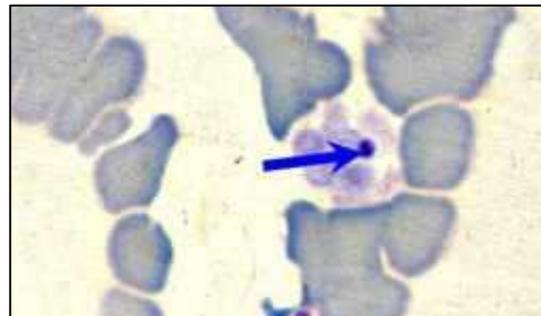


Figure 13 : *A. platys* dans des plaquettes de chien (photo : www.goldenvetlab.co.za)

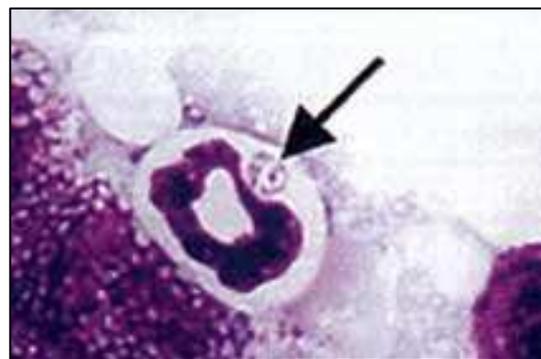


Figure 14 : *A. phagocytophilum* dans un granulocyte humain (photo : www.infektionsbiologie.ch)

espèces dépourvues de statut dans la nomenclature, "*Ehrlichia bovis*", "*Ehrlichia platys*" sont devenus respectivement *Anaplasma bovis* et *Anaplasma platys*. Cependant, sur la base d'études génomiques (citratesynthase) et de critères phénotypique (infection des granulocytes en non des globules rouges) *Anaplasma phagocytophilum* pourrait être considéré comme un genre à part (Inokuma *et al.*, 2001).

La culture de *Anaplasma* sp. ne peut être obtenue ni sur des milieux inertes ni dans des œufs embryonnés mais certaines espèces se multiplient en cultures cellulaires.

Eléments d'épidémiologie

• Vecteurs et réservoirs

Les vecteurs varient suivant l'espèce d'*Anaplasma* (tableaux 7a et 7b). Il s'agit principalement d'Ixodidés même si une transmission mécanique par les tabanidés est possible pour *A. marginale*, *A. centrale*, *A. caudatum* et *A. ovis* (Barbet, 1995).

* De nombreuses espèces de tiques peuvent intervenir dans la transmission d'*A. marginale*, *A. centrale*, *A. caudatum* et *A. ovis*, notamment *Dermacentor andersoni*, *Boophilus annulatus* et, en France, *I. ricinus*, *R. bursa* et *R. sanguineus*. Aucune étude n'a pu démontrer l'existence d'une transmission transovarienne (Kocan *et al.*, 1981 ; Stich *et al.*, 1989). Les mammifères infectés latents constituent également un réservoir de l'infection (Stiller et Coan, 1995).

* Le vecteur d'*Anaplasma platys* est la tique *R. sanguineus*. Ce rôle de vecteur n'a jamais pu être démontré expérimentalement (Simpson *et al.*, 1991) mais l'épidémiologie de l'affection, la fréquence des co-infections *A. platys/E. canis* et la mise en évidence d'ADN de *A. platys* dans des extraits de *R. sanguineus* (Inokuma *et al.*, 2000 ; Sanogo *et al.*, 2003a) sont autant d'éléments en faveur de la transmission de *A. platys* par cette tique.

* *Anaplasma phagocytophilum* est transmise aux mammifères sains par des tiques du genre *Ixodes* notamment, *Ixodes scapularis* et *Ixodes pacificus* aux USA et *Ixodes ricinus* en Europe. Chez les tiques, il n'existe pas de transmission transovarienne. L'infection des tiques nécessite un repas sanguin qui doit durer au minimum 24 heures. *A. phagocytophilum* se multiplie chez les tiques contaminées, notamment au moment de la mue larvaire, et lors de l'engorgement de la tique aux stades larvaire, nymphal et adulte. Chez les tiques infectées,

A. phagocytophilum est localisé principalement dans les glandes salivaires (Euzéby, 2005). Aux Etats-Unis, le réservoir supposé d' *A. phagocytophilum* (biovar HGE) est constitué des petits mammifères sylvoles, en particulier la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*). Le cerf est également suspecté. En Europe, en revanche, le réservoir est inconnu (Parola et Raoult, 2001). Les rongeurs sont peu infectés (Liz *et al.*, 2000). Il semble que le chevreuil pourrait intervenir en France (Joncour et Collin, communication orale, 2003), ce que confirme une étude, à la fois sérologiques et moléculaires, menée en Suisse qui montre des taux d'infection élevés chez ce dernier (Liz *et al.*, 2002).

- Répartition géographique

Les *Anaplasma* ont une répartition mondiale avec des zones d'endémie spécifique d'espèces (tableaux 7a et 7b).

- Importance

- ❖ Dans les zones d'endémies, la séroprévalence d'anticorps anti-*Anaplasma marginale* est très élevée, de 60 à 90% mais l'expression clinique est rare (Collin, communication orale, 2003). En zone non endémique des cas sont épisodiquement rapportés.

- ❖ Les données manquent en ce qui concerne *A. platys*.

- ❖ Aux Etats Unis plus de 600 cas humains d'anaplasmose à *A phagocytophilum* ont été décrits avec une augmentation nette de l'incidence au cours de la dernière décennie (Parola, 2004 ; <http://www.cdc.gov>). En Europe, les infections à *Anaplasma phagocytophilum* sont connues chez les animaux depuis près de 50 ans. Le premier cas humain d'anaplasmose à *A phagocytophilum* a été rapporté en 1995. Depuis cette date, un total de seulement 22 cas européens (dont 1 en France et la plupart en Sloveenie (13 cas)) d'anaplasmose a été relevé malgré une augmentation des taux d'anticorps anti-*Anaplasma phagocytophilum* détectés (Brouqui *et al.*, 2004). Chez les animaux, en France, la séroprévalence peut atteindre 30% chez les chevaux (Davoust, communication orale 2003a) et 25 foyers ont été déclarés chez les bovins dans la période de 1998 à 2002 (Joncour, communication orale 2003). En Europe, de 0,4% à 66,7% des *Ixodes ricinus* collectées en Europe sont porteuses d'ADN de *A. phagocytophilum* (Blanco et Oteo, 2002). Les variations

sont importantes d'une région à l'autre mais la plupart des études montrent des taux de portage assez faibles et inférieurs à 10% (Parola *et al.*, 1998b ; Derdakova *et al.*, 2003 ; Stanczak *et al.*, 2004 ; Hartelt *et al.*, 2004). Ces taux sont similaires à ceux observés aux Etats-Unis (Chang *et al.*, 1998 ; Kramer *et al.*, 1999 ; Holden *et al.*, 2003). En France, une étude menée dans des régions du Centre de la France a montré environ 1.3% de portage. (Parola *et al.*, 1998b).

Manifestations cliniques

Historiquement, les *Anaplasma* sp. sont les agents étiologiques de maladies infectieuses des ruminants uniquement. L'élargissement du genre en fait maintenant les agents de maladies touchant, en plus, de nombreuses classes de mammifères : humains, carnivores, équidés, rongeurs. Les manifestations cliniques rencontrées pour les différentes classes de mammifère sont résumées dans le tableau 7a.

Chez l'homme, *A. phagocytophilum* a été récemment décrit comme l'agent responsable d'une affection décrite essentiellement dans l'hémisphère Nord et appelée à tort EGH pour Ehrlichiose Granulocytaire Humaine (Blanco et Oteo, 2003). Les manifestations cliniques de l'EGH sont présentées dans le tableau 7b.

Tableaux 7a et 7b p 50-51 : Répartition, vecteurs, hôtes mammifères et pouvoir pathogène des différentes espèces d'*Anaplasma* sp. (d'après Euzéby 2005 et Parola et Raoult, 2001). Les *Anaplasma* rencontrés en France sont représentés en gras-grisé

Bactérie	Ancienne dénomination	Tropisme cellulaire	Hôte mammifère	Vecteur	Pathologie	Répartition géographique
<i>A. marginale</i>	appartiennent depuis toujours au genre <i>Anaplasma</i>	globules rouges	bovins grands ruminants (cervidés, camélidés). ovins caprins (infection inapparente).	<i>I. ricinus</i> <i>R. bursa</i> <i>R. sanguineus</i> Tabanidés (transmission mécanique)	maladie sévère des bovins de 1 à 3 ans forte poussée thermique (40-41° C) affaiblissement, amaigrissement rapide, constipation. Anémie, ictère. Evolution plus ou moins rapide vers la mort guérison possible mais convalescence longue.	endémique en zone tropicale et subtropicale répartition mondiale
<i>A. ovis</i>			ovins caprins		peu pathogène	
<i>A. centrale</i>			bovins		peu pathogène;	
<i>A. caudatum</i>			bovins		Cf <i>A. marginale</i>	
<i>A. bovis</i>	« <i>Rickettsia bovis</i> », " <i>Ehrlichia bovis</i> ",	phagocytes mononucléés	Bovins autres mammifères?	<i>H. excavatum</i> , <i>R. appendiculatus</i> <i>A. variegatum</i> <i>A. cajennense</i> <i>H. truncatum</i>	« rickettsiose générale bovine » en générale bénigne mais mort possible en zone tropicale hyperthermie, abattement anorexie, dyspnée, parfois toux sèche et quinteuse, tachycardie et diarrhée	Afrique, Amérique du Sud Iran, Inde
<i>A. platys</i>	<i>Ehrlichia platys</i>	plaquettes : (jamais retrouvé dans d'autres cellules)	Chien autres mammifères ?	<i>R. sanguineus</i>	"thrombopénie infectieuse cyclique du chien" fièvre, adénopathie généralisée, leucopénie et anémie modérée, surtout thrombopénie Les épisodes de thrombopénie (3 à 4 j) se succèdent tous les 7 à 21 jours	USA, Venezuela, Asie Israël, Australie Europe : notamment Espagne Grèce, France Allemagne Italie.

Espèce	Ancienne dénomination	Tropisme cellulaire	Spécificité de biovar	Hôte mammifère	Vecteur	Pathologie	Répartition géographique
<i>A. phagocytophilum.</i>	<i>Ehrlichia phagocytophila</i> HEG agent <i>Ehrlichia equi</i>	granulocytes polynucléés	- différences de : - séquences des ARNr 16S des souches de <i>A. phagocytophilum</i> - caractères biologiques (spectre d'hôtes pouvoir pathogène) - répartition géographique	mammifères domestiques et sauvages les réservoirs identifiés sont des rongeurs et des cervidés sauvages	tiques du genre <i>Ixodes</i>	Voir spécificité des biovars	Voir répartition spécifique des biovars
			<i>A. phagocytophilum</i> biovar Phagocytophilum	ruminants ovins bovins Cervidés	<i>I. ricinus</i>	chez les ovins : "fièvre à tiques" chez les bovins : « fièvre des pâturages » « maladie des gros paturons » fièvre élevée ,anorexie, perte de poids et chute de la production lactée. œdème froid du tarso-métatarse les moutons infectés porteurs jusqu'à deux ans portage plus bref chez les bovins	principalement Europe (Royaume Uni, Norvège, Finlande, Suède, Irlande, Pays Bas, Autriche, Allemagne, France, Espagne, Suisse...) Inde Afrique du Sud
			<i>A. phagocytophilum</i> biovar Equi	Equidés	<i>I. pacificus</i> <i>I. scapularis</i> et <i>I. ricinus</i>	« ehrlichiose granulocytaire équine » fièvre (37,8 à 41,6 °C) anorexie, léthargie, œdèmes des membres, ataxie, ictère, pétéchies, adénopathies, thrombocytopenies leucopénies	USA, Canada, Brésil, Royaume Uni, Allemagne, Suisse, Suède et Israël.
			<i>A. phagocytophilum</i> biovar EGH	Homme Chien Cheval	<i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i> en Europe, <i>I. ricinus</i> et moins <i>I. trianguliceps</i>	« ehrlichiose granulocytaire humaine » fièvre, abattement, anorexie et, au début de l'infection, thrombopénie, lymphopénie, éosinopénie et neutropénie	USA, Slovénie, Pays Bas, Suède. pas de cas déclaré en France mais des soupçons sérologiques

Gammaprotéobactéries

• *Coxiella burnetii*

Eléments de bactériologie

Coxiella burnetii est une bactérie intracellulaire obligatoire (fig 15). Le genre *Coxiella* ne renferme actuellement qu'une seule espèce, *Coxiella burnetii*. Toutefois, la séquence de l'ARNr 16S des bactéries isolées d'écrevisses (Tan et Owens, 2004) ou considérées comme des symbiontes de tiques (Noda *et al.*, 1997) ont également été apparentées au genre *Coxiella*.

La culture de *C. burnetii* est possible sur des œufs embryonnés ou sur diverses lignées cellulaires

Eléments d'épidémiologie

Coxiella burnetii est responsable d'une maladie appelée fièvre Q.

• Vecteur et réservoirs

Le réservoir de la bactérie est constitué par de très nombreuses espèces de vertébrés mais aussi de tiques dures et molles (Rehacek *et al.*, 1991 ; Maurin et Raoult, 1999).

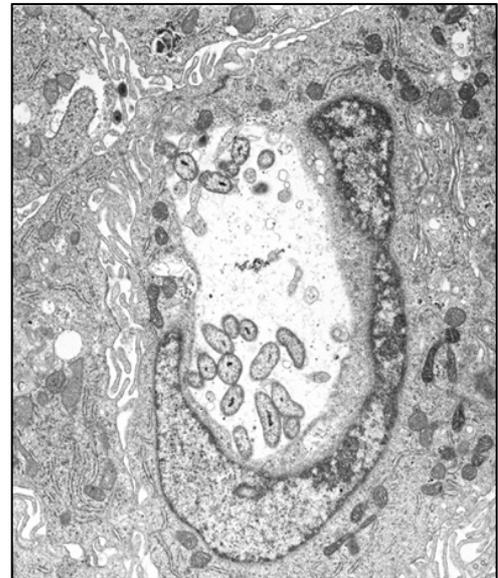


Figure 15 : Photographie en microscopie électronique d'une cellule de singe infectée par *C. burnetii*. Sur la photo, les bactéries sont au nombre de 20 dans la large vacuole centrale (photo : Heinzen, NIAID)

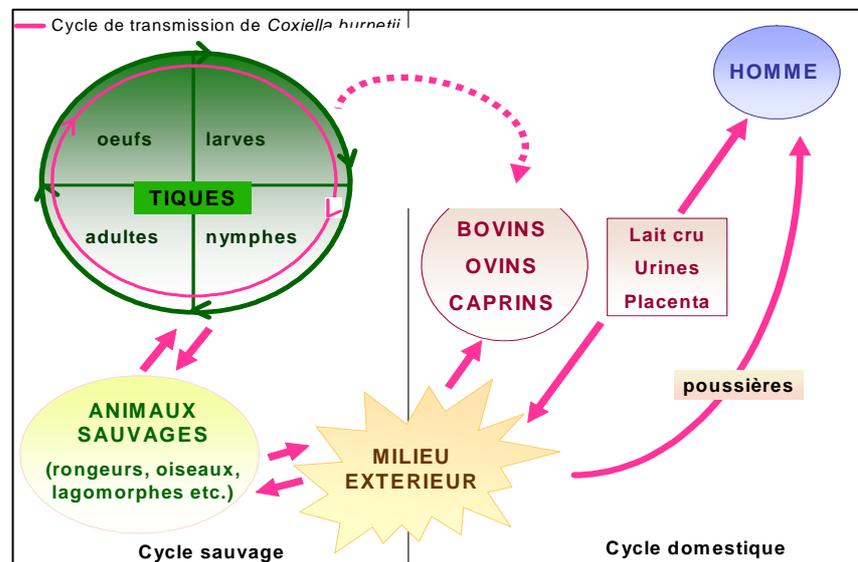


Figure 16 : Représentation schématique du cycle de transmission de *C.burnetii*

La bactérie peut être transmise suivant deux cycles, l'un au sein de la faune sauvage et l'autre parmi les animaux domestiques (fig 16).

Les tiques jouent un rôle primordial dans la transmission de *C. burnetii* entre vertébrés sauvages. Chez les tiques, il existe une transmission transovarienne et trans-stadiale. *C. burnetii* se multiplie dans le tube digestif des tiques et est éliminée dans les déjections et les tiques infectées contaminent les vertébrés, soit par morsure, soit par l'intermédiaire de leurs déjections. Les animaux sauvages infectés excrètent le germe dans le milieu extérieur dans lequel les bactéries peuvent survivre durant plusieurs semaines. L'environnement constitue une source de contamination aussi bien pour les animaux sauvages que pour les animaux domestiques (Maurin et Raoult, 1999 ; Euzéby, 2005).

Cycle domestique

Les animaux domestiques et les hommes ne s'infectent qu'occasionnellement par morsure de tique (Maurin et Raoult, 1999 ; Euzéby, 2005). Le cycle domestique passe le plus souvent, par l'inhalation d'aérosols infectés. Les mammifères infectés sont en général asymptomatiques, mais ils excrètent la bactérie dans les selles, les urines, le lait et les produits de parturition pour les femelles gestantes. (Maurin et Raoult, 1999 ; Euzéby, 2005). Il en résulte une contamination massive du milieu extérieur. Les ruminants domestiques semblent constituer la principale source de contamination pour l'homme, ce qui fait de la fièvre Q une maladie souvent professionnelle.

- Répartition géographique

Coxiella burnetii a une répartition mondiale.

- Importance

Chez l'homme, la prévalence de l'infection est mal connue car la maladie est souvent asymptomatique. L'incidence de la fièvre Q dans le Sud de la France est estimée à 50 cas pour 100 000 habitants (Maurin et Raoult, 1999).

Chez les animaux, en France, les seules données disponibles sont souvent anciennes et concernent les ruminants. L'infection semble sévir sur l'ensemble du territoire et, selon les régions, le pourcentage d'infection des ovins varie de 0,3% à 39%, celui des caprins de 0% à plus de 5% et celui des bovins de 1,8% à 12,3% (Euzéby, 2005).

Manifestations cliniques

Dans la majorité des cas humains et chez les ruminants, l'infection par *C. burnetii* est bénigne voire asymptomatique. La manifestation clinique la plus classique chez l'homme est un syndrome grippal. L'infection à *C. burnetii* a également été associée à des troubles de la reproduction chez l'Homme et dans les élevages de bovins et de petits ruminants (Euzéby, 2005).

Francisella tularensis

Éléments de bactériologie

F. tularensis (fig 17) est un petit coccobacille, Gram négatif, aérobie à la fois intra et extra cellulaire, dont il existe 4 sous-espèces. La position taxonomique du genre *Francisella* est complexe et a changé fréquemment.

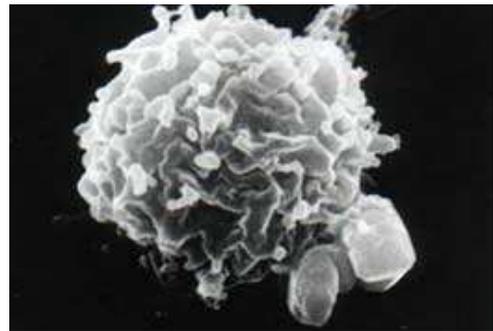


Figure 17 : *F. tularensis* en microscopie électronique à balayage (photo : rainews24)

Actuellement le genre *Francisella* regroupe 2 espèces, *Francisella tularensis* et *Francisella philomiragia* mais une bactérie symbiotique de *Dermacentor andersoni*, a récemment été identifiée comme une nouvelle espèce du genre *Francisella*. Cette espèce, désignée sous le nom de "*Dermacentor andersoni* symbiont" pourrait être apparentée au genre (Niebylski *et al.*, 1997).

La culture est difficile et nécessite la présence de cystéine ou de cystine. Les principaux milieux utilisés pour l'isolement et la culture sont le milieu de Francis, le milieu de McCoy et Chapin ou une gélose chocolat enrichie. Sur ces milieux, après incubation à 37 °C, la culture apparaît en deux à quatre jours (Euzéby, 2005).

Éléments d'épidémiologie

Francisella tularensis est responsable de la tularémie, maladie des mammifères portant un grand nombre de noms vernaculaires ("rabbit fever", "hare fever" ou "lemming fever").

- Vecteur et réservoir

Les cycles de transmission de *F. tularensis*, sont extrêmement complexes et sont très variables d'un pays à l'autre.

La tularémie, maladie induite par la bactérie, est une maladie saisonnière avec des pics d'épidémies correspondant aux infections acquises par morsures de tiques en été et à celles acquises durant la chasse en hiver.

Les principaux réservoirs de *Francisella tularensis* sont les lagomorphes, les micro-mammifères sylvicoles et les tiques. Les épisodes d'épidémie chez l'Homme sont souvent parallèles à des épisodes d'épizootie (Ellis *et al.*, 2002). De très nombreux arthropodes ont été impliqués dans la transmission de la tularémie à leurs hôtes mammifères y compris l'Homme. En Europe, les tiques *Dermacentor reticulatus* et *Ixodes ricinus* sont les vecteurs principaux. Les tiques constituent un réservoir à part entière de la maladie. En France, la tularémie est due à *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Elle sévit dans de nombreuses régions. L'Homme se contamine surtout à partir du lièvre qui est le révélateur de l'épizootie. La bactérie étant capable de traverser la peau saine, la simple manipulation d'un cadavre peut suffire à transmettre l'infection. La tularémie est donc avant tout une zoonose professionnelle ou de loisir.

- Répartition géographique

La tularémie est endémique dans tout l'hémisphère Nord à l'exception du Royaume Unis.

- Importance

Chez l'Homme, le nombre de cas a décliné depuis les années 50. Il était aux environs de 120 à la fin des années 90 aux Etats-Unis (CDC). En France, durant la même période l'incidence de la maladie chez l'Homme a été estimée à 60 cas par an. On ne connaît pas la prévalence de la maladie chez les réservoirs animaux.

Manifestation clinique

Les manifestations cliniques de la maladie chez les animaux sont aussi diverses que chez l'Homme et s'accompagnent également d'un syndrome fébrile aiguë. La maladie est potentiellement mortelle suivant la sous-espèce en cause (Ellis *et al.*, 2002 ; Feldmann, 2003).

2 **Agents pathogènes dont la transmission par les tiques est suspectée : le cas de *Bartonella* sp.**

Éléments de bactériologie

Les bactéries du genre *Bartonella* sont de petits cocco-bacilles aérobies Gram négatifs intracellulaires facultatifs. On compte aujourd'hui 22 espèces ou sous-espèces dont 11 sont pathogènes pour l'Homme (*B. bacilliformis* ; *B. quintana* ; *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. grahamii*, *B. washoensis* et *B. koehlerae*) (Tableau 8).

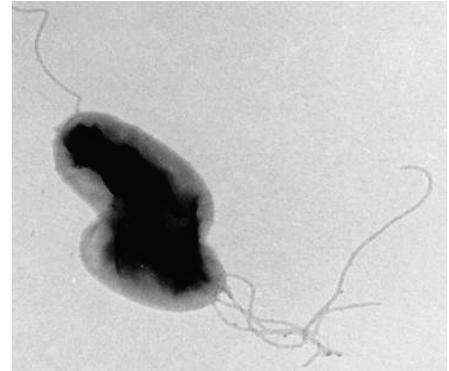


Figure 18 : *B. chomelii* en microscopie électronique (photo : UMR BIPAR)

Bartonella sp. se cultive des milieux contenant un minimum de 5% de sang de lapin ou de cheval et en général une atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂ à une température de 34 à 37 C. Pour l'isolement, la culture nécessite une incubation prolongée, toujours supérieure à 4 jours et pouvant atteindre 4 semaines (Boulouis *et al.* 2005).

Éléments d'épidémiologie

- Vecteurs et réservoirs

Les bactéries du genre *Bartonella* sont des bactéries hémotropes responsables d'infections émergentes chez l'homme et l'animal et transmises par différents vecteurs arthropodes. Les connaissances que l'on a de l'épidémiologie des infections induites par les *Bartonella* sont encore parcellaires. La spécificité d'hôte, les réservoirs ou les vecteurs de nombreuses espèces de *Bartonella* restent à définir.

L'hôte réservoir de la bactérie varie selon les espèces de bactéries. Il s'agit de mammifères sauvages ou domestiques (Tableau 8).

- Répartition géographique

La répartition géographique des *Bartonella* sp. semble liée à la répartition de leurs hôtes ou de leurs vecteurs quand ils sont connus. Ainsi, *B. bacilliformis* est transmise en Amérique du Sud par un vecteur arthropode, le phlébotome (*Lutzomyia verrucarum*) (Alexander, 1995). *B. quintana*, l'agent de la fièvre des tranchées, a pour principal vecteur le pou de corps, *Pediculus humanus corporis* et a une répartition mondiale. *B. henselae*, responsable de la Maladie des Griffes du Chat (MGC), *B. clarridgeiae* et *B. koehlerae* seraient transmises par les puces (*Ctenocephalides felis*) avec une répartition mondiale (Boulouis et Chomel, 2004). Parmi les espèces de *Bartonella* infectant les ruminants, deux ont été décrites chez le chevreuil (*Capreolus capreolus*) en Europe : *B. schoenbuchensis* et *B. capreoli* (Bermond et al., 2002) et les deux autres, chez les bovins (*Bos taurus*), *B. bovis* (Bermond et al., 2002) en Europe et en Amérique du nord et *B. chomelii* (Maillard et al., 2004) en Europe.

- Importance

Chez l'homme, la maladie des griffes du chat à *B. henselae* est la plus importante des bartonellose. Elle est relativement fréquente puisque la prévalence est de 9,3 pour 100 000 habitants aux Etats-Unis et la séroprévalence, de 4 à 6% dans la population française (Euzéby, 2005).

Chez l'animal, le pourcentage de chats bactériémiques à *Bartonella* sp. varie de 8.1% en région lyonnaise (Rolain et al., 2004) à 16% chez des chats domestiques en région parisienne (Boulouis et Chomel, 1999) et 53% chez des chats errants de la région de Nancy (Heller et al., 1997).

Rôle potentiel des tiques dans la transmission de *Bartonella* spp.

Le rôle des tiques dans la transmission de nombreuses espèces de *Bartonella*, soit comme vecteur principal soit comme vecteur secondaire, a souvent été évoqué. Si ce rôle n'a jamais pu être démontré avec certitude, de nombreuses études suggèrent une relation entre tiques et *Bartonella* spp. (Belongia, 2002).

La détection d'ADN de *Bartonella* sp. dans des extraits d'ADN de différentes espèces de tiques collectées sur le terrain est un premier indice de la relation « tique-*Bartonella* ». Ainsi, une étude menée aux Etats-Unis fait état d'un taux d'infection de tiques *Ixodes*

pacificus collectées en Californie allant jusqu'à 20%. Les séquences d'ADN obtenus étaient similaires aux séquences du gène de la citrate-synthase de différentes espèces de *Bartonella* : *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. washoensis*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* ainsi que *Bartonella bovis* (Chang *et al.*, 2001). D'autres études similaires ont permis d'identifier *B. henselae* dans 38 à 44% des tiques *Ixodes scapularis* en Russie (Morozova *et al.*, 2004) ou *Bartonella* sp. dans 34,5% des tiques *Ixodes scapularis* récoltées dans le New Jersey (Adelson *et al.*, 2004). Les espèces du genre *Dermacentor* semblent également porter des *Bartonella* sp. puisque de 8 à 14% de tiques *Dermacentor* sp. se sont révélées porteuses d'ADN de *Bartonella* dans une étude menée en Californie (Chang *et al.*, 2002). Des études moléculaires sur le portage d'ADN de *Bartonella* par des tiques collectées sur leur hôte, humain (Sanogo *et al.*, 2003b) ou animal (Schouls *et al.*, 1999), ont également corroboré cette hypothèse.

Un second aspect qui permet de soupçonner l'intervention des tiques dans le cycle de transmission de *Bartonella* spp. est la description fréquente de cas de co-infections par *Bartonella* sp. et des agents pathogènes dont la transmission par les tiques est démontrée comme *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp. et *Ehrlichia* sp. Ainsi de nombreuses études font état de preuves sérologiques et moléculaires de co-infections par *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* et *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp. et/ou *Ehrlichia* sp chez l'Homme ou l'animal (Baneth, 1998 ; Hofmeister *et al.*, 1998; Kordick *et al.*, 1999 ; Welch *et al.*, 1999 ; Suksawat *et al.*, 2001 ; Tuttle *et al.*, 2003). Des cas humains d'infection par un agent pathogène transmis par les tiques se sont révélés être des cas de co-infections par cet agent et une *Bartonella* sp. comme par exemple des neuroborrelioses atypiques (Eskow *et al.*, 2001 ; Belongia *et al.*, 2002)

Enfin, des éléments épidémiologiques corroborent cette hypothèse : une étude menée aux Etats-Unis a démontré que les chiens séropositifs pour *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* avaient 14 fois plus de chance d'avoir un historique d'infestation massive par les tiques (Pappalardo *et al.*, 1997). De même, des cas d'affection à *Bartonella henselae* ont été décrits chez des patients avec un historique de morsure de tique (Lucey *et al.*, 1992).

Manifestations cliniques

Les bartonelloses sont principalement des maladies humaines dont la gravité varie en fonction de l'espèce en cause. Les affections induites sont en général bénignes chez les individus immunocompétents mais peuvent avoir des conséquences dramatiques chez les individus immunodéprimés.

Le pouvoir pathogène chez l'animal semble absent chez les espèces réservoirs mais a été décrit chez le Chien et chez le Chat, chez qui les *Bartonella* peuvent induire des affections proches de celles décrites chez l'Homme (Boulouis *et al.* 2005).

Tableau 8 : Distribution, hôtes réservoirs et hôtes accidentels des différentes espèces de *Bartonella*. Les espèces en gras-grisé sont celles retrouvées en Europe.

<i>Bartonella</i> spp.	Hôte réservoir	Hôte accidentel	Vecteur	pathologie humaine associée	distribution géographique
<i>B. bacilliformis</i>	homme		phlébotome	maladie de Carrion	Cordillère des Andes
<i>B. quintana</i>	homme	Chat ?	poux	fièvre des tranchées	mondiale
<i>B. henselae</i>	Chat	Homme, Chien	puce autres ?	maladie des griffes du chat	mondiale
<i>B. clarridgeiae</i>	Chat	Homme, Chien	puce ? autres ?	maladie des griffes du chat	Amérique du nord et Europe
<i>B. koelherae</i>	Chat	Homme	puce ? autres ?	endocardite	Amérique du nord
<i>B. washoensis</i>	Ecureuil terrestre	Homme, Chien	puce ? autres ?	myocardite et fièvre persistante	Amérique du nord
<i>B. vinsonii</i>	rongeurs, Canidés sauvages et domestiques	Homme, Chien	tiques ? autres ?	endocardites	Europe (<i>B. v. berkhoffii</i>) Amérique du nord (<i>B. v. berkhoffii</i> , <i>B. v. arupensis</i> , <i>B. v. vinsonii</i>)
<i>B. elizabethae</i>	Rat ?	Homme, Chien	?	endocardite	Amérique du nord
<i>B. grahamii</i>	rongeurs	Homme	?	neurorétinite	Europe
<i>B. tribocorum</i>	Rat	?	?	?	Europe
<i>B. rattimassiliensis</i>	Rat	?	?	?	France autres ?
<i>B. phoceensis</i>	Rat	?	?	?	France autres ?
<i>B. peromysci</i>	rongeurs	?	?	?	Europe
<i>B. doschiai</i>	rongeurs	?	?	?	Europe
<i>B. taylorii</i>	rongeurs	?	?	?	Europe
<i>B. birtlesii</i>	rongeurs	?	?	?	Europe
<i>B. talpae</i>	Taupe	?	?	?	Europe
<i>B. alsatica</i>	Lapin	?	?	?	Europe
<i>B. bovis</i>	Vache	Chat ? autres ?	?	?	Amérique du nord et Europe
<i>B. chomelii</i>	Vache	?	?	?	France Europe ?
<i>B. schoenbuchensis</i>	Chevreuil	?	?	?	Europe
<i>B. capreoli</i>	Chevreuil	?	?	?	Europe

3 Co-infections par plusieurs agents pathogènes chez les tiques et leurs hôtes

Certaines espèces de tiques, notamment celles du genre *Ixodes* sp., sont les vecteurs de plusieurs bactéries pathogènes. Par exemple, *Ixodes scapularis* est, aux Etats-Unis, à la fois le vecteur de *B. burgdorferi* sensu lato et d'*Anaplasma phagocytophilum* et peut également transmettre *Babesia microti*, un protozoaire agent de babésioses. En Europe, *Ixodes ricinus* peut transmettre également *B. burgdorferi* sl et *A. phagocytophilum* mais aussi certaines espèces de *Rickettsia* du groupe boutonneux ainsi que *Babesia microti* et *Babesia divergens* (Boussieras et Chermette, 1991 ; Belongia 2002 ; Levin et Fisch, 2000).

Une tique peut être infectée par plusieurs agents pathogènes en même temps (Schwarz *et al.*, 1997a ; Leutenegger *et al.*, 1999 ; Levin et Fish, 2000 ; Belongia, 2002 ; Skotarczak *et al.*, 2002, Adelson *et al.*, 2004). *B. burgdorferi* ss et *Anaplasma phagocytophilum* ont ainsi été détectés simultanément dans 2% d'une cohorte de tiques collectées en Suisse (Leutenegger *et al.*, 1999) et 5.5% des nymphes *I. scapularis* collectées aux Etats Unis dans la région de New York (Schwarz *et al.*, 1997a). Une étude récente menée sur des tiques *Ixodes scapularis* collectées dans le New jersey a montré que 14% des tiques étaient porteuses d'ADN de plusieurs agents pathogènes dont *Bartonella* sp., *Borrelia burgdorferi* ss, *Anaplasma phagocytophilum*, et *Babesia microti* (Adelson *et al.*, 2004). La fréquence des co-infections est variable et les infections simples sont plus fréquentes que les infections multiples, mais les connaissances actuelles sur ces co-infections restent limitées (Belongia, 2002).

Des études expérimentales de co-infections de tiques *Ixodes scapularis* par *B. burgdorferi* et *A. phagocytophilum* ont montré que l'acquisition d'un des deux agents pathogènes par une tique est indépendante de son statut d'infection initial. Les tiques co-infectées transmettent chacun des deux agents pathogènes de manière aussi efficace que les tiques mono-infectées. Il ne semble donc pas y avoir de relation d'exclusion ou de favorisation entre les bactéries. Selon les auteurs, le fait que les tiques adultes sont beaucoup plus co-infectées que les nymphes suggère qu'une co-infection chez une tique provient d'avantage d'une acquisition successive des agents pathogènes au cours de repas

sanguins différents plus qu'une acquisition simultanée sur un hôte co-infecté (Levin et Fish, 2000).

Chez l'hôte, des manifestations cliniques ou sérologiques de co-infections par plusieurs agents pathogènes transmis par les tiques sont fréquemment décrites (Magnarelli *et al.*, 1995 ; Mitchell *et al.*, 1996 ; Hofmeister *et al.*, 1998 ; Kordick *et al.*, 1999 ; Eskow *et al.*, 2001 ; Belongia, 2002). Chez les patients présentant une maladie à tiques avérée, les taux de co-infection atteignent 39% aux Etats-Unis (Belongia, 2002). Les études cliniques montrent que les patients infectés par plusieurs agents pathogènes présentent souvent des symptômes plus sévères et moins spécifiques (Eskow *et al.*, 2001 ; Belongia, 2002).

Une co-infection clinique peut résulter de deux modes de transmission distincts. Elle peut être acquise soit au cours de la morsure d'une seule tique co-infectée soit au cours de morsures concomitantes de plusieurs tiques infectées par des bactéries pathogènes différentes. La distinction est rarement faite entre ces différentes voies de transmission et l'on connaît mal les relations existant entre les différentes bactéries infectant la tique (Belongia, 2002).

III Outils de détection moléculaire des bactéries pathogènes dans leur vecteur

Les agents pathogènes bactériens peuvent être détectés dans leur vecteur par différentes techniques conventionnelles comme l'immunofluorescence indirecte, l'isolement en culture, sur milieu inerte ou en culture cellulaire, ou en utilisant les techniques de coloration histologique. Ces différentes techniques manquent souvent de sensibilité et de spécificité ou sont lourdes à mettre en place. Elles sont difficilement adaptables à des études sur de larges échantillonnages. Le développement des techniques de détection moléculaire, en particulier la Polymerase Chain Reaction (PCR), a permis d'améliorer considérablement les connaissances que l'on a des bactéries pathogènes transmises par les tiques. Les PCR peuvent être effectuées sur tiques entières ou sur tiques disséquées, en ne conservant que les pièces buccales, le tube digestif et les glandes salivaires (Sparagano *et al.*, 1999). La dissection permet de cibler les organes où la présence des agents pathogènes est fortement

liée à un risque de transmission mais nécessite de travailler sur du matériel frais et s'applique plus difficilement à des tiques conservées dans l'éthanol.

De nombreux couples d'amorces ont été définis et utilisés pour la détection des agents pathogènes. Cependant, tous n'ont pas été validés pour la recherche de ces agents dans les tiques et dans un contexte d'étude de terrain. Ne seront présentés ici que des couples d'amorces ayant été utilisés spécifiquement pour la détection des agents pathogènes ciblés dans les tiques. Les couples d'amorces présentés dans cette partie sont rassemblés dans les tableaux 9a et 9b.

III.1 Famille des Anaplasmataceae

1 Amplification de tous les représentants des Anaplasmataceae

La proximité phylogénétique au sein des *Anaplasmataceae* a permis l'utilisation d'amorces à large spectre pour l'amplification de tous les représentant de la famille. Ainsi, le couple d'amorces EHR16SR et EHR16SD permet l'amplification d'un fragment de 345 pb du gène de l'ARNr 16S de toutes les bactéries des genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, et même *Wolbachia*. (Parola *et al.*, 2000). Un autre couple d'amorces, Ehr521 et Ehr747 (ou Ehr790), permet également d'amplifier l'ADNr 16S de l'ensemble des représentants de la famille ; il a récemment été utilisé dans une étude menée dans le Maghreb pour étudier la diversité génétique des *Anaplasmataceae* dans cette zone (Sarih *et al.*, 2005).

Cette proximité phylogénétique a également une contrepartie comme l'ont souligné certains auteurs. Ainsi, ce dernier couple d'amorces avait initialement été dessiné pour amplifier spécifiquement un fragment d'ADNr 16S d'*A. phagocytophilum* (Kolbert, 1996). Il s'est révélé trop peu spécifique puisqu'il permettait également d'amplifier l'ADN de nombreux genres proches et de bactéries appartenant aux familles des Rickettsiaceae (*R. rickettsii*) et des Bartonellaceae (*B. henselae*) (Massung et Slater, 2003 ; Shukla *et al.*, 2003). Les auteurs insistent sur le fait que de nombreuses études menées avec de tels couples d'amorces surestiment considérablement le portage de certains agents par les tiques et modifient donc les données épidémiologiques.

2 Ehrlichia spp.

La détection des bactéries du genre *Ehrlichia* dans les tiques repose principalement sur l'amplification de fragments de l'ADNr 16S. Plusieurs couples d'amorces partagent l'amorce anti-sens HE3 qui s'hybride dans une région conservée au sein du genre. Des amorces sens, spécifiques d'espèces, sont utilisées pour *E. chaffeensis*, *E. canis* et *E. ewigii* (Anderson *et al.*, 1993 ; Murphy *et al.*, 1998 ; Kocan *et al.*, 2000).

La détection de *Ehrlichia* (ex-*Cowdria*) *ruminantium* dans les tiques repose sur l'amplification de 3 zones différentes du génome, un fragment d'un gène de fonction inconnue, le PCS20, un fragment du gène map1 et un fragment spécifique d'ADNr 16S d'*E. ruminantium*. C'est l'amplification du PCS20 qui s'est révélée être la plus sensible lors d'essais de terrain (Allsopp *et al.*, 1998).

3 Anaplasma spp.

La détection moléculaire d'*Anaplasma* spp. dans les tiques utilise différentes cibles moléculaires, suivant que les espèces recherchées sont *Anaplasma* sp. infectant les globules rouges des ruminants, *A. platys* ou *A. phagocytophilum*. A l'heure actuelle aucune étude ne fait état d'outils destinés à la détection de l'ensemble des représentants du genre.

Anaplasma marginale

La détection d'*Anaplasma marginale* dans les tiques a été menée sur des tiques *Dermacentor andersoni* et *Boophilus microplus* à différents stades en amplifiant des fragments des gènes msp 1 bêta (Stich *et al.*, 1993) ou msp5 (De Moura *et al.*, 2003 ; Shimada *et al.*, 2004)

Anaplasma platys

La détection d'*Anaplasma platys* dans les tiques repose sur l'amplification d'un fragment d'ADNr 16S en utilisant, PLATYS, un primer sens spécifique et le primer anti-sens

à large spectre *Anaplasmatacea*, EHR16SD. Ceci permet l'amplification d'un fragment d'environ 680 pb de l'ADNr 16S d'*A. platys* (Inokuma *et al.*, 2000).

Anaplasma phagocytophilum

La détection par PCR spécifique d'*A. phagocytophilum* a posé certains problèmes liés au manque de spécificité des primers utilisés. Massung et Slater proposent trois couples de primers adaptables à la détection spécifique d'*Anaplasma phagocytophilum* à l'exclusion de toute autre espèce bactérienne proche. Les deux premiers de ces couples (ge3a ; ge10r ; ge9f ; ge2r) permettent une PCR nichée sur un fragment d'environ 300 pb du gène de l'ARNr 16S d'*A. phagocytophilum* (Massung *et al.*, 1998) et le dernier (msp2-3f-msp2-3r) permet l'amplification d'un fragment du gène msp2. Cependant pour ce dernier couple d'amorces, il semble que, si la sensibilité est relativement bonne, la reproductibilité des PCR avec des kits de PCR différents est, elle, assez mauvaise (Massung et Slater, 2003).

III.2 *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Plusieurs cibles moléculaires permettent la détection de *B. burgdorferi sensu lato* dans les tiques. Parmi les gènes les plus couramment utilisés, le gène de l'ARNr ribosomal 16S (Marconi et Garon, 1992), le gène codant pour la flagelline (Johnson *et al.*, 1992), la zone intergénique 5S-23S (Rijpkema *et al.*, 1995) ont tous été utilisés dans des enquêtes de terrain (Sparagano *et al.*, 1999). Le gène codant pour la protéine de surface *ospA* est également une cible potentielle pour la recherche des *Borrelia* dans les tiques (Pichon *et al.*, 1995). L'amplification PCR du gène *OspA* suivie d'une analyse des fragments générés en SSCP (Guttman *et al.*, 1996) ou en RFLP (Michel *et al.*, 2004) permet en outre de distinguer les différentes espèces infectant des tiques *I. ricinus*.

Une dernière approche a permis d'identifier 3 plasmides contenant des séquences spécifiques d'espèces : un plasmide de 16 kb pour *B. burgdorferi ss*, un plasmide de 25 kb pour *B. afzelii* et un plasmide de 33 kb pour *B. garinii*. D'après cette étude, un grand nombre de tiques portent des *Borrelia* non identifiées, et les co-infections sont fréquentes (Misonne et Hoet, 1998).

III.3 Rickettsia spp.

Bien souvent la détection, et surtout l'identification moléculaire des *Rickettsia* sp. dans les tiques, passe par une étape initiale de culture cellulaire, suivie de l'amplification PCR. Cependant, l'application directe de la PCR à des extraits d'ADN de tique est possible. Il existe différents couples d'amorces, ciblant différentes parties du génome, et permettant l'amplification, soit de l'ensemble des *Rickettsia* spp., soit de certains membres du genre. Un couple d'amorces ciblant un fragment de 380 pb du gène de la citrate synthase est fréquemment utilisé et permet la détection de toutes les *Rickettsia* spp.. Les gènes de protéines de surface *OmpA* et *OmpB* sont également des cibles de choix (Regnery *et al.*, 1991). Ils ne sont présents que chez les *Rickettsia* du groupe boutonneux strict et ne permettent pas l'amplification de bactéries telles que *R. helvetica*, *R. australis*, *R. bellii*, *R. canadensis*. Enfin, un couple d'amorces permettant l'amplification du gène de l'antigène de surface de 17kDa a également été utilisé dans des enquêtes de terrain sur des tiques (Sparagano *et al.*, 1999; Simser *et al.*, 2001).

III.4 Coxiella burnetii

De nombreuses cibles moléculaires ont été utilisées pour la détection et l'identification de *C. burnetii* dans des prélèvements cliniques. Parmi elles, on peut citer le gène de l'ARN ribosomal 16S, le gène de la superoxyde dismutase, le gène codant pour une protéine immunogène de 62 kDa ou des régions hautement conservées d'ADN plasmidique. Parmi ces cibles, seule cette dernière a été utilisée dans une étude sur des tiques (Spyridaki *et al.*, 2002).

III.5 Francisella tularensis

La détection de *F. tularensis* dans les tiques repose sur l'amplification du gène TUL4 codant pour la protéine antigénique de surface de 17 kDa (Higgins *et al.*, 2000).

III.6 Bartonella spp.

Deux gènes ont été utilisés pour détecter *Bartonella* sp. dans les tiques. Le gène de l'ARNr 16S (Adelson *et al.*, 2004) et celui de la citrate synthase (*gltA*) (Chang *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2002).

III.7 Détection de plusieurs agents pathogènes dans les tiques

Face au très grand nombre d'agents pathogènes bactériens potentiellement transmis par la même espèce de tique, la détection en une seule fois de plusieurs d'entre eux est devenu un challenge intéressant pour de nombreux chercheurs. Les PCR à large spectre ciblant plusieurs bactéries sont fréquemment utilisées. D'autres techniques sont actuellement développées telles que la PCR multiplex ou les puces à ADN.

1 PCR à large spectre

L'utilisation d'amorces permettant l'amplification non sélective de plusieurs agents pathogènes transmis par les tiques a déjà été présentée pour la famille des *Anaplasmataceae*. D'autres couples d'amorces, plus larges, ciblant le gène de l'ARN ribosomal 16S, permettent d'amplifier l'ADN des Rickettsiales mais également celui de membres de la famille des gamma-protéobactéries comme *C. burnetii* (Weissburg *et al.*, 1989 ; Bernasconi *et al.*, 2002).

2 Puces à ADN

Une récente étude propose l'utilisation d'une puce à ADN permettant la détection de *Borrelia* sp., *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. *Coxiella burnetii* et *Francisella tularensis*. Cette technique repose sur l'amplification non spécifique d'un fragment du gène de l'ARN ribosomal 16S de l'ensemble des bactéries avec un couple d'amorces à large spectre eubactérien. Le produit PCR obtenu est hybridé avec une puce composée de différentes sondes internes au fragment et spécifiques de l'ADNr 16S des espèces bactériennes pathogènes ciblées. L'application de cette technique à l'étude d'échantillons de tiques n'est pas encore validée (Blaskovic et Barak, 2005).

3 PCR multiplexe

La PCR multiplexe offre, elle aussi, des perspectives intéressantes pour l'étude de plusieurs bactéries pathogènes transmises par les tiques. La difficulté de la mise au point de la technique, qui demande des couples d'amorces homogènes et des conditions d'amplification adaptées, fait qu'il y a finalement peu d'applications à l'étude du portage bactérien par les tiques. Récemment, cependant, une équipe a pu mettre en évidence simultanément la présence d'ADN de *B. burgdorferi* et *A. phagocytophilum* dans des tiques par PCR multiplexe en temps réel (Courtney *et al.*, 2004). Cette technique présente un intérêt majeur mais reste limitée à la détection d'un petit nombre d'agents.

III.8 Bilan sur la détection moléculaire de bactéries pathogènes dans les tiques

La PCR s'est révélée être un outil puissant pour la détection de bactéries pathogènes dans les tiques et le nombre croissant d'études moléculaires de portage d'agents pathogènes par des vecteurs arthropodes en témoigne.

Plusieurs facteurs limitants doivent néanmoins être pris en compte lors de son application à l'étude des tiques. Il semble tout d'abord que les échantillons d'ADN extraits de tiques contiennent de nombreux inhibiteurs de PCR (Sparagano *et al.*, 1999). Les composants du repas sanguin, en particulier pour les tiques gorgées, peuvent ainsi inhiber la PCR et conduire à une sous-estimation du taux de portage des tiques (Schwarz *et al.*, 1997b). L'étape d'extraction de l'ADN est cruciale pour limiter ces biais.

Certains auteurs proposent, quand elle est possible, une mise en culture préalable de l'agent pathogène à partir de la tique avant d'effectuer l'étude moléculaire. Ceci augmente la lourdeur des études.

Un regard rétrospectif sur les résultats de près de deux décennies d'études conduit à énoncer certaines règles pour garantir l'obtention d'une information fiable et de qualité. Les études doivent tenir compte d'impératifs de spécificité et de sensibilité. La qualité de l'extraction d'ADN est un point fondamental sur lequel nous reviendrons dans notre première

partie expérimentale. Le choix des amorces est essentiel et il est important de vérifier la fiabilité des résultats postifs par une étape de séquençage (Shukla *et al.*, 2003).

Les perspectives offertes par la PCR en temps réel en terme de qualité de lecture et de facilité d'emploi ouvrent de nouveaux horizons pour la détection des agents pathogènes dans les tiques (Courtney *et al.*, 2004).

Enfin, un résultat positif en PCR n'implique pas systématiquement que l'échantillon étudié contienne un agent pathogène viable et potentiellement infectieux. Le repas sanguin peut contenir des agents pathogènes infectant l'hôte, mais qui ne survivront pas dans la tique. Ceci peut conduire à une méconnaissance des cycles de transmission des agents pathogènes (Sparagano *et al.*, 1999). Il faut impérativement rester prudent sur l'interprétation des résultats obtenus en PCR. La détection d'ADN de bactérie pathogène dans une tique ne peut en aucun cas être considérée comme une preuve de transmissibilité ou d'infection. C'est un indicateur épidémiologique utile et elle doit être utilisée comme tel.

Tableaux 9a et 9b p 69-70 : principaux couples d'amorces utilisés pour la détection d'ADN de bactéries pathogènes dans les tiques

agent ciblé	séquence des amorces	gène amplifié	taille du fragment	référence
famille des <i>Anaplasmea</i> entière	EHR16SD: 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' EHR16SR: 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	16S rRNA	345	Parola <i>et al.</i> , 2000
<i>E. chaffeensis</i>	HE1: 5'-CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3' HE3: 5'-ATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATA-3'	16S rRNA	389	Anderson <i>et al.</i> , 1993
<i>E. canis</i>	ECAN5 :5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3' HE3: 5'-ATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATA-3'	16S rRNA	389	Murphy <i>et al.</i> , 1998
<i>E. ewingii.</i>	EE5 5'-CAATTCCTAAATAGTCTCTGACTATT-TAG-3' HE3: 5'-ATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATA-3'	16S rRNA	389	Kocan <i>et al.</i> , 2000
<i>E. ruminantium</i>	AB128 : CTAGTAGAAATTGCACAATCTAT-3' AB129 : TGATAACTTGGTGCGGGAAATCCTTT-3'	pCS20	279	Allsopp <i>et al.</i> , 1998
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<u>nested PCR</u> : F1 : GE3a 5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3' R1 : GE10r: 5'-GGAGATTAGATCCTTCTTAACGGAA-3'	16S rRNA	932	Massung <i>et al.</i> , 1998
	F2 : GE9f: 5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3' R2 : GE2r : 5'-GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'		546	
<i>Anaplasma platys</i>	PLATYS; 5'-GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG-3' EHR16SR: 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	16S rRNA	678	Inokuma <i>et al.</i> , 2000
<i>Anaplasma marginale</i>	BAP-2 : 5'-GTATGGCACGTAGTCTTGGGATCA-3' AL34S :5'-CAGCAGCAGCAAGACCTTCA-3'	msp1-beta	409	Stich <i>et al.</i> , 1993
	<u>Semi nested PCR</u> : F1 : 5'-GCATAGCCTCCCCCTCTTTC-3' R1 : 5'-GCATAGCCTCCCCCTCTTTC-3' F2 : 5'-GCATAGCCTCCCCCTCTTTC-3'	msp-5	457	De Moura <i>et al.</i> , 2003
Rickettsiales + <i>Coxiella burnetii</i>	fD1 : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' rp2 : 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	16 rDNA	1484	Weisburg <i>et al.</i> , 1989
toute <i>Rickettsia spp.</i>	F : RpCS.877p: 5'-GGGGCCTGCTCACGGCGG-3' R : RpCS.1258n: 5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'	<i>gltA</i> (citrate synthase)	381	Parola <i>et al.</i> , 2000
toutes <i>Rickettsia</i> SFG exceptées <i>R. helvetica</i> , <i>R. australis</i> , <i>R. bellii</i> , <i>R. canadensis</i>	F1 : Rr190.70p: 5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3' R1 : Rr190.602n: 5'-AGTGCAGCATTGCTCCCCCT-3' R2 : Rr190.701n: 5'-GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3'	ompA	532	Regnery <i>et al.</i> , 1991
toutes <i>Rickettsia</i> SFG exceptées <i>R. helvetica</i> , <i>R. bellii</i> , <i>R. massiliae</i>	BG1-21: 5'-GGCAATTAATATCGCTGACGG-3' BG2-20: 5'-GCATCTGCACTAGCACTTTC-3'	ompB	650	Eremeeva <i>et al.</i> , 1994
toutes <i>Rickettsia</i> SFG	Rr17 492n : 5'-CATTGTTTCGTGAGGTTGGCG-3' Rr17 61p : 5'- GCTCTTGCAACTTCTATGTT	17 Kda protéine	434	Simser <i>et al.</i> , 2001

agent ciblé	séquence des amorces	gène amplifié	taille du fragment	référence
<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	nested PCR : (1), 5'-AAA AAA TAT TTA TTG GGA ATA GG-3', (2), 5'-GT TTT TTT GCT GTT TAC ACT AAT TGT TAA-3', internal(1), 5'-GGAGTA CTT GAA GGC G-3' internal(2),5'-GCT TAA AGT AAC AGT TCC-3',	<i>ospA</i>	702 345	Guttman <i>et al.</i> , 1996
	nested PCR : fla outer 1: 5'- AAGTAGAAAAAGTCTTAGTAAGAATGAAGGA fla outer 2: 5'- AATTGCATACTCAGTACTATTCTTTATAGAT fla inner 1: 5'- CACATATTCAGATGCAGACAGAGTTCTA fla inner 2: 5'-GAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGT	<i>fla</i>	390	Johnson <i>et al.</i> , 1992
	5SCB: 5'-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG 23SN2: 5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA	espace intergénique ARNr23S- ARNr5S	226	Rijkema <i>et al.</i> , 1995
	16S rRNA LDF: 5'-ATGCACACTTGGTGTAACTA 16S rRNA LDR: 5'-GACTTATCACCGGCAGTCTTA	16S ARNr	357	Marconi et Garon, 1992
	59-TAAAGTTTTGCATAAGC-39 59-TACTAAAGGTGTTTCTCC-39	plasmide PMC52 (séquence MC16)	395	Misonne et Hoet, 1998
<i>B. garinii</i>	59-CTAACCGCACTAACAGCAGCAAT-39 59-AGTTTTTCATTAGCAGCAA-39	plasmide PMC159 (séquence MC33)	236	Misonne et Hoet, 1998
<i>B. afzelii</i>	59-AGAAGGAGATAAAAAGAAC-39 59-AAAAAGGTATAGCACAGT-39	plasmide PMC18 (séquence MC25)	125	Misonne et Hoet, 1998
<i>Francisella tularensis</i>	MS2 : 5'-CTTCAGCTAAAGATACTGCTGC-3_ MA2 : 5'-GCACTTAGAACC TTC TGG AGC C-3	TUL4	187	Higgins <i>et al.</i> , 2000
<i>Coxiella burnetii</i>	Coxtrans1 : 5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C Coxtrans2 : 5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC	Transposon-like région	687	Lorenz <i>et al.</i> , 1998
	nested PCR : Hfrag:5'-ATT GCT ATC ACT GAG GGT GAC G-3' Hfrag2:5'-CTG ACG AAG AAG CAG CAT TAG C-3'	région plasmidique conservée	508	Spyridaki <i>et al.</i> , 2002
	HF1 : 5'-TCC TAA ACA AGT GAT GGT CTC C-3' HF2 :5'-TTC GCA GAA GTC AGC TAT GC-3'		183	
<i>Bartonella</i> spp	781 : 5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG 1137 : 5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA	gltA (citrate synthase)	380	Norman <i>et al.</i> , 1995
	P24E 5'-GGATTCCCTCCTTCAGTTAGGCTGG-3' P12B : 5'-CGGGATCCCGAGATGGCTTTTGGAGATTA-3'	16S rDNA	279	Adelson <i>et al.</i> , 2004

Etude expérimentale chapitre 1 :

Portage d'agents pathogènes bactériens par les tiques

***Ixodes ricinus* en milieu naturel**

I Introduction

Les maladies à tiques sont potentiellement émergentes dans la plupart des pays d'Europe, où les tiques sont les principaux vecteurs de maladies infectieuses chez l'homme (Brouqui *et al*, 2004 ; Parola, 2004). Or la première étape pour évaluer le risque de contracter une maladie dans une région est de connaître sa prévalence dans la zone. Dans le cas des maladies à transmission vectorielle, cette évaluation commence par la détection de l'agent pathogène responsable dans son vecteur en milieu naturel. Comme évoqué précédemment, la détection des agents pathogènes bactériens transmis par les tiques repose à l'heure actuelle sur des techniques moléculaires de PCR présentant l'avantage d'être rapides à mettre en œuvre et sensibles.

Nous avons étudié le portage d'ADN de bactéries pathogènes par les tiques *Ixodes ricinus* en France. Le choix d'*I. ricinus* repose sur le fait qu'il s'agit d'une des espèces de tiques dures les plus fréquentes sur le territoire et certainement la plus impliquée dans la transmission de maladies bactériennes à caractère zoonotique.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique d'extraction d'ADN de tique nous permettant de travailler dans des conditions standardisées, puis, nous avons utilisé ces outils pour des études de terrain.

Nous nous sommes tout d'abord penchés sur le portage d'ADN de *Bartonella* sp. dans une cohorte d' *I. ricinus*, et avons évalué l'occurrence de co-détection d'ADN de *Bartonella* sp. et de deux autres agents pathogènes dont la transmission par les *I. ricinus* est avérée, *B. burgdorferi* et *Babesia* sp.

Nous avons ensuite initié une étude plus vaste visant à déterminer les facteurs de risque pour l'homme et l'animal représentés par les maladies transmises par *I. ricinus* dans une région modèle (Combrailles; Auvergne) en choisissant de détecter l'ADN de trois bactéries pathogènes majeures, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum* et

Rickettsia sp. du groupe boutonneux (collaboration avec l'unité épidémiologique de l'INRA de Clermont-Ferrand-Theix).

II Mise au point des techniques de détection : extraction d'ADN total à partir des tiques :

II.1 Introduction

L'extraction d'ADN à partir de tiques est considérée comme difficile (Hubbard *et al.*, 1995 ; Mauel *et al.*, 1999 ; Sparagano *et al.*, 1999 ; Hill *et al.*, 2003). Les difficultés rencontrées lors de l'extraction à partir des tiques sont dues à la présence d'une cuticule rigide qui rend difficile l'accès aux tissus internes colonisés par les agents pathogènes mais aussi à la présence d'inhibiteurs de PCR dans les tissus de la tique (Hubbard *et al.*, 1995 ; Sparagano *et al.*, 1999).

Notre but était de mettre au point une méthode efficace, standardisée, et suffisamment facile d'emploi pour être applicable à des études de grandes cohortes. Pour cela, nous avons évalué et comparé trois techniques différentes afin de choisir celle qui répondrait le mieux à nos attentes. La première technique associe la dilacération manuelle, grossière de la tique, la lyse enzymatique à la protéinase K et l'extraction avec un kit commercial (Qiamp ; tissue protocol, Qiagen). La seconde technique associe la destruction mécanique des tissus au mortier, la lyse enzymatique à la protéinase K et l'extraction au Phenol-Chlorophorme. La dernière technique associe le broyage fin des tissus de la tique à l'amalgameur à billes (mixer mill MM301, Qiagen) et l'extraction avec un kit commercial (Qiamp ; tissue protocol, Qiagen).

II.2 Article 1: "Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks"

Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menach A, Boulouis HJ Vayssier-Taussat M. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks, *Vet Res.* 2004;35(6):709-13.

II.3 Bilan de la mise au point de la technique d'extraction d'ADN à partir des tiques

La technique retenue consiste en une première étape de broyage fin et automatisé de la tique, suivie d'une extraction d'ADN total utilisant un kit commercial (ici : Qiamp; Qiagen). La qualité de l'extraction d'ADN est confirmée par l'amplification spécifique d'un fragment du gène codant pour l'ARN mitochondrial 16S des tiques (Black et Piesman, 1994).

Les différences d'efficacité de l'extraction observée au cours de l'étude proviennent avant tout de la qualité du broyage initial. Ainsi le broyage au mortier suivi d'une extraction par kit ou au phenol chloroforme offre de bons résultats. De même l'utilisation de l'amalgameur à billes associée à une extraction au phenol-chloroforme a été validée. La limite de ces techniques est leur lourdeur.

La technique que nous avons choisie permet de traiter un grand nombre d'échantillons simultanément (jusqu'à 50 extractions par jour) ; elle est, de ce fait, adaptable à des études de cohortes.

Les résultats présentés dans l'article ont été obtenus sur 110 tiques de différents genres et espèces. Depuis leur publication, cette technique est devenue la technique de référence au laboratoire pour l'extraction d'ADN à partir de tiques. Nous l'avons appliquée avec succès à des études de cohorte comme celles présentées dans la suite du présent travail mais également à d'autres types d'arthropodes comme des insectes (voir infra).

III Détection de *Bartonella* sp. dans des tiques *I. ricinus*

III.1 Contexte et objectif

Comme nous l'avons précédemment évoqué, le genre *Bartonella* regroupe des espèces de bactéries hémotropes responsables d'infections chez l'homme et l'animal et transmises par différents vecteurs arthropodes. Les vecteurs des *Bartonella* ne sont pas tous connus. Les tiques sont supposées intervenir dans les cycles de transmission de différentes espèces de *Bartonella*. De l'ADN de *Bartonella* a été détecté dans des tiques collectées dans leur environnement naturel aux Etats-Unis (Chang *et al.*, 2001; Adelson *et al.*, 2004) et des co-infections par *Bartonella* et plusieurs agents pathogènes transmis par les tiques ont été décrites chez l'homme et l'animal (Kordik *et al.*, 1999 Eskow *et al.*, 2001 ; Belongia, 2002). Le rôle des tiques reste cependant à établir avec certitude.

Cette étude avait pour but, d'une part, de déterminer s'il était possible de détecter de l'ADN de *Bartonella* dans des tiques en milieu naturel en France. Puis, si tel était le cas, nous voulions évaluer l'occurrence des co-infections à *Bartonella* sp. et d'autres agents pathogènes dans ces tiques afin d'établir l'existence d'un risque de co-transmission de plusieurs agents pathogènes par la même tique. Nous avons donc évalué le portage d'ADN de *Bartonella* sp. par des tiques collectées sur le terrain en France par PCR spécifique en testant en parallèle celui de deux autres agents pathogènes, *B. burgdorferi* s.l et *Babesia* sp. dont la vectorisation par les tiques est connue et pour lesquels des co-infections avec *Bartonella* on été décrites chez l'Homme ou l'animal .

III.2 Article 2 : "Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal

***Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp."**

Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. Vet Res 2005;36(1):79-87.

III.3 Bilan de la détection d'ADN de *Bartonella* sp. dans les tiques

Nous avons étudié une cohorte d'environ 100 nymphes et adultes *I. ricinus* collectées sur le terrain. Ce travail a démontré la présence d'ADN de bactéries du genre *Bartonella* dans les tiques *I. ricinus* (9,8% d'infection) en France et l'existence de tiques co-infectées (7,6%) par *Bartonella*, et/ou *B. burgdorferi*, et/ou *Babesia* sp.. Ceci corrobore les conclusions établies par d'autres études (Baneth, 1998 ; Hofmeister *et al.*, 1998; Kordick *et al.*, 1999 ; Suksawat *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2001 ; Belongia, 2002 ; Tuttle *et al.*, 2003 ; Adelson *et al.*, 2004) et confirme l'implication potentielle de *Bartonella* dans des complexes de maladies infectieuses vectorisées par les tiques. L'impact de ces co-infections ne doit pas être sous-estimé et la prise en charge thérapeutique de maladies à tiques atypiques doit également en tenir compte (Belongia, 2002). La description des facteurs écologiques déterminant la co-infection des tiques ainsi que le niveau de risque pour l'homme restent à évaluer et la preuve définitive de l'implication des tiques dans la vectorisation de *Bartonella* ne pourra être apportée que par la mise au point de modèles d'étude de transmission expérimentale.

Les tiques de l'étude ont été collectées dans des zones où paissent des bovins fortement bactériémiques (70.7 % en moyenne) (Maillard, 2004). Ces animaux, sous traitement antiparasitaire, sont peu infestés par les tiques. Chez les bovins en France, les taux d'infection par *Bartonella* spp. sont très élevés. Jusqu'à 100% d'une classe d'âge d'un troupeau peut être infectée et des études menées sur plusieurs troupeaux ont montré une absence de saisonnalité dans l'évolution de la bactériémie à *Bartonella* dans les troupeaux bovins (Maillard, 2004). Les taux d'infection des ruminants sauvages sont également importants (Chang *et al.*, 2000). Dans notre étude, la séquence identifiée était identique à celle de souches de *Bartonella* infectant les ruminants sauvages et le taux de tiques infectées reste faible en comparaison avec les taux d'infection des bovins. Nous avons donc suspecté l'intervention d'un autre vecteur arthropode dans la transmission de la bactérie aux bovins. Nous avons recherché par PCR spécifique de l'ADN de *Bartonella* dans des pupes et des adultes d'autres ectoparasites des ruminants, en particulier les mouches piqueuses de la famille des hippoboscides et nous avons mis en évidence de l'ADN de *Bartonella* sp. en

proportion importante dans les Hippoboscidés. Dans tous les cas, les séquences obtenues étaient similaires à celles de *Bartonella* spp. infectant les ruminants. Au même moment, une équipe Suisse démontrait la présence et la multiplication de *B. schoenbuschensis* dans des *L. cervi* collectés sur des chevreuils (Dehio *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que différents vecteurs et en particulier les Hippoboscidés pourraient intervenir dans la transmission des *Bartonella* sp. aux ruminants. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans « Applied and Environmental microbiology » : « Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. Infecting wild and domestic ruminants » (Voir Annexe 2).

IV Etude épidémiologique du portage d'agents pathogènes bactériens par *Ixodes ricinus* dans les Combrailles.

IV.1 Contexte et objectif

L'étude menée dans les Combrailles est le fruit de la collaboration entre notre équipe et l'équipe d'épidémiologie animale de l'INRA Clermont-Ferrand-Theix initiée en 2003. Elle s'inscrit dans un vaste projet pluriannuel d'évaluation du risque d'émergence de maladies transmises par les tiques.

Le secteur des Combrailles, dans le Puy-de-Dôme en Auvergne, a été choisi comme zone modèle. L'Auvergne est un foyer d'endémie de la borréliose de Lyme pour l'homme (Arzouni, 1990 ; Brun, 2000) et la présence de *Rickettsia* sp. du groupe boutonneux y a été décrite (Parola *et al.*, 1998a). C'est également une zone rurale d'élevage considérée comme endémique pour les maladies à tiques du bétail.

Trois types d'études sont menés pour répondre à trois objectifs complémentaires. Le premier objectif est d'estimer les densités de tiques dans les pâtures naturelles et les milieux forestiers. Le second est d'étudier les facteurs de variation des taux de portage d'agents pathogènes bactériens dans les populations de tiques afin de définir les paramètres du risque. Enfin, le troisième objectif est d'estimer l'incidence des maladies transmises par les tiques chez les bovins et chez l'homme, par des enquêtes épidémiologiques rétrospectives auprès des médecins généralistes et des vétérinaires. Les résultats présentés dans cette

thèse ne concerneront que le deuxième objectif et constituent un état des lieux préliminaires.

IV.2 Echantillonnage, matériel et méthode

1 Zone d'étude

La sélection des sites de prélèvements et la récolte des tiques ainsi que l'analyse des densités de tiques et l'extraction d'ADN ont été réalisées par l'Unité d'Epidémiologie Animale de l'INRA de Clermont-Theix. Parmi les élevages des Combrailles de plus de 30 bovins, 61, soit 5%, ont été tirés au sort à partir de la liste de l'Etablissement Départemental de l'Elevage. Pour chacun de ces 61 élevages, une pâture en prairie naturelle et le bois le plus proche, soit un total de 61 pâtures et 61 bois ont été sélectionnés, comme sites de collecte des tiques. La parcelle choisie est la plus petite des prairies naturelles de l'éleveur et a contenu au moins 5 génisses pendant 3 mois en 2002 et 2003. Ces critères doivent favoriser la présence de tiques.

2 Tiques

Au printemps 2003, pour chaque pâture et bois associé, les tiques, nymphes et adultes, ont été collectées le long des bordures de la pâture par la technique du drapeau (fig 19) (Vassallo *et al.*, 2000). Les échantillonnages ont été effectués à 1 mètre du bord des 61 parcelles et dans les bois les plus proches).



Figure 19 : Collecte de tiques par la technique du drapeau le long d'une «tranche» de végétation.

Le drapeau utilisé est un carré d'1m² en tissu éponge blanc tiré par unité surfacique de 10m² appelée « tranche ». L'opération est répétée tous les 20 m, ce qui permet d'échantillonner un tiers du pourtour de la parcelle. Cette méthode permet la récolte des tiques en activité, à l'affût sur la végétation. Le drap est inspecté et les tiques sont placées dans des

tubes d'éthanol à 70°. Les paramètres environnementaux sont relevés (type de site, végétation, conditions météorologiques).

Après identification des espèces et des stades, le nombre de tiques par tranche a été analysé en fonction des caractéristiques des sites en utilisant des modèles paramétriques adéquats (Unité d'Epidémiologie Animale INRA Clermont-Ferrand-Theix).

Nous avons récolté majoritairement des tiques de l'espèce *Ixodes ricinus* (4476 nymphes, 123 adultes mâles et 102 adultes femelles). Pour les analyses moléculaires, les nymphes ont été poolées par 5, 10 ou 50 individus provenant du même site de collecte (296 pools au total dont 20 pools de 50 ; 220 pools de 10 et 56 pools de 5) et les adultes ont été traités individuellement.

3 Extraction d'ADN et contrôle de l'extraction

L'ADN des pools de nymphes et adultes a été extrait selon le protocole mis au point (Chapitre 1 I) et nous a permis d'obtenir 521 échantillons d'ADN de tiques. Le contrôle de l'étape d'extraction a été réalisé par amplification spécifique d'un fragment d'ADN mitochondrial de tiques sur une sélection aléatoire de 90 échantillons.

4 Amplification par PCR spécifique de l'ADN des bactéries pathogènes

Toutes les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycleur Mastercycler (Eppendorf, France). Chaque réaction a été conduite dans un volume final de 25 µL, contenant 5 µL d'extrait d'ADN de tique, 2,5 µL de tampon PCR 10X, 0,5 µmol/µL de chaque amorce, 2,5 mM de chaque dNTP (Taqara biomedical group, Shiga, Japan), 1 U de Taq polymérase (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Un témoin négatif (eau stérilisée) et un témoin positif ont été inclus à chaque expérience.

La présence d'ADN de *B. burgdorferi* sl a été testée en utilisant un couple d'amorces qui permet l'amplification spécifique d'un fragment d'environ 350 paires de bases du gène de l'ARNr 16S de *B. burgdorferi* sl. (Marconi et Garon 1992). Le témoin positif était un extrait d'ADN de *Borrelia garinii* aimablement fourni par le Dr B. Jaulhac de l'Institut de Bactériologie de Strasbourg.

La présence d'ADN de *A. phagocytophilum* a été testée en utilisant successivement deux couples d'amorces en PCR nichée, permettant d'amplifier spécifiquement un fragment d'environ 550 paires de bases du gène de l'ARNr 16S de *A. phagocytophilum* (Massung *et al.*, 1998). Le témoin positif était un extrait d'ADN de tique positif en PCR pour *A. phagocytophilum*.

La présence d'ADN de *Rickettsia* sp. a été testée en utilisant un couple d'amorces permettant d'amplifier spécifiquement un fragment d'environ 330 paires de bases du gène de l'ARNr 16S de *Rickettsia* sp. (Regnery *et al.*, 1991). Un couple d'amorces permettant d'amplifier spécifiquement un fragment d'environ 530 paires de bases du gène de la protéine d'enveloppe *ompA* des *Rickettsia* sp. du groupe boutonneux (Regnery *et al.*, 1991) a été utilisé pour préciser le résultat en PCR *gltA* pour un échantillon. Le témoin positif était un extrait d'ADN de *Rickettsia conorii* aimablement fourni par le Docteur Rolain du Centre National de Référence des Rickettsies, Marseille.

Les séquences des amorces ainsi que les conditions de réactions PCR sont résumées en Annexe 1.

5 Séquençage et analyse des séquences

Dix-huit produits PCR positifs pour *B. burgdorferi*, 10 pour *Rickettsia* sp. et 8 pour *A. phagocytophilum* ont été séquencés par QIAGEN (Hilden, Allemagne) et les séquences obtenues ont été confrontées aux données de GenBank en utilisant le programme BLASTN de NCBI.

6 Analyses statistiques

Les analyses descriptives préliminaires ont été effectuées à l'aide du logiciel Excel. Les analyses statistiques ont été réalisées par les statisticiens de l'Unité d'Epidémiologie Animale de l'INRA Clermont-Ferrand-Theix. Les taux de portage individuels des nymphes ont été calculés statistiquement à partir des résultats de portage obtenus pour les pools. Les taux de portage individuel des adultes ont été estimés à partir des résultats observés. Les effets du stade, du sexe et de l'habitat ont été évalués par un test de maximum de vraisemblance. Les programmations et l'analyse statistique ont été réalisées sous le logiciel

R 2.0.1 (R-Development Core Team, <http://www.r-project.org>). La valeur de 0,05 a été utilisée comme limite de significativité.

Pour estimer la probabilité de portage individuel des nymphes au sein d'un pool, trois hypothèses ont été considérées comme admises. La première est que si l'un des agents pathogènes est détecté dans un pool de nymphes cela signifie qu'au moins l'une des nymphes du pool est porteuse de l'ADN de l'agent. La seconde est que l'infection d'une nymphe au sein d'un pool est indépendante de celle des autres nymphes du même pool. La dernière est que si un pool donne un résultat négatif en PCR cela signifie qu'aucune des nymphes qui le constituent n'est porteuse de l'ADN ciblé. Il est nécessaire de prendre en compte la taille du pool.

La probabilité q_i de détecter l'ADN d'une bactérie dans un pool, donc d'obtenir un résultat de PCR positif pour un pool, s'écrit $q_i = 1-(1-p)^{n_i}$

- p est la probabilité qu'une nymphe soit porteuse d'ADN d'une bactérie donnée.
- n_i est le nombre d'individus par pool ; $i = 5, 10$ ou 50
- $(1-p)$ est la probabilité qu'une nymphe ne porte pas l'ADN d'une bactérie donnée.
- $(1-p)^{n_i}$ est la probabilité qu'un pool ne soit pas porteur d'ADN d'une bactérie donnée.

Pour déterminer l'influence d'un paramètre sur la probabilité p de portage d'ADN d'une bactérie donnée par une nymphe on effectue un test du maximum de vraisemblance (Cotte, Mémoire de DEA, 2005).

IV.3 Résultats

1 Résultats bruts des PCR et analyses des séquences

Dix-huit pour cent des échantillons testés (95/521) ont donné un résultat positif en PCR spécifique pour *B. burgdorferi*. Parmi les échantillons positifs, 82(/296) étaient des nymphes (7(/20) pools de 50 ; 64(/220) pools de 10 et 11(/56) pools de 5), 2(/123) étaient des males et 11(/102) des femelles.

Seize pour cent des échantillons testés (81/521) ont donné un résultat positif en PCR spécifique pour *Rickettsia* sp.. Parmi ces échantillons, 67(/296) étaient des nymphes (9(/20)

pools de 50 ; 48(/220) pools de 10 et 9(/56) pools de 5), 6(/123) étaient des males et 8(/102) des femelles.

Quinze pour cent des échantillons testés (79/521) ont donné un résultat positif en PCR spécifique pour *A. phagocytophilum*. Parmi ces échantillons, 64(/296) étaient des nymphes (12(/20) pools de 50 ; 46(/220) pools de 10 et 6(/56) pools de 5), 8(/123) étaient des males et 7(/102) des femelles.

Dix-huit des produits PCR positifs pour *B. burgdorferi* ont été séquencés. Les séquences obtenues pour ces différents fragments (accession number = DQ087518) étaient identiques entre elles et toutes identiques à 100% avec la séquence de l'ADNr 16S de *Borrelia garinii* et *afzelii*. La séquence n'est pas assez discriminante pour permettre une distinction entre les espèces du complexe *B. burgdorferi* sl.

Seize des produits PCR positifs pour *Rickettsia* sp ont été séquencés. La plupart des séquences obtenues (12/16) (accession number = DQ087520) étaient identiques entre elles et toutes identiques à 100% avec la séquence du gène de la citrate synthase de *Rickettsia helvetica*. 3 séquences étaient identiques à 98% avec la séquence du gène de la citrate synthase de *Rickettsia helvetica* mais présentaient une qualité de séquence moins bonne. Une séquence (accession number = DQ087521) était identique à 100% avec la séquence du gène de la citrate synthase de IRS4 une *Rickettsia* sp. non identifiée décrite dans des tiques *I. ricinus* en Slovaquie (Sekeyova *et al.*, 2000). Pour cet échantillon une PCR d'amplification spécifique du gène de la protéine de surface ompA a été effectuée et la séquence (accession number = DQ087522) est identique à 100% avec la séquence de la protéine de surface ompA de *Rickettsia* IRS4.

Dix des produits PCR positifs pour *A. phagocytophilum* ont été séquencés. Les séquences obtenues pour 6 de ces différents fragments (accession number = DQ087519) étaient identiques entre elles et identiques à 100% avec la séquence de l'ADNr 16S de *A. phagocytophilum*. Pour les quatre autres fragments, la qualité de la séquence était moins bonne et le résultat de la confrontation aux données de GenBank donnait 95% de similarité avec la séquence d'*A. phagocytophilum*.

2 Analyse des taux de portage

Analyse en fonction des caractères biologiques de la tique

• Comparaison des taux de portage Nymphes/Adultes

Les adultes sont significativement plus porteurs d'ADN que les nymphes pour *B. burgdorferi* ($p= 0.023$), *Rickettsia* sp. (0.02) et *A. phagocytophilum* ($P<0,01$) (voir tableau 10 et figure 20).

	<i>B. burgdorferi</i>	<i>Rickettsia</i> sp.	<i>A. phagocytophilum</i>
adultes	0,058 [0,034 ; 0,097]	0,062, [0,031 ; 0.121]	0,067, [0,033;0,128]
nymphes individuelles	0,028 [0,022 ; 0,035]	0,023, [0,018 ; 0,029]	0,022, [0,017; 0,028]

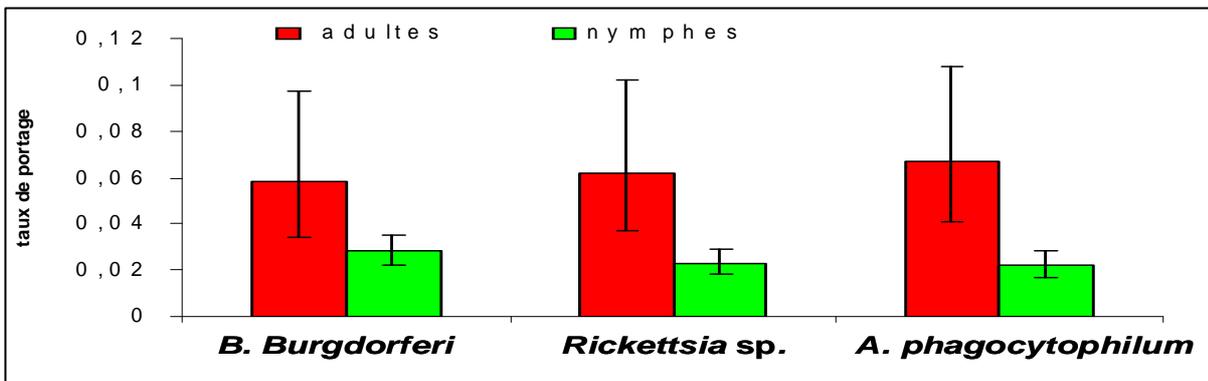


Figure 20 et tableau 10 : Taux de portage observés pour chaque agent pathogène chez les adultes et les nymphes (les valeurs en italique entre parenthèse correspondent à l'intervalle de confiance).

• Comparaison des taux de portage Femelles/Mâles (tableau 11; fig 21)

Les différences sexuelles de portage ne sont significatives que pour *B. burgdorferi*. Les femelles sont significativement plus infectées que les mâles ($p=0.03$).

	<i>B. burgdorferi</i>	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
Femelles	0,108 [0,061 ; 0.180]	0,078 [0,025; 0,130]	0,067 [0,017; 0,117]
mâles	0,016 [0,004 ; 0.060]	0,049 [0,010; 0,088]	0,065 [0,020 ; 0,110]

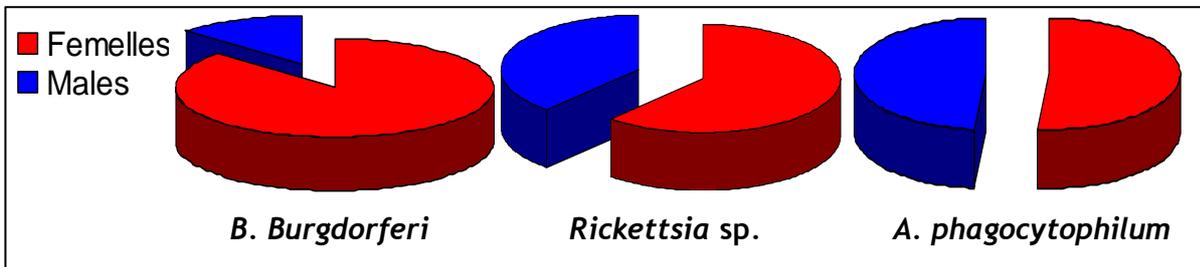


Figure 21 et Tableau 11 : Taux de portage observés pour chaque agent pathogène chez les femelles et les mâles (les valeurs en italique entre parenthèse correspondent à l'intervalle de confiance).

Analyse en fonction des paramètres environnementaux : nature du lieu de collecte bois ou pâture.

Pour cette étude, nous avons tout d'abord analysé les échantillons d'ADN en tant qu'unité, qu'il s'agisse de pool de nymphes ou d'adultes, en ne tenant compte que de la caractéristique «origine de la collecte ». Cette approche ne permet pas de prendre en compte le nombre de nymphes par pools, ni le nombre de pools de différentes tailles dans les pâtures et dans les bois.

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'habitat sur le portage d'ADN des 3 bactéries pathogènes par les tiques adultes et nymphes individuelles, indépendamment les uns des autres, en utilisant les tests de maximum de vraisemblance.

• Analyse des résultats bruts (tableau 12 ; fig 22)

Le taux de portage est le même dans les bois et les pâtures pour *Rickettsia sp.*. Pour *B. burgdorferi* les échantillons provenant des bois sont significativement plus infectés que les échantillons provenant des pâtures ($p < 0.0005$). Pour *A. phagocytophilum* les échantillons provenant des pâtures sont significativement plus infectés que ceux provenant des bois ($p = 0.01$).

	<i>B. burgdorferi</i>	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
Bois	0,114 [0,075; 0,154]	0,153 [0,110 ; 0,200]	0,192 [0,143. 0,240]
Pâtures	0,249 [0,195 ; 0,303]	0,142 [0,100 ; 0,185]	0,111 [0,070 ; 0,150]

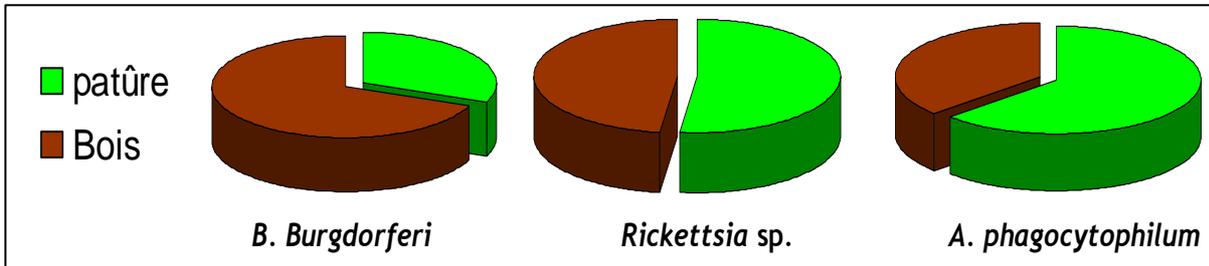


Figure 22 tableau 12 : Taux de portage observés pour chaque agent pathogène entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures (les valeurs en italique entre parenthèse correspondent à l'intervalle de confiance)

• Variation du taux de portage dans les bois et les pâtures en fonction du stade et du sexe

- Pour *Rickettsia sp.*, les résultats sont identiques à ceux obtenus en analysant les résultats bruts.

- Pour *A. phagocytophilum*, des différences de portage existent mais elles ne sont significatives pour aucun stade et aucun sexe. Une tendance forte montre que les individus mâles et nymphes provenant de pâture semblent plus porteurs que ceux provenant des bois. La répartition est inversée pour les femelles (Tableau 13 ; fig 23).

	Femelles	Nymphes individuelles	Mâles
bois	0,107 [0,024 ; 0,190]	0,015 [0,009 ; 0,024]	0,040 [0,010 ; 0,175]
pâtures	0,022 [0,000 ; 0,065]	0,031 [0,022 ; 0,043].	0,094 [0,00 ; 0,090]

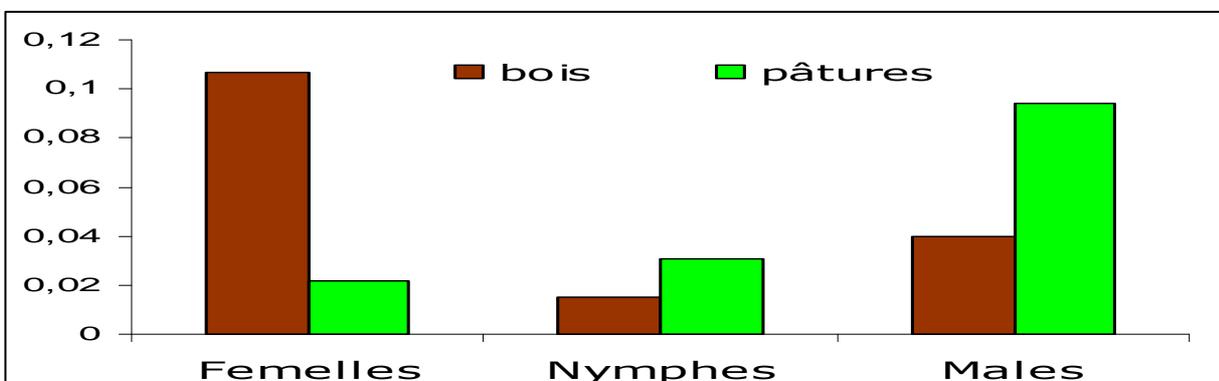


Figure 23 et tableau 13 : Taux de portage observés pour *A. phagocytophilum* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures en fonction du stade et du sexe (les valeurs en italique entre parenthèse correspondent à l'intervalle de confiance)

- Pour *B. burgdorferi* la différence de portage est significative pour les femelles ($p=0.047$) et les nymphes ($p<0.0005$) qui sont plus infectées dans les bois. Aucune différence n'a pu être mise en évidence pour les mâles (tableau 14 ; fig 24).

	Femelles	Nymphes individuelles	Mâles
bois	0,161 [0,086 ; 0,281]	0,053 [0,041 ; 0,069]	0,016 [0,004 ; 0,063]
pâtures	0,043 [0,022 ; 0,086]	0,014 [0,010 ; 0,021]	0,016 [0,004 ; 0,063]

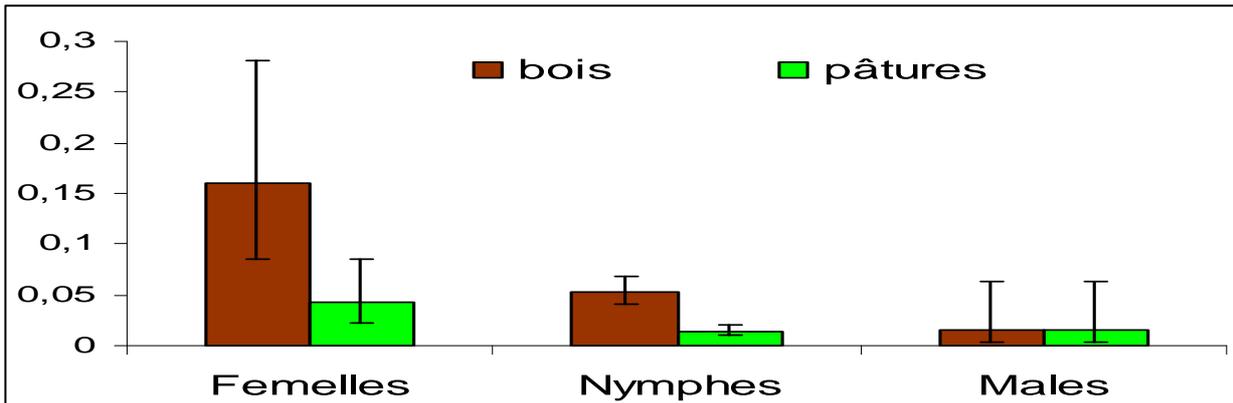


Figure 24 et tableau 14 : Taux de portage observés pour *B. burgdorferi* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures en fonction du stade et du sexe (les valeurs en italique entre parenthèse correspondent à l'intervalle de confiance).

Co-détection d'ADN de bactéries pathogènes

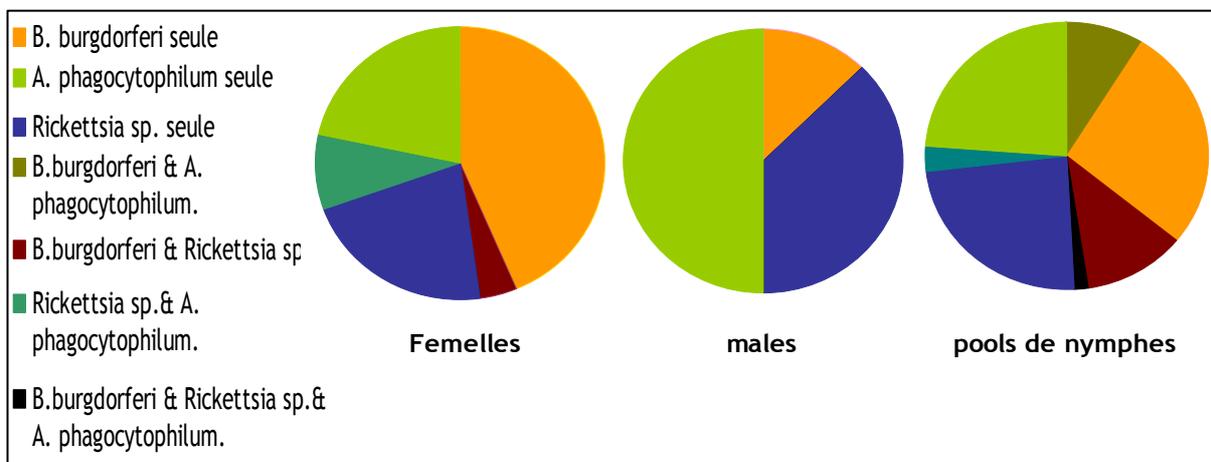
La répartition du portage entre les 3 bactéries au sein des échantillons positifs a été évaluée (tableau 15 ; fig 25).

La détection d'ADN d'une seule bactérie est significativement plus fréquente pour l'ensemble des échantillons.

La détection d'ADN de plus d'une bactérie est plus fréquente dans les pools de nymphes que dans les individus traités individuellement.

La détection de plus d'une bactérie semble plus fréquente pour les femelles que pour les mâles mais le faible nombre d'échantillons ne permet pas de définir le degré de significativité.

	femelles	mâles	Pools de nymphes
<i>B. burgdorferi</i> seule	0,440 [0.230 ; 0.640]	0,130 [0,00 ;0.290]	0,270 [0.2 ; 0.340]
<i>A. phagocytophilum</i> seule	0,220 [0.040 ; 0.390]	0,500 [0.250 ; 0.750]	0,240 [0.170 ; 0.300]
<i>Rickettsia</i> sp. seule	0,220 [0.040 ; 0.390]	0,370 [0.130 ; 0.610]	0,240 [0.170 ; 0.300]
<i>B.burgdorferi</i> & <i>A. phagocytophilum</i> .	0	0	0,090 [0.040 ; 0.130]
<i>B.burgdorferi</i> & <i>Rickettsia</i> sp.	0,045 [0,00 ; 0.130]	0	0,120 [0.070 ; 0.160]
<i>Rickettsia</i> sp.& <i>A. phagocytophilum</i> .	0,090 [0,00; 0.200]	0	0,030 [0,004 ; 0,060]
<i>B.burgdorferi</i> & <i>Rickettsia</i> sp.& <i>A. phagocytophilum</i> .	0	0	0,020 [0,00 ; 0,040]



IV.4 Discussion

Au cours de notre étude, nous avons pu mettre en évidence la présence d'ADN de *B. burgdorferi* sl, *Rickettsia* sp. et *A. phagocytophilum*, dans les tiques de la région des Combrailles et donc confirmer la circulation de ces agents dans les populations de tiques de la région. Ceci est en accord avec les taux de portage observés pour ces différents agents pathogènes en Europe de l'Ouest (Gilot *et al.*, 1996 ; Raoult et Roux 1997; Blanco et Oteo, 2002) et avec les données de séroprévalence observée dans la région (Arzouni, 1998 ; Brun, 2000 ; Parola *et al.*, 1998a ; Parola *et al.*, 1998b). Ces résultats font de la région Auvergne une région à risque pour les maladies induites.

Pour *Borrelia burgdorferi* les taux de portage évalués (adultes : 5.8% ; nymphes : 2.8%) sont légèrement inférieurs à ceux observés dans le reste de la France (adultes : environ 12% ; nymphes : environ 5%) (Gilot *et al.*, 1996). Cette différence peut être expliquée par l'hétérogénéité de la répartition des tiques porteuses dans notre étude. Nos sondes moléculaires ne permettent pas une identification plus précise de l'espèce en cause.

Le taux de portage de *Rickettsia* sp. (adultes : 6.2% ; Nymphes ; 2.3%) est supérieur à ce qui avait été précédemment décrit (adultes : 2%) au cours d'une étude menée dans la même région (Parola *et al.*, 1998a). Les séquences obtenues au cours de notre étude sont, comme dans l'étude de Parola *et al.*, principalement identiques à celle de *R. helvetica*. L'identification de cette bactérie avait résolu l'énigme d'une forte séroprévalence d'anticorps anti -SFG *Rickettsia* dans la population du Puy de Dôme alors que *R. conorii* est considérée absente de cette zone. A l'époque *R. helvetica* n'avait pas encore été impliquée dans des processus pathogènes (Parola *et al.*, 1998a). Depuis, *R. helvetica* a été associée à différentes affections en France et en Suède (Nilsson *et al.*, 1999a ; Nilsson *et al.*, 1999b ; Fournier *et al.*, 2000a). L'association d'une *Rickettsia* pathogène avec une tique anthropophile comme *Ixodes ricinus* en France donne aux rickettsioses un potentiel émergent sur le territoire. Pour un des échantillons porteur d'ADN de *Rickettsia* et provenant d'un bois la séquence obtenue pour deux gènes était similaire à celle d'une SFG *Rickettsia* décrite pour la première fois en Slovaquie et au pouvoir pathogène inconnu (Sekeyova *et al.*, 2000).

Les taux de portage de *Anaplasma phagocytophilum* (adultes : 7% ; nymphes : 2.2%) sont un peu plus élevés que ceux décrits dans la plupart des études menées en Europe à l'exception de l'Espagne (Blanco et Oteo, 2002). En France, la seule étude menée dans des régions avoisinantes donnait un taux de portage de 1.3% (Parola *et al.*, 1998b).

Notre étude nous a permis de mettre en évidence des variations dans le portage des trois agents pathogènes, notamment en fonction du stade, du sexe et du type d'habitat, bois ou pâtures.

Pour les trois agents pathogènes recherchés, les adultes sont significativement plus infectés que les nymphes. Cette observation a fréquemment été faite pour *B. burgdorferi* et *A. phagocytophilum* (Levin *et al.*, 1999 ; Levin et Fish, 2000 ; Blanco et Oteo, 2002) et

serait liée à l'acquisition de l'agent pathogène au cours du repas sanguin. Le fait que les adultes se soient nourris deux fois augmente d'autant la probabilité de leur infection. Pour *Rickettsia* sp., cette hypothèse est cependant insuffisante puisque le réservoir de la bactérie est la tique elle-même et que la bactérie est transmise par la femelle à sa descendance. L'absence de différence entre les comportements d'agents à transmission uniquement transtadiale et à transmission trans-ovarienne dans la population de tiques étudiée est surprenante. Le pourcentage d'œuf infectés par *Rickettsia* varie sous l'influence de facteurs encore inconnus à ce jour (Raoult et Roux, 1997). Nos résultats pourraient être le fait d'un taux de transmission trans-ovarienne faible. Cependant dans ce cas, le maintien de *Rickettsia* sp. dans la zone exigerait l'intervention d'un réservoir autre que les tiques. Une autre hypothèse serait que l'infection d'une nymphe par des *Rickettsia* sp. augmente sa capacité de survie ce qui expliquerait les différences observées chez les adultes. Aucune donnée actuelle ne permet de corroborer cette hypothèse.

Une différence sexuelle de portage a pu être mise en évidence pour *B. burgdorferi* uniquement. Nous avons ainsi pu montrer que les femelles étaient significativement plus porteuses d'ADN de *B. burgdorferi* que les mâles ($p=0.03$). Ce résultat est à corrélérer avec d'autres études (De Meeûs *et al*, 2004) qui ont montré la complexité des cycles de transmission des différentes espèces du complexe *B. burgdorferi* sl. Pour ces auteurs, la différence n'est observable que pour *B. burgdorferi* ss. Cette disparité pourrait être liée à des préférences d'hôtes des tiques femelles immatures différant de celles des tiques mâles immatures et ayant un tropisme plus marqué pour les hôtes réservoirs de la bactérie. Les réservoirs varient en fonction des espèces de *B. burgdorferi* sl.

Le site de collecte des tiques influence également de manière variable sur le portage des 3 agents pathogènes.

Pour *B. burgdorferi* les tiques prélevées dans les bois sont significativement plus infectées que les tiques prélevées sur les pâtures ($p<0.001$) ce qui pourrait être dû au caractère sylvicole des réservoirs connus de *B. burgdorferi* sl. Il est très intéressant de noter que cette différence n'est en fait réelle que pour les nymphes ($p<0.005$) et les femelles ($p<0.05$). Les mâles, eux, sont autant infectés sur les pâtures que dans les bois. Or, les mâles immatures *I. ricinus* ont été démontrés être beaucoup plus mobiles que les

femelles immatures (De Meeûs *et al.*, 2002). On peut donc supposer que les nymphes futures mâles se déplacent activement d'un site à l'autre et donc que la population de mâles sur les pâtures soit assez homogène avec celle du bois proche tandis que les nymphes futures femelles restent dans leur biotope.

Rickettsia sp. a une répartition très homogène dans les différentes populations. Ceci est cohérent avec le fait que la tique est réservoir mais ne l'est pas avec l'hypothèse d'un réservoir autre que les tiques.

Le portage global d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans les pâtures est significativement plus important que dans les bois ($p=0.01$). Cependant l'analyse globale manque de précision car elle ne prend pas en compte le nombre et la taille des pools. L'analyse de l'influence de l'habitat sur le portage d'ADN d'*A. phagocytophilum*, en fonction du stade et du sexe, ne soutient pas complètement ce résultat car les différences observées ne sont pas significatives. On observe une tendance chez les mâles à être plus porteurs dans les pâtures (9,4%) que dans les bois (4%). La même tendance existe pour les nymphes individuelles (respectivement 3,5% et 1,5% de portage dans les pâtures et dans les bois). Les femelles, en revanche, semblent plus infectées dans les bois (10.7%) que dans les pâtures (9.4%). Afin d'améliorer la précision de l'analyse de portage chez les nymphes, nous avons exclu les pools de 50 individus. En effet, il a été démontré pour les analyses statistiques, que plus la taille du pool est importante, moins la précision de l'évaluation individuelle est bonne (Chen et Swallow, 1990). Dans ce cas, les nymphes prélevées sur les pâtures sont significativement plus porteuses d'ADN d'*A. phagocytophilum* que celles prélevées dans les bois ($p= 0.012$). Il semble donc que la tendance observée sur l'ensemble des échantillons soit vérifiée. Ces résultats sont similaires à ceux d'une étude comparant le taux de portage d'*A. phagocytophilum* entre les bois et les alpages au Royaume Unis et qui montrait un taux de portage significativement plus élevé dans les tiques de prairie. L'auteur suggérait un rôle des ruminants domestiques comme réservoir de la bactérie (Ogden *et al.*, 1998). Le réservoir d'*A. phagocytophilum* n'est toujours pas connu avec certitude. Les rongeurs sont suspectés et l'hypothèse la plus robuste implique les chevreuils (Liz *et al.*, 2002). Cette hypothèse n'est pas soutenue par nos résultats qui seraient d'avantage en faveur d'un réservoir colonisant les zones herbeuses. Il est envisageable que plusieurs réservoirs entrent

en jeu. L'un d'entre eux a pour habitat spécifique la prairie. L'autre, hôte des nymphes, éventuellement chevreuil, vivrait dans les bois. Ceci pourrait également expliquer que l'effet « habitat » soit différent pour les mâles et les femelles. Quoiqu'il en soit, le fait que les pâtures représentent une zone à risque est cohérent avec le fait que les herbivores au pré comme les bovins, les chevaux, les moutons soient les principales victimes d'anaplasmose granulocytaires en Europe (Ogden *et al.*, 1998 ; Pusterla *et al.*, 1998 ; Blanco et Oteo, 2002; Stuen *et al.*, 2002 ; Joncourt et Collin, 2003; Davoust, 2003b).

Un des bilans de cette étude est l'opposition apparente entre les cycles biologiques d'*A. phagocytophilum* et de *B. burgdorferi* comme cela avait été montré aux Etats-Unis en 1999 (Levin *et al.*, 1999). Ceci contredit l'idée, pourtant généralement admise, que les deux agents pathogènes, ayant le même vecteur et la même aire de distribution, ont également le même cycle biologique .

La co-détection d'ADN de *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp. se produit principalement dans les pools de nymphes et elle est relativement rare dans les adultes étudiés individuellement (1.3% d'adultes co-infectés dont uniquement des femelles). Or des études ont montrées que les adultes sont jusqu'à 10 fois plus co-infectés que les nymphes individuelles (Levin *et al.*, 1999). La co-ségrégation des agents pathogènes est donc principalement géographique et non pas liée au vecteur en lui-même. Le nombre d'adultes impliqué dans les co-infections est trop faible pour être analysé mais le fait que seules des femelles soient co-infectées est à noter sans être clairement expliqué.

Nous avons montré que les zones herbeuses de pâturages aussi bien que les bois constituaient des niches écologiques adaptées pour les tiques et que des agents pathogènes majeurs étaient présents dans les populations de tiques de chacun de ces habitats. Des différences importantes dans les cycles de transmission de ces bactéries pathogènes se dessinent. De même, des disparités apparaissent dans les comportements des tiques aux différents stades et en fonction du sexe.

La répétition de l'étude pendant plusieurs années, l'intégration de données plus précises sur les différents habitats (type végétal, densité d'hôtes, composition du sol) et d'autres facteurs de variation (température, climat), ainsi que la superposition spatiale des données récoltées permettront d'affiner les hypothèses avancées.

Les maladies à tiques chez l'Homme et l'animal restent rarement diagnostiquées en France. Le fait que de toutes évidences ces agents sont présents dans la zone doit faire prendre conscience du risque existant. L'enquête d'incidence devrait permettre d'évaluer l'impact réel de ces affections.

IV.5 Article 3 : Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia sp* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France

Les premiers résultats de cette étude ont été présentés au 4^{ème} congrès sur les *Rickettsiae* et les infections rickettsiales en juin 2005.

Ils ont fait l'objet, dans ce cadre, d'un court article, en révision dans les Annales de l'Académie de Sciences de New-York. : Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia sp* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France.

Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France

Lénaïg HALOS¹; Gwenaël VOUREC²; Violaine COTTE², Patrick GASQUI², Jacques BARNOUIN² ;
Henri-Jean BOULOUS¹; Muriel VAYSSIER-TAUSSAT¹

1 : UMR 956 BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

2 : Unité d'Epidémiologie Animale, INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Corresponding author :

Muriel Vayssier-Taussat,

UMR 956 BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

Phone: 33 1 43 96 71 51

Fax: 33 1 43 96 73 32

E-mail: mvayssier@vet-alfort.fr

Keywords: *Ixodes ricinus*, Tick, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp., prevalence

Ixodes ricinus ticks can transmit multiple pathogenic bacteria responsible for diseases in animals and humans. In Europe, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), *Anaplasma phagocytophilum* and spotted fever group (SFG) *Rickettsia* sp. are considered as potentially emerging pathogens (1;2). The first step for tick-borne diseases risk assessment in a geographical area is the detection of the pathogens in the infected vector in natural conditions. Our objective was to study ticks infection rates for *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum* and spotted fever group (SFG) *Rickettsia* sp., in pastures and woods of a selected area in France.

A total of 4701 *I. ricinus* ticks, including 102 females, 123 males and 4476 nymphs, were collected during spring 2003 by drag sampling on vegetation (3). Collection sites were 61 pastures and the 61 nearest woods, randomly selected in the area of Combrailles, Puy-de-Dôme, France. This region has endemic Lyme disease, SFG rickettsioses serological evidence in humans (4) and reported tick-borne diseases in cattle. DNA was extracted, using the method described by Halos et al. (5), from individual adults and from nymphs pooled by 5 (56 pools), 10 (220 pools) or 50 (20 pools) within the same sampling site providing 521 DNA samples total. We detected DNA from the 3 pathogens using specific PCR amplification of a 550 bp fragment of 16s rDNA from *A. phagocytophilum* (6), a 350 bp fragment of 16s rDNA from *B. burgdorferi* sl (7) and a 380 bp fragment of the *gltA* gene from *Rickettsia* sp. (8). For each targeted pathogen, ten to twenty positive PCR products were sequenced (Qiagen, Hilden, Germany). We present here preliminary descriptive analysis based on crude observed PCR results in individual and pooled samples. Trends were tested by chi-square on Excel software. $P < 0.05$ was regarded as significant.

Among the 521 DNA extracts, 95 (18%) carried *B. burgdorferi* sl DNA, 81 (16%) carried *Rickettsia* sp. DNA and 79 (15%) carried *A. phagocytophilum* DNA. Eighteen *B. burgdorferi* sl sequences were 100% related to *B. garinii* or *B. afzelii* (accession number = DQ087518). Sequences were not discriminant enough to allow distinction at the genospecies level. Twelve *Rickettsia* sp. sequences were 100% related to *R. helvetica* (accession number = DQ087520) which has been associated with severe diseases in the past few years (9). One *Rickettsia* sequence (accession number = DQ087521) was related to a SFG *Rickettsia* sp. of unknown pathogenicity. Ten *A. phagocytophilum* sequences were 95 % to 100% related to *A. phagocytophilum* pathogenic strains (accession number = DQ087519).

Among adult ticks, sexual difference were observed only for *B. burgdorferi* sl, for which females ticks were significantly more infected than males ticks ($p = 0.03$). This can be related to a difference of host preference between immature males and immature females and is consistent with results of a previous study (10).

For *B. burgdorferi* sl, ticks collected in woods carried more DNA than ticks collected on pastures (respectively 69% and 31% of PCR positive samples) ($p < 0.0005$). For *A. phagocytophilum*, ticks collected on pastures carried more DNA than ticks collected in wood (respectively 63% and 37% of PCR positives samples) ($p = 0.03$). These differences could be related to different reservoir hosts for the two bacteria. *B. burgdorferi* sl hosts are known to be small wood rodents while reservoir hosts of *A. phagocytophilum* remain unknown even if roe-deer are highly suspected (11). However, our results do not support the roe-deer hypothesis but rather are in favour of a host living in herbal sites. Such difference between pastures and woods habitats for *A. phagocytophilum* has already been shown (12) and corroborates the fact that domestic herbivores such as horses, cows and sheep display clinical granulocytic anaplasmoses (13). Therefore, the currently admitted similarity in the life cycles of *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* is probably not relevant (14).

Co-detection of more than one pathogen occurs in 24,5% of nymph pools, in 13% of females but none for males. This result suggests a geographical co-segregation of the agents rather than a co-carriage by individual ticks. Nevertheless, it underlines the potential risk of co-transmission among people or animals which are usually bitten by several ticks.

Nymphal individual infection rates will be statistically estimated based on pools PCR results in order to evaluate the effect of stage on pathogens carriage and to confirm trends observed on crude results. GIS data, and environmental, vegetation and climatic factors, are currently under investigation.

Our results show that the three bacteria have similar prevalence in the Puy-de-Dôme but seems to have different life cycles. Pastures as well as woods appear to be risk area for humans and animals. There is a need for parallel investigation on human and animal occurrences of the diseases caused by *B. burgdorferi* sl, SFG *Rickettsia* sp. and *A. phagocytophilum* in the geographical area of study.

References

- 1- Parola, P. 2004. Tick-borne rickettsial diseases : emerging risks in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27(5):297-304. Review.
- 2- Raoult, D. & V. Roux. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 694-719.
- 3- Vassallo, M., B. Pichon, J. Cabaret, C. Figureau & C. Pérez-Eid. 2000. Methodology for sampling questing nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*), the principal vector of Lyme disease. Europe. *Entomol. Soc. Am.* 37 (3):335-339.
- 4- Parola, P., L. Beati, M. Cambon & D. Raoult. 1998. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:95-100.
- 5- Halos, L., T. Jamal, L. Vial, R. Maillard, A. Suau, A. Le Menach, H. J. Boulouis & M. Vayssier-Taussat. 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet. Res.* 35(6):709-713.
- 6- Massung R. F., K. Slater, J. H. Owens, W.L. Nicholson, T. N. Mather, V.B. Solberg & J.G. Olson. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic *Ehrlichiae*. *J. Clin. Microbiol.* 36(4): 1090-1095.
- 7- Marconi, R. T. & C. F. Garon. 1992. Development of polymerase chain reaction primers sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30:2830-2834.
- 8- Regnery, R. L., C. L. Spruill & B. D. Plikaytis. 1991. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J. Bacteriol.* 173(5): 1576-1589.
- 9- Nilsson, K., O. Lindquist & C. Pahlson. 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet.* 354(9185):1169-1173.
- 10- De Meeûs, T., L. Beati, C. Delaye, A. Aeschlimann & F. Renaud. 2002. Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolution Int. J. Org. Evolution.* 56(9):1802-1807.
- 11- Liz, J. S., J. W. Sumner, K. Pfister & M. Brossard. 2002. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J. Clin. Microbiol.* 40(3):892-897.

- 12- Bown, K. J., M. Begon, M. Bennett, Z. Woldehiwet & N. H. Ogden. 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 9(1):63-70.
- 13- Blanco, J. R. & J. A. Oteo. 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 8(12):763-772. Review.
- 14- Levin, M. L., F. Des Vignes & D. Fish. 1999. Disparity in the natural cycles of *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Emerg. Infect. Dis.* 5(2):204-208.

V Conclusion du premier chapitre

Au terme de ce premier chapitre, nous avons tout d'abord pu définir des outils moléculaires utiles à l'étude des agents pathogènes bactériens dans leur vecteur.

L'utilisation de ces outils nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un lien entre les tiques et *Bartonella* sp. en France et la coexistence de l'ADN de *Bartonella* avec de l'ADN d'autres agents pathogènes transmis par les tiques. Le rôle exact des tiques dans le cycle de transmission des *Bartonella* reste à établir avec certitude. Si ce rôle semble presque certain pour certaines espèces comme *Bartonella vinsonii berkhofii*, il paraît plus anecdotique pour d'autres comme *Bartonella henselae* ou les *Bartonella* infectant les ruminants domestiques. Néanmoins, la détection d'ADN de *Bartonella* sp. dans des tiques en quête d'hôte, qui viennent donc de subir leur mue, laisse supposer qu'une transmission transtadiale de la bactérie existe chez les tiques. Or la transmission transtadiale est la première étape nécessaire à la vectorisation d'agents pathogènes par les tiques. Il est probable que les tiques interviennent au moins de manière sporadique dans la transmission de *Bartonella* spp. Seule la mise au point d'un protocole de transmission expérimentale pourra étayer ces hypothèses.

Nous avons également initié l'étude épidémiologique de trois bactérioses transmises par les tiques dans une région où elles sont soupçonnées être endémiques.

Les résultats obtenus offrent des indications sur le cycle de transmission des agents pathogènes responsables et permettent d'établir un profil préliminaire de la région étudiée. Cette étude a permis de générer des résultats intéressants. Toutefois, les analyses devront être menées sur plusieurs années pour permettre d'établir des facteurs de risque. L'objectif final de cette étude est de définir des modèles de transmission adaptables à d'autres zones géographiques et à d'autres agents pathogènes vectorisés par les tiques dans l'optique d'assurer une veille épidémiologique face à leur émergence.

Le très grand nombre de bactéries pathogènes transmises par les tiques rend toute étude épidémiologique qui se voudrait exhaustive extrêmement coûteuse et lourde à mettre en place. C'est en considérant cet aspect du problème que nous avons développé d'autres

techniques moléculaires de détection des bactéries pathogènes dans les tiques permettant la mise en évidence de plusieurs de ces agents pathogènes en une seule étape.

Etude expérimentale chapitre 2 :

Nouvelles approches moléculaires pour l'étude du portage bactérien par les tiques

I Introduction et principe général

L'objectif de cette seconde partie est d'utiliser la PCR à large spectre, ou PCR universelle, associée à une technique de fingerprinting, la TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis), pour la détection globale, en une seule étape PCR, de plusieurs bactéries pathogènes dans les tiques. Cette technique pourrait constituer une alternative attractive à la PCR spécifique puisqu'elle permet d'éviter la répétition des PCR imposée par la détection ciblée de chaque agent pathogène. Elle offre en outre la possibilité de détecter sans a priori les bactéries portées par les tiques.

La PCR universelle repose sur l'amplification non sélective d'un fragment d'un gène commun à l'ensemble des eubactéries. Il s'agit, la plupart du temps, du gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) dont la séquence est caractérisée par l'existence de régions conservées pour toutes les eubactéries et de régions variables, spécifiques de genre ou d'espèce. L'utilisation d'amorces s'hybridant dans des régions conservées et encadrant des régions variables permet l'amplification de l'ADN de l'ensemble des bactéries en une seule étape (Wilson *et al.*, 1990). Le produit PCR obtenu est un mélange d'amplicons, de taille identique mais de séquences différentes, correspondant aux différentes bactéries présentes dans l'échantillon initial.

Les techniques de fingerprinting par dénaturation sur gel d'électrophorèse, DDGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et TTGE, utilisent les propriétés de dénaturation différentielle de l'ADN double brin soumis à un gradient de conditions dénaturantes pour séparer les différents amplicons (Muyzer, 1993) en fonction de leur séquence, et en particulier en fonction du pourcentage en bases GC (GC%). Ces techniques permettent la séparation de fragments qui ne diffèrent que d'une seule base (Muyzer, 1993). Au cours de la migration

électrophorétique, le fragment d'ADN double brin est progressivement dénaturé. Il change de conformation, donc de mobilité et de vitesse de migration, jusqu'à une conformation finale qui l'immobilise. Pour éviter la dénaturation complète du fragment et la dissociation totale du double brin, un « clamp-GC » (c'est-à-dire une suite d'une quarantaine de bases GC) est ajouté à l'un des primers. Ce GC-clamp résiste à la dénaturation et permet de maintenir les deux brins appariés ce qui facilite la lecture et l'analyse des profils. Les conditions dénaturantes appliquées sont chimiques dans le cas de la DGGE où le gradient repose sur des concentrations variables en urée et en formamide du gel. Elles sont d'origine thermique dans les cas de la TTGE et de la TGGE où l'augmentation progressive de la température, temporelle (TTGE) ou le long du gel (TGGE) assure la dénaturation (Yoshino *et al.*, 1990 ; Muyzer, 1999 ; Bosshard, 2000).

Ces techniques sont fréquemment utilisées pour les études menées en écologie microbienne (Muyzer, 1999 ; Kirk *et al.*, 2004) mais n'ont été, jusqu'à présent, pratiquement jamais appliquées à la détection de bactéries pathogènes, que ce soit dans un contexte clinique ou épidémiologique (Ji *et al.*, 2004).

II Utilisation de la PCR universelle-TTGE pour la détection de plusieurs bactéries pathogènes dans les tiques *I. ricinus* :

II.1 Introduction

Nous avons évalué l'utilisation de la PCR universelle-TTGE pour détecter, en une seule étape, trois des principales bactéries pathogènes transmises par les tiques : *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp.. Nous avons tout d'abord mis au point un « marqueur pathogène » en définissant les profils TTGE spécifiques de ces trois bactéries. Puis nous avons comparé ce marqueur pathogène à des profils TTGE obtenus pour des échantillons de tiques, dans l'optique de détecter les bandes correspondant aux trois agents pathogènes sur ces profils.

II.2 Article 4 : Use of Broad-Range PCR-TTGE for Detection of Bacterial Pathogens in Ticks in a Single Step

Cet article est actuellement en révision dans Vet. Research

Broad-Range PCR-TTGE for the first-line detection of bacterial pathogens in ticks

Lénaïg HALOS¹ DVM; Maria MAVRIS¹ PhD, Gwenaël VOUREC² PhD, Renaud
MAILLARD³, Jacques BARNOUIN² DVM PhD, Henri-Jean BOULOUIS¹ DVM, Muriel
VAYSSIER-TAUSSAT^{1*} PhD

(1) UMR 956 INRA/AFSSA/ENVA/UPVM, Microbiologie, Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94 700 Maisons-Alfort, France

(2) Unité d'Epidémiologie Animale, INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

(3) Unité de Pathologie du Bétail, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

* Corresponding author: Muriel Vayssier-Taussat, UMR956 Microbiologie, Ecole Nationale
Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94 700 Maisons-Alfort, France

Phone: +33 1 43 96 71 51

Fax: +33 1 43 96 73 32

e-mail: mvayssier@vet-alfort.fr

Short Title :

First-line detection of DNA from bacterial pathogens in ticks.

Key Words : *Ixodes ricinus*, Tick, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., broad-range PCR-TTGE

Abstract

We developed a single-step broad-range PCR-TTGE technique for first-line detection of DNA from several bacterial pathogens in ticks by comparison with DNA reference markers of known tick-borne pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and Spotted Fever Group *Rickettsia* spp.). The validity of the technique was evaluated by comparison with previous specific-PCR data from 55 pools of 10 nymphal *Ixodes ricinus* ticks.

Many tick-borne bacteria are considered as emerging pathogens (Parola and Raoult, 2001) such as *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), the agent of Lyme borreliosis, the most significant human tick-borne disease in the Northern Hemisphere; *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of animal and human anaplasmosis and spotted fever group *Rickettsia* spp. (SFG) (Parola and Raoult, 2001; Stanek, and Steere, 2003; Comer *et al.*, 2001 ; Sparagano *et al.*, 1999). A single tick may transmit multiple pathogens (Belongia, 2002; Jenkins *et al.*, 2001; Parola and Raoult, 2001) but little is known about the co-infection frequency between bacteria infecting ticks (Parola and Raoult, 2001; Belongia, 2002).

One of the first steps for assessing the risk for tick-borne diseases is the detection of pathogens in their vector. PCR amplification of pathogen DNA using species-specific primers is now the standard for pathogen detection in ticks (Parola and Raoult, 2001; Sparagano *et al.*, 1999).

However, PCR assays can be time-consuming and labor-intensive, particularly when testing for multiple pathogens in a large number of samples. Multiplex PCR assays are an alternative but their optimization is often difficult (Elnifro *et al.*, 2000) and they have only been used for the detection of DNA usually for a maximum of 2 tick-borne pathogens (Courtney *et al.*, 2004).

Broad-range PCR, using primers that target highly-conserved regions of genes common to all bacteria, e.g. 16S ribosomal RNA (16S rDNA), allows the simultaneous amplification of DNA from all bacteria present in one sample in a single-step (Wilson *et al.*, 1990). The different amplicons are then cloned and subsequently sequenced or separated on the basis of their sequence. Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE) is one technique that allows the sequence-specific separation on the basis of the GC content of amplicons by using the denaturing conditions of an increasing temperature (Bosshard *et al.*, 2000; Yoshino *et al.*, 1990). These techniques are commonly used to determine the bacterial profile of different biotopes such as soil and lakes (Bosshard *et al.*, 2000; Muyzer, 1999), and have also been successfully applied to study the microflora of *Ixodes ricinus* ticks (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2003) but have been rarely used for the detection of bacterial pathogens (Ji *et al.*, 2004). Samples such as ticks are

often infected by more than one pathogen, therefore universal detection techniques result in multiple PCR products, thus a pathogen reference marker is required to distinguish pathogen PCR products within the complex profiles.

We evaluated the feasibility of a broad-range PCR-based technique combined with TTGE separation to simultaneously detect DNA from *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. in ticks. A pathogen reference migration marker was established using broad-range PCR primers to amplify the 16S rDNA from genomic DNA from i) *A. phagocytophilum* and *R. helvetica* extracted using the Genomic DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany; ii) *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) and *B. afzelii* provided by the Institut de Bactériologie of Strasbourg, France and iii) *Rickettsia conorii* obtained from Unité des Rickettsies, Marseille, France. A fragment of approximately 180-bp was amplified with a broad-range eubacterial primer set 350f (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') and PC535 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') from each bacterial species. For TTGE analyses, the 350f primer possessed an additional GC-clamp at the 5' extremity (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCCGGGGGG-350F-3'), which prevented strand dissociation at high temperature during electrophoresis (Muyzer, 1999). Each 50- μ L reaction contained 0.5 μ mol/ μ L of each primer, 2.5 mM of each dNTP, 5 μ L of 10X PCR buffer, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan) and 5- μ L of the DNA extract. Cycling conditions were 1 denaturing cycle (8 min, 95°C), followed by 30 cycles of denaturing (1 min, 94°C) annealing (1 min, 52°C) and extension (1 min, 72°C) and a final extension step (10 min, 72°C). For sequence-specific separation of PCR products, the TTGE DCode System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used. Gel electrophoresis was performed in 0.5 X TE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH8), 7 M urea, with 10% acrylamide-bisacrylamide (37.5:1) gels at a constant voltage of 55 V and with a temperature gradient from 63°C to 70°C at a constant temperature increment of 0.4°C/h. After electrophoresis, the gel was incubated using the sensitive SYBR green nucleic acid gel staining method (Amresco, Solon,

USA) and DNA fragments were visualized under ultraviolet light. We defined a specific ‘front rate’ (FR) for each fragment, as the distance of that fragment to the well, divided by the distance of the *A. phagocytophilum* fragment to the well. Amplified fragments obtained from *B. burgdorferi* ss (198 bp ; 45% GC) , *B. afzelii* (197 bp ; 45% GC), *B. garinii* (194 bp ; 45% GC), *R. conorii* (170 bp ; 52% GC), *R. helvetica* (170 bp ; 52% GC), and *A. phagocytophilum* (173 bp ; 54% GC), were electrophoresed using TTGE (Figure 1). The 3 *B. burgdorferi* sl species showed similar profiles characterized by unique fragments with a FR of 0.1 (Figure 1, lanes Bg, Ba, Bbss), whereas *R. conorii* and *R. helvetica* had unique fragments with identical migration profiles and a FR of 0.9 (Figure 1, lanes Rc, Rh). *A. phagocytophilum* had a single fragment with a FR of 1 (Figure 1, lane Aph). As the migration profiles of three genera were always reproducible from one migration to another and distinct, a reference pathogen DNA marker, named “Mttge”, was designed using *B. garinii*, *R. conorii*, and *A. phagocytophilum* 16S rDNA fragments, (Figure 1, lane Mttge). Mttge was used for the detection of DNA from pathogens in tick samples by profile comparison.

Broad-range PCR-TTGE was then used to detect the presence of the 3 tick-borne pathogens in tick DNA extracts from 55 pools of 10 *Ixodes ricinus* nymphs collected by flagging vegetation in the Auvergne region (France) by comparison with previous specific-PCR data. DNA extraction was performed as previously described (Halos et al, 2004). With specific-PCR, 20 pools were positive for *B. burgdorferi* sl only (amplification of a 357 bp fragment of 16S rDNA from *B. burgdorferi* sl (Marconi et al., 1992)), 11 for *A. phagocytophilum* only (amplification of a 546 bp fragment of 16S rDNA from *A. phagocytophilum* (Massung et al., 1998), and 17 for *Rickettsia* spp. only (amplification of a 381 bp fragment of citrate synthase gene from *Rickettsia* spp. (Regnery et al., 1991)). Two pools were positive for both *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* sl, two were positive for both *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp., and two were positive for both *Rickettsia* spp. and *B. burgdorferi* sl. One pool

was positive for the three pathogens, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. (Table).

Broad-range PCR amplification of the 16S rDNA V3 region was carried out on the 55 pools and the resultant PCR fragments were separated by TTGE. The profiles were compared to Mttge (Figure 2).

TTGE detection correlated with positive specific-PCR results in 15/20 DNA extracts for *B. burgdorferi*, 16/17 DNA extracts for *Rickettsia* spp. and all extracts (11/11) for *A. phagocytophilum* (Table, Figure 2 A,B,C). Moreover, all (7/7) samples positive with specific-PCR for 2 or 3 of the targeted pathogens showed the expected bands in their TTGE profile (Table; figure 2D). Among the 55 samples, all found to be negative using specific-PCR for *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* or *Rickettsia* spp. were also negative with broad-range PCR-TTGE. At least 2 bands were excised for each detected pathogen, and amplified as described above. PCR products were sequenced (Qiagen, Germany) and sequences obtained were related to the expected pathogens (Table).

Broad-range PCR-TTGE was proven to work for the detection of 3 of the most common tick-borne bacterial pathogens in the Northern hemisphere (Parola and Raoult, 2001) and is therefore of great interest for global tick-borne risk assessment as a first-line detection tool for the screening of tick populations.

Broad-range PCR-TTGE allowed co-detection of 2 or 3 pathogens in 1 pool and could effectively be applied to detect several pathogens in a single tick. It offers then a powerful alternative for co-infection studies. When precise identification of a pathogen is required, subsequent steps could include specific PCR analyses of samples of interest or sequencing of fragments corresponding to members of the pathogen marker.

We observed repetitive inconsistent results between the specific-PCR and broad-range PCR-TTGE in 6/55 samples, mainly for *Borrelia burgdorferi*. This may be due to the qualitative and limiting measure of visually detecting PCR bands of low intensity within complex profiles.

An automated standardized reading process would improve sensitivity and accuracy. Preferential amplification of 16S rDNA of some bacterial taxons (Schabereiter-Gurtner et al., 2003) could also explain these biases.

Interestingly, this technique could result in the identification of potential bacterial pathogenic agents or the detection of unexpected relationships between tick-infecting bacteria. Indeed, all TTGE profiles obtained showed numerous fragments not related to any of the 3 target bacterial pathogens. We excised and sequenced these fragments (data not shown) and found that they were mostly related to symbiotic bacteria such as *Spiroplasma* sp. (Fukatsu and Nikoh, 2000) (Fig 2A; band a) and an alpha-proteo bacterium, IRicES1, symbiont of *I. ricinus* (Beninati et al., 2004) (Fig 2A; band b).

In conclusion, broad-range PCR-TTGE offers new opportunities for the detection of bacterial pathogens in ticks in the context of their natural ecology.

We are grateful to Prof. Bruno Chomel for critical review and stimulating discussion. We thank students, Mathieu Soulage, Delphine Filiputti and Franck Bonnamy for their excellent technical assistance, Dr. Benoit Jauhlac (IBS, Strasbourg) and Dr. Jean Marc Rolain (Unité des rickettsies, Marseille) for having kindly provided bacterial reference strains DNA. This work was funded as part of the Transzoonose project of the National Institute for Agronomic Research (INRA).

References

- Belongia, E.A., 2002. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes ticks*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2: 265-273.
- Beninati, T., Lo, N., Sacchi, L., Genchi, C., Noda, H., Bandi, C., 2004. A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* 70:2596-2602.
- Bosshard, P.P., Santini, Y., Gruter, D., Stettler, R., Bachofen, R., 2000. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 31:173-182.
- Comer, J.A., Paddock, C.D., Childs, J.E., 2001. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. *Vector Borne Zoonotic Dis* 1:91-118.
- Courtney, J.W., Kostelnik, L.M., Zeidner, N.S., Massung, R.F., 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 42:3164-3168.
- Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J., Klapper, P.E., 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13:559-570.
- Fukatsu, T., Nikoh, N., 2000. Endosymbiotic microbiota of the bamboo pseudococcid *Antonina crawii* (Insecta, Homoptera). *Appl Environ Microbiol* 66:643-650.

Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., Boulouis, H.J., Vayssier-Taussat, M., 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res.* 35(6):709-713.

Jenkins, A., Kristiansen, B.E., Allum, A.G., Aakre, R.K., L. Strand, Kleveland, E.J., van de Pol, I., Schouls, L., 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from southern Norway. *J Clin Microbiol* 39:3666-3671.

Ji, N., Peng, B., Wang, G., Wang, S., Peng, X., 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *J Microbiol Methods* 57(3): 409-413.

Marconi, R.T., Garon, C.F., 1992. Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J Clin Microbiol* 30:2830-2834.

Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.L., Mather, T.N., Solberg, V.B, Olson, J.G., 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 36:1090-1095.

Muyzer, G., 1999. DDGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 3:317-322.

Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 32:897-928.

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 173:1576-1589.

Schabereiter-Gurtner, C., Lubitz, W., Rolleke, S., 2003. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J Microbiol Methods* 52:251-260.

Sparagano, O.A., Allsopp, M.T., Mank, R.A., Rijpkema, S.G., Figueroa, J.V., Jongejan, F., 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. *Exp Appl Acarol* 23:929-960.

Stanek, G., Steere, F., 2003. Lyme Borreliosis. *Lancet* 362:1639 - 1647.

Wilson, K.H., Blichington, R. B., Greene, R. C., 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28: 1942-1946.

Yoshino, K., Nishigaki, K., Husimi, Y., 1991. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acids Res* 19: 3153.

Table : Correlation of specific-PCR and TTGE results for the detection of *Borrelia burgdorferi* sl, *Anaplasma phagocytophilum*, and SFG *Rickettsia* spp. in pools of 10 *Ixodes ricinus* nymphs.

NS: not sequenced

Pathogens detected by specific PCR in pools	Number of pools tested	Pools with positive TTGE for specific pathogen	Closest BLAST match obtained from TTGE band; accession number ; (% similarity of the sequence)	Reference to figure
<i>B. burgdorferi</i> sl	20	15	<i>Borrelia burgdorferi</i> isolate St4; AY083501; (98%)	2A
<i>A. phagocytophilum</i>	11	11	<i>A. phagocytophilum</i> ; AY281809 ; (99%)	2B
<i>Rickettsia</i> SFG spp.	17	16	<i>Rickettsia</i> SGF sp.; AY158006; (99%)	2C
<i>B. burgdorferi</i> sl and <i>A. phagocytophilum</i>	2	2	NS	2D lanes 1 and 2
<i>B. burgdorferi</i> sl and <i>Rickettsia</i> SFG spp.	2	2	NS	2D lanes 3 and 4
<i>A. phagocytophilum</i> and <i>Rickettsia</i> SFG spp.	2	2	NS	2D lanes 5 and 6
<i>B. burgdorferi</i> sl, <i>A. phagocytophilum</i> and <i>Rickettsia</i> SFG spp.	1	1	NS	2D lanes 7

Figure legends

Figure 1: Design of the reference pathogen marker.

SYBR-green stained TTGE fingerprints of 16S rDNA fragments of tick-borne bacterial reference strains. Bg: *Borrelia garinii*; Ba: *Borrelia afzelii*; Bbss: *Borrelia burgdorferi* ss; Rc: *Rickettsia conorii*; Rh: *Rickettsia helvetica*; Aph: *Anaplasma phagocytophilum*. Mttge represented the reference marker made by addition of (from top to bottom of gel) *Borrelia garinii*, *Rickettsia conorii*, and *Anaplasma phagocytophilum* 16S rDNA TTGE fingerprints.

Figure 2: Use of broad-range PCR-TTGE for detection of DNA from bacterial tick-borne pathogens in extracts from pooled *I. ricinus* nymphs.

(A) 16S rDNA TTGE fingerprints of 10 pools with a positive PCR for *B. burgdorferi* sl. (Bbsl).

(B) 16S rDNA TTGE fingerprints of 10 pools with a positive PCR for *A. phagocytophilum*

(Aph). (C) 16S rDNA TTGE fingerprints of 7 pools with a positive PCR for SFG *Rickettsia* spp.

(Rsfg). (D) Lanes 1 and 2: 16S rDNA TTGE fingerprints 2 pools PCR positive for both *B.*

burgdorferi sl. and *A. phagocytophilum*; Lanes 3 and 4: 16S rDNA TTGE fingerprints of 2 pools

PCR positive for both *B. burgdorferi* sl. and *Rickettsia* spp.; Lanes 5 and 6: 16S rDNA TTGE

fingerprints of 2 pools PCR positive for both *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. Lane 7: 16S

rDNA TTGE fingerprints of 1 pool PCR positive for *B. burgdorferi* sl. *A. phagocytophilum* and

Rickettsia spp.. “Mttge” represents the reference marker.

a: band excised and sequenced corresponding to *Spiroplasma* sp.

b: band excised and sequenced corresponding to the alpha-proteobacterium IRicES1.

Figure 1

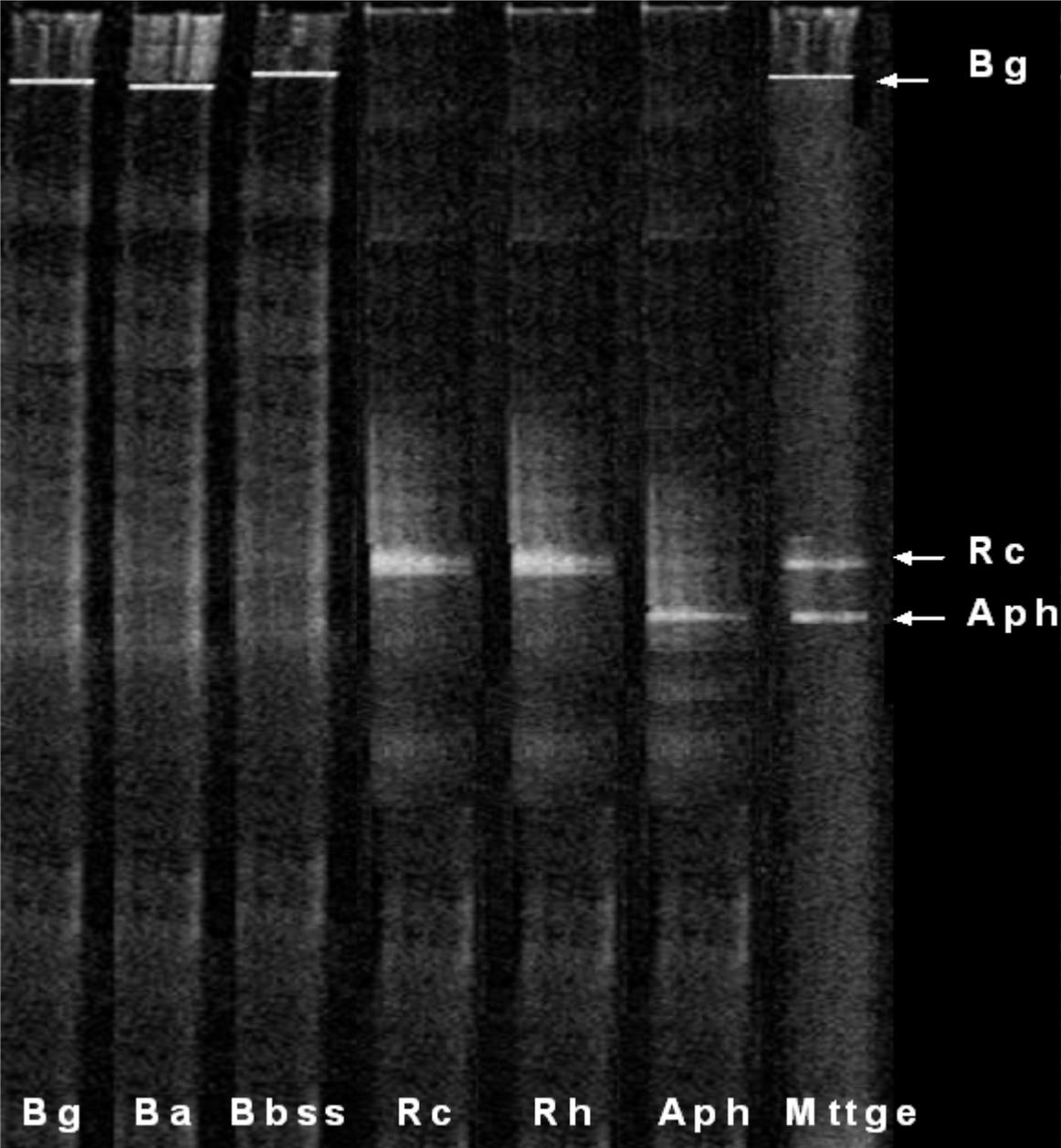
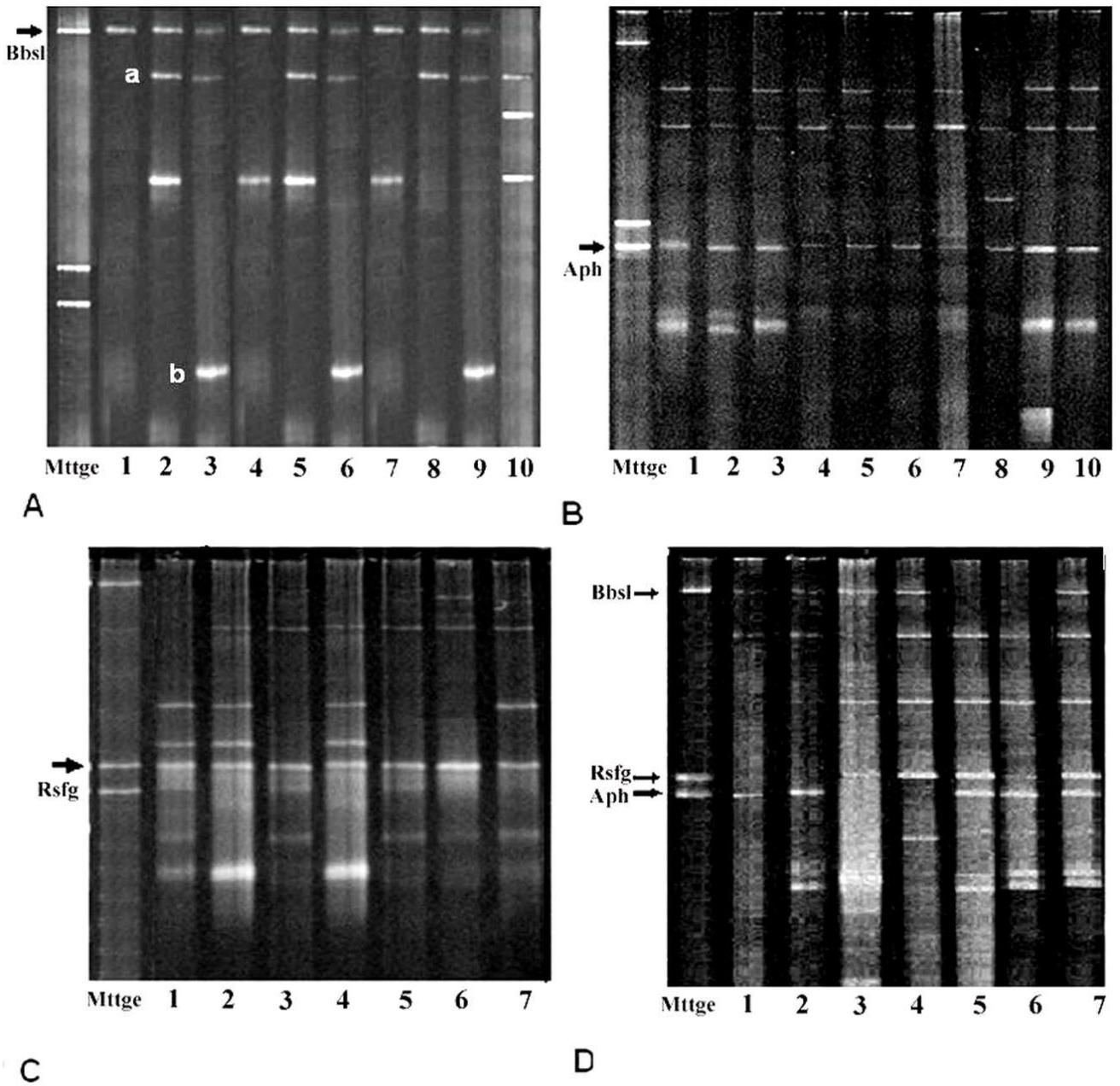


Figure 2



II.3 Bilan de la mise au point de la détection de plusieurs bactéries pathogènes dans les tiques par PCR universelle-TTGE

L'adaptation de la PCR universelle-TTGE à la détection de bactéries pathogènes vectorisées par les tiques nous a permis de mettre au point un marqueur composé des profils de migration de l'ADN de 3 bactéries pathogènes majeures, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum* et SFG *Rickettsia* sp.

Nous avons ensuite utilisé la technique pour la détection d'ADN de ces trois bactéries dans 55 échantillons dont nous connaissions le statut pour chacune d'elle grâce à des PCR spécifiques préalables. Nous avons montré que la PCR universelle-TTGE permet de mettre en évidence la présence d'ADN des agents pathogènes ciblés dans la plus grande partie des échantillons positifs en PCR spécifique. De même, les échantillons négatifs en PCR spécifiques se sont tous révélés négatifs en PCR universelle-TTGE.

Nous avons ensuite étendu l'étude à un plus large échantillonnage afin de préciser les différences de détection observées entre les deux techniques et valider la détection d'ADN d'agents pathogènes présents dans les tiques.

II.4 Comparaison des résultats de PCR spécifique et de PCR universelle-TTGE pour une cohorte d'échantillons.

Quatre-vingt treize échantillons d'ADN issu d'*I. ricinus* (38 femelles et 55 pools de 10 nymphes) provenant de la collecte des Combrailles (voir partie expérimentale 1) ont été analysés en PCR universelle-TTGE dans le but de comparer les résultats obtenus en PCR spécifique à ceux obtenus en PCR universelle-TTGE pour *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp.

Les résultats des deux types d'analyse ont été comparés (fig 26). Les résultats concordants c'est-à-dire « positifs selon les deux techniques » ou « négatifs selon les deux techniques » sont représentés en vert tandis que les résultats contradictoires sont représentés en rouge. Les valeurs notées indiquent les pourcentages des différentes catégories (la valeur globale est donnée pour le pourcentage des résultats concordants).

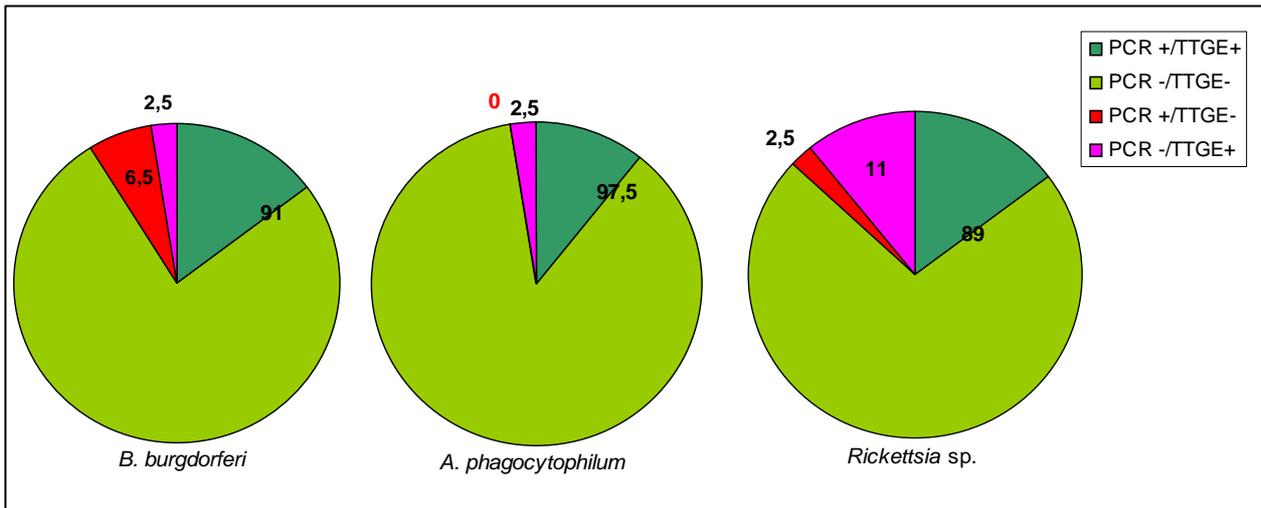


Figure 26 : Histogramme sectoriel de comparaison des résultats obtenus en PCR et en PCR universelle-TTGE pour la détection de *B. burgdorferi*, *Rickettsia sp.* et *A. phagocytophilum* dans une cohorte de 93 échantillons d'extraits d'ADN d'*I. ricinus*.

Nous avons testé la spécificité et la sensibilité de la technique de PCR universelle-TTGE pour la détection de chaque agent pathogène (tableau 16) en nous appuyant sur l'hypothèse que les résultats obtenus en PCR spécifique correspondaient aux résultats « vrais ». La PCR spécifique étant le standard actuel de détection, elle constitue l'unique étalon à notre disposition.

	<i>B. burgdorferi</i>	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
sensibilité	0,74 (+/- 0,09)	0,9 (+/- 0,06)	1
spécificité	0,97 (+/- 0,04)	0,86 (+/- 0,07)	0,97 (+/- 0,04)

Tableau 16 : bilan des tests de spécificité et de sensibilité de la PCR universelle-TTGE pour la détection de *B. burgdorferi*, *Rickettsia sp.*, et *A. phagocytophilum* dans des échantillons d'ADN extraits de tiques *Ixodes ricinus*. L'intervalle de confiance est noté entre parenthèse en italique.

Il y a une bonne concordance globale (de 89 à 97.5%) entre les résultats obtenus avec les deux techniques pour les différents agents pathogènes. La sensibilité et la spécificité de la PCR universelle-TTGE varient en fonction de l'agent pathogène recherché.

La technique semble très bien adaptée à la détection d'*A. phagocytophilum* pour laquelle la sensibilité est de 100% et la spécificité de 97%. Nous ne sommes pas parvenus à séquencer les bandes correspondant à *A. phagocytophilum* sur les deux échantillons [PCR-TTGE+].

La sensibilité reste assez faible pour la détection de *B. burgdorferi* (74%). Ceci peut être dû à la position de la bande correspondant à l'ADN de *B. burgdorferi*, située haut dans le gel et

difficile à mettre en évidence sur certains profils. Une autre hypothèse repose sur une sous représentation potentielle de *Borrelia* sp. dans la population bactérienne colonisant les tiques qui entraînerait une sous-dominance de sa séquence d'ADNr 16S dont il n'existe qu'une seule copie dans le génome de *Borrelia* (Liveris *et al.*, 1995). Il est possible que lors de la PCR universelle, l'ADN de *Borrelia* qui entre en compétition avec des populations de séquences dominantes, ne soit plus amplifié.

On note une concordance globale moindre pour la détection de *Rickettsia* sp. due à un défaut de spécificité plus important que pour les deux autres bactéries. Or dans le cas précis de la détection de *Rickettsia* sp., les gènes amplifiés lors de la PCR spécifique et lors de la PCR universelle ne sont pas les mêmes puisqu'il s'agit du gène de la citrate synthase (*gltA*) pour la PCR spécifique et du gène de l'ARNr 16S pour la PCR universelle. Cette différence pourrait expliquer les divergences observées. Ceci nous amène à discuter également le postulat de départ et le caractère « absolu » de la détection par PCR spécifique. En fait des limites de sensibilité et de spécificité existent pour les deux techniques et il est nécessaire d'en tenir compte quelle que soit l'étude menée.

La limite la plus importante de la technique pour des études de cohortes est sa lourdeur (analyse délicate, temps d'expérimentation longs). Son application à des études épidémiologiques comme celle menée en Auvergne n'est pas envisageable. C'est pour cette raison que nous avons essayé de développer une technique automatisée reposant sur le même principe, la PCR universelle-SSCP (single strain conformation polymorphism).

II.5 Application de la PCR universelle-SSCP à l'étude du portage de bactéries pathogènes par les tiques.

En SSCP, la conformation séquence-spécifique prise par l'amplicon d'ADNr 16S simple brin dénaturé détermine la vitesse de migration, et donc la séparation des fragments durant l'électrophorèse. L'utilisation d'une amorce portant un fluorochrome permet la détection automatique des brins marqués grâce à un laser (automate ABIPRISM 310 ; Applied Biosystems ; Courtaboeuf ; France). Les profils apparaissent sous la forme d'une succession de pics correspondant chacun à un fragment détecté par l'appareil. Nous avons procédé de la

même façon qu'en PCR-universelle TTGE, en analysant en premier lieu, les profils de migration des mêmes bactéries pathogènes que précédemment, avant de comparer les profils de ces bactéries à ceux obtenus pour des échantillons d'ADN extrait de tiques.

J'ai réalisé ces expériences au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA (Narbonne).

Les résultats obtenus montrent qu'une importante mise au point des conditions d'analyse est à prévoir avant l'application de la technique à la détection des bactéries pathogènes dans les tiques. Le détail des résultats de PCR universelle-SSCP est présenté en annexe 5. La principale difficulté à contourner est la superposition des profils des bactéries pathogènes ciblées (*Rickettsia* sp. et *Anaplasma phagocytophilum*).

II.6 Bilan de la détection de bactéries pathogènes dans leur vecteur par PCR universelle-TTGE

La PCR universelle-TTGE apparaît être un outil adaptable à la détection de trois bactéries pathogènes majeures dans les tiques. Dans ce cadre, elle constitue un outil de détection globale initiale d'intérêt.

Nous avons cependant mis en évidence des limites. Nous avons étudié la migration en TTGE de souches de *Coxiella burnetii*. La migration des différentes souches offre un profil similaire, reproductible, caractérisé par une bande unique et différent des autres bactéries pathogènes déjà étudiées. Cependant, l'amplification en PCR universelle du fragment de l'ADNr 16S d'un mélange d'ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Rickettsia* sp. et *Coxiella burnetii* suivi d'une séparation des fragments en TTGE ne permet pas de visualiser le fragment correspondant à *Coxiella burnetii*. Ceci peut être mis en relation avec une amplification sélective de certains fragments dans un mélange (Schabereiter-Gutner, *et al.* 2003). Il semble donc que la PCR universelle-TTGE ne soit pas adaptée à la détection de *Coxiella burnetii*. L'utilisation de la technique pour la détection des autres bactéries pathogènes transmises par les tiques comme *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Francisella tularensis* devrait être testée.

L'utilisation de la technique peut également être étendue à l'étude d'autres échantillons biologiques, que ce soit d'autres vecteurs arthropodes ou même des prélèvements cliniques. Elle nous a, par exemple, permis de mettre en cause l'implication d'*Helcococcus* sp. dans une endocardite chez un bovin (Maillard, 2004). Néanmoins, quelle que soit son application, il est nécessaire de standardiser la technique, en définissant ses limites de sensibilité et de spécificité dans le cadre précis de l'étude envisagée.

L'objectif initial était de mettre au point une technique rapide facilitant la détection de plusieurs agents pathogènes en une seule étape, adaptable à des études de cohortes. La PCR universelle-TTGE, trop lourde à mettre en œuvre, ne répond pas à cette intention. L'alternative automatisée que représente la PCR universelle-SSCP demande encore des mises au point importantes. Ces techniques offrent des perspectives non négligeables. Des équipes travaillent actuellement sur l'automatisation et la standardisation de la lecture des gels de TTGE/DGGE qui devraient, à terme, permettre de surmonter les difficultés pratiques inhérentes à ces techniques (Fromin *et al.*, 2002).

La seconde caractéristique de la PCR universelle-TTGE qui présente un intérêt dans le cadre de notre étude, est la possibilité de détecter les bactéries sans a priori. Ceci devrait permettre d'améliorer les connaissances que l'on a de la flore bactérienne des tiques mais aussi, à long terme, d'étudier d'éventuelles associations entre les bactéries pathogènes reconnues et les bactéries commensales des tiques.

III Analyse de la diversité de la flore bactérienne des tiques par PCR universelle –TTGE

Nous avons étendu notre étude à la caractérisation de « l'environnement microbiologique des tiques » en utilisant la PCR universelle-TTGE dans l'un de ses contextes initiaux d'application, l'écologie microbienne (Muyzer 1999 ; Bosshard *et al.*, 2000 ; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2003 ; Kirk *et al.*, 2004). L'objectif est d'avoir une vision d'ensemble des populations bactériennes colonisant les tiques qui devrait permettre d'étudier les relations éventuelles entre les bactéries pathogènes au portage avéré et les autres bactéries de « l'écosystème tique », ou de mettre en évidence des bactéries pathogènes non soupçonnées dans les tiques.

III.1 Matériel et méthode

1 Echantillons de tique étudiés

Pour cette étude, nous avons utilisé 16 échantillons de tiques appartenant aux genres *Dermacentor*, *Rhipicephalus* et *Ixodes* à différents stades, de différents sexes et à différents degrés de réplétion (tableau 17).

espèce	échantillon	origine de prélèvement	sexe stade	nbre de tiques / échantillon
<i>Dermacentor sp.</i>	03 c	Bovin (+/- G)	m	1
<i>R. sanguineus</i>	09 p	Chien (+/- G)	m	3
	12 P			
<i>Ixodes ricinus</i>	06a	Chien (G)	f	1
	N11	Sur la végétation en quête d'hôte (NG)	n	1
	N29		f	1
	N13		m	1
	N34		f	1
	N04		n	1
	P2Y2		n	10
	P46Y2		n	10
	B9F1		f	1
	B4Y3		n	10
	P87Y4		n	10
	B4Z1		n	10
	N20		m	1

Tableau 17 : : Origine et nature des échantillons de tiques utilisés pour la mise au point de l'étude. (G) : gorgé ; (NG) : non gorgé ; (+/-G) : stade de réplétion non connu

L'identification des tiques a été réalisée sur critères morphologiques à la loupe binoculaire (Bussieras et Chermette, 1991 ; Morel, 2000).

2 ADN bactérien

Des fragments dont le profil de migration était connu, amplifiés à partir d'ADN d'*E. coli* et d'ADN d'*Atopobium parvulum* (gracieusement fournis par Dr Suau, Conservatoire National des Arts et Métiers) ont permis de définir un marqueur dit « marqueur de migration ». La définition de ce marqueur a servi à mettre au point les conditions de migration pour l'étude de la diversité bactérienne. En effet, le génome d'*A. parvulum* est riche en GC et cette caractéristique se retrouve dans sa séquence d'ADNr 16S. Le profil de migration du fragment amplifié à partir cet ADN nous a servi à définir la limite

inférieure du front de migration. Le fragment d'ADN d'*E. coli* migre en position médiane sur le gel et a permis de définir le Rf* des bandes.

3 PCR universelle-TTGE

L'amplification du fragment correspondant à la région V3 de l'ADNr 16S bactérien a été réalisée à partir des échantillons de tiques et soumis à une électrophorèse en TTGE comme précédemment décrit. Les profils obtenus ont été analysés visuellement et les bandes d'intérêt ont été découpées.

4 Séquençage et Analyse des séquences

Pour 10 des échantillons, nous avons séquencé la totalité des bandes obtenues. Nous nous sommes limités à une ou deux bandes pour les 6 autres échantillons.

Les bandes ont été découpées et prélevées sur le gel. Chaque fragment isolé à partir du gel a été réamplifié avec le même couple d'amorces sans clamp GC (350F ; PC535) et le produit PCR a ensuite été séquencé. Les séquences obtenues ont été confrontées aux données des banques génomiques (Blastn). Les résultats du Blastn nous ont permis d'établir des corrélations phylogénétiques entre les séquences identifiées et celles présentes dans la banque.

Les logiciels informatiques ClustalX et Se-Alv1.0a1 ont été utilisés pour aligner l'ensemble de séquences obtenues dans l'étude et des séquences issues de GenBank correspondant à des représentants connus des eubactéries. Le logiciel PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.b10 a été utilisé pour l'obtention de l'arbre phylogénétique. La solidité des branches de l'arbre obtenu a été vérifiée par la technique de « bootstrap » qui effectue un échantillonnage aléatoire des positions nucléotidiques pour l'ensemble des séquences comparées. Les séquences générées par l'échantillonnage aléatoire sont analysées par la méthode de parcimonie (heuristic search) et un arbre consensus est déterminé. La solidité des branches de cet arbre est indiquée par un pourcentage de reproductibilité.

* Rapport de front de migration = rapport entre la distance de la bande inconnue au puits sur la distance de la bande de *E. coli* au puits

III.2 Résultats

1 Mise au point des conditions de migration

Les paramètres principaux qui influent sur la migration en TGGE sont le pourcentage de polyacrylamide du gel, le voltage, l'écart et l'augmentation horaire de la température. Le pourcentage de polyacrylamide du gel définit son maillage : plus le pourcentage est élevé plus la migration est ralentie. Le voltage a l'effet inverse : plus le voltage est élevé plus la migration est rapide. L'écart de température doit être compris dans une fenêtre qui garantit la dénaturation progressive de l'ADN de l'ensemble des eubactéries (en général T min entre 61°C et 66°C; T max de l'appareil : 70,5 °C). Enfin, la valeur de l'augmentation horaire de température détermine la bonne séparation des fragments. Nous avons défini les différents paramètres de migration grâce au marqueur de migration, afin que la bande correspondant au fragment d'ADN de *E. coli* (% GC intermédiaire) migre en position médiane, et que celle d' *Atopobium parvulum* (fragment riche en GC) migre dans le bas du gel. Les bandes des profils doivent être réparties sur l'ensemble du gel.

Les conditions de migration initialement définies par Suau (*communication personnelle*) pour des fragments d'ADN d'environ 500 pb étaient de 65V pour un écart de température allant de 66°C à 70°C avec une élévation horaire de + 0.2°C, sur un gel à 8% de polyacrylamide. Sous ses conditions et avec le couple d'amorces (350F+GC ; PC535), les fragments d'ADN amplifiés les plus riches en bases GC (fragments issus de *A. parvulum*) migrent hors du gel. Les conditions ont été progressivement modifiées jusqu'à l'observation de bandes correspondant aux fragments de cette espèce et d'une répartition homogène des bandes sur le gel.

Ainsi, les conditions optimales de migration ont été définies sur un gel à 10% d'acrylamide, sous un voltage de 55 V avec un écart de 63 à 70.5°C et une élévation horaire de la température de +0.4°C.

Nous avons essayé d'améliorer la lisibilité, faible en bas de gel, en coulant les gels en deux étapes avec un plus haut taux de polyacrylamide (13%) dans la partie inférieure du gel sans observer d'amélioration. Des essais de migrations à haut voltage pour réduire le temps

expérimental ont également été menés sans succès. Les profils présentaient de longs « smear » et les bandes étaient incurvées.

La quantité de produit PCR déposé a été calibrée à 10 µL. Ceci permet d'obtenir les profils les plus nets. Des quantités supérieures d'ADN offrent des profils saturés difficilement interprétables.

2 Profils de migration

Les 16 échantillons étudiés ont été soumis à plusieurs migrations en TTGE. Les profils obtenus étaient distincts, analysables, et en général, reproductibles. Cependant, pour certains profils, des bandes de faible intensité ne sont pas visibles à chaque migration. La valeur du Rf d'une bande définie peut varier d'une migration à l'autre ($\Delta_{\max} = \pm 0.1$).

Le nombre de bandes obtenues sur chaque profil est compris entre 1 et 11 bandes (fig 27). La répartition des bandes se fait sur l'ensemble du gel (rf de 0,05 à 1,58) mais le plus grand nombre est situé entre les valeurs de Rf comprises entre 0.2 et 1.1. Les bandes sont moins nettes et moins distinguables en bas de gel.

Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les profils obtenus à partir de nymphes *I. ricinus* traitées individuellement ou poolées ni entre les différents stades et sexe d'*I. ricinus* non gorgés. En revanche, la tique *I. ricinus* femelle gorgée présentait un profil différenciable de celui des autres tiques, caractérisé par une bande unique de forte intensité.

L'aspect des profils obtenus pour les tiques de différents genres ne présente pas de différences majeures.

Des bandes de même Rf sont retrouvées sur plusieurs échantillons de tiques de la même espèce.

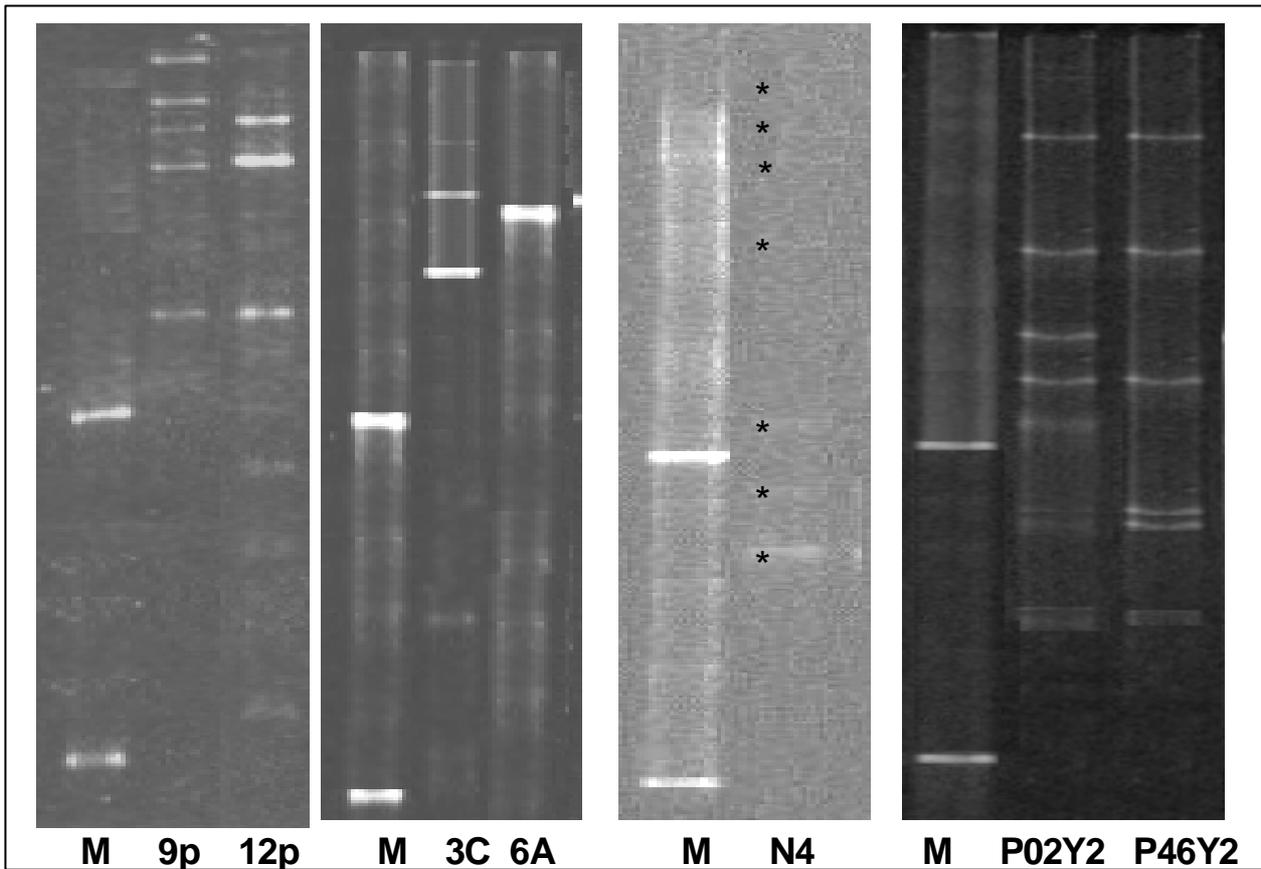


Figure 27 : Analyse sur gel de polyacrylamide à 10% de migrations TTGE de fragments d'ADNr 16S amplifiés à partir des échantillons de tiques : 9p ; 12p ; 3c ; 6A ; N4 ; P46Y2 ; P02Y2. M représente le marqueur composé de fragment d'ADNr 16S amplifié de *E. coli* (bande 1) et *A. parvulum* (bande 2). Les numéros de bandes sont attribués dans le sens de migration sur le gel : le n°1 correspond à la bande située le plus haut.

3 Séquences des bandes

Les différents taxons dont les séquences ont été retrouvées sur le profil de chaque échantillon sont présentés dans le tableau 18 (p 141).

Le détail des résultats est présenté dans le tableau 19 (p 143). Les numéros d'accèsion sous GenBank des séquences obtenues, ainsi que les taxons présentant une séquence similaire et leur origine biologique, sont indiqués. Les séquences ont été présentées par espèce de tique d'origine, par ordre et par famille.

Parmi ces séquences, certaines, notamment celles associées à *Spiroplasma* sp., *Mycobacterium* sp. et *Rickettsia* sp., sont retrouvées dans un grand nombre d'échantillons. D'autres n'ont été identifiées qu'une fois (séquences apparentées à *E. coli*, *Wolbachia* sp. etc.). Le nombre d'échantillons présentant une séquence similaire est indiqué dans le tableau 19 (une seule des séquences a été enregistrée dans GenBank pour éviter de saturer la banque de données).

Certains profils, notamment les échantillons N4 et N20, présentent plusieurs bandes distinctes mais de séquences identiques.

Nous avons pu identifier la séquence de la bande unique et de forte intensité trouvée sur le profil de la tique *I. ricinus* femelle gorgée 6A. La séquence a été apparentée à celle d'une *Coxiella* sp. considérée comme un symbionte de la tique *Haemaphysalis longicornis*.

Nous n'avons pu obtenir de séquences pour un grand nombre de bandes, soit parce que nous ne sommes pas parvenus à réamplifier le fragment, soit parce que le séquençage s'est révélé infructueux.

Aucune redondance spécifique d'association de bactéries n'a pu être mise en évidence

Dans le tableau 19 page suivante, L'origine biologique des taxons auxquels les séquences sont apparentées est soulignée par un code couleur : Les séquences en vert sont apparentées à des bactéries de l'environnement, les séquences en bleu sont apparentées à des bactéries symbiontes, les séquences en rouge sont apparentées à des bactéries pathogènes, les quatre séquences en jaune n'ont pas de corrélation phylogénétique proche. La séquence grisée est apparentée à un fragment d'ADN de tique.

Tableau 19 p 143 : Numéro d'accèsion sous GenBank des séquences retrouvées dans les tiques. Taxons bactériens dont la séquence du fragment de la région V3 de l'ADNr 16S est la plus proche phylogénétiquement de ces séquences et nombre d'échantillons présentant ces séquences

espèce de tique	Numéro accession GenBank	dénomination	Groupe	plus proche taxon reconnu en Blastn (origine)	similarité %	Nb de tiques portant cette séquence	
R. sanguineus	DQ065798	uncultured Bacillaceae bacterium 9p1	Gram-positive bacteria Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae	<i>Bacillus sp.</i> (environnement)	92	1	
	DQ065799	uncultured Moraxellaceae bacterium 9p2	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae;	<i>Moraxella sp.</i> (environnement)	98	2	
	DQ065800	uncultured bacterium 9p5	eubacteria	pas de séquence proche	92	1	
	DQ074438	uncultured Coxiella sp. clone 9p8(<i>clonage</i>)	Gammaproteobacteria; Legionellales Coxiellaceae	<i>Coxiella sp.</i> (symbionte de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>)	98	2	
Dermacentor sp.	DQ065801	uncultured bacterium 3c1	eubacteria	pas de séquence proche		1	
	DQ065802	uncultured gammaproteobacterium clone DS3c2	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales	<i>Legionella sp.</i> (environnement)	94	1	
	DQ065803	uncultured Actinomycetale bacterium clone DS3c5	Gram-positive bacteria, Actinobacteria; Corynebacterineae	<i>Corynebacterium sp</i> ; (environnement)	92	1	
I. ricinus	DQ065804	Uncultured Rickettsiale bacterium clone IRRB9F1	Alphaproteobacteria, Rickettsiales	Rickettsiale <i>IricES1</i> (symbionte d' <i>Ixodes ricinus</i>)	100	1	
	DQ074439	uncultured Rickettsiale bacterium N29D3		<i>Rickettsiales It86</i> (tique <i>Ixodes ricinus</i>)	99	1	
	DQ065816	uncultured Rickettsiale bacterium P46Y1D2		<i>Rickettsiales</i> Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> UWC8 (symbionte de protozoaire (amibe))	98	1	
	DQ065810	Rickettsia sp. clone IRN11D2	Alphaproteobacteria Rickettsiales Rickettsia, spotted fever group	<i>SFG Rickettsia sp.</i> (tique)	100	3	
	DQ065808	uncultured Wolbachieae bacterium clone IRB15Y1D1	Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Rickettsiaceae; Wolbachieae	<i>Wolbachia sp.</i> (symbiont d'arthropode <i>Xenopsylla cheopis</i>)	97	1	
	DQ065806	Anaplasma phagocytophilum clone IRB04Z1	Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (prélèvement clinique)	100	2	
	DQ074440	uncultured Anaplasmataceae bacterium clone P87Y4D1		<i>Ehrlichia-like sp. 'Schotti variant'</i> (<i>Ixodes ricinus</i> ticks)	98	1	
	DQ065818	uncultured Sphingomonale bacterium clone N08D1	Alphaproteobacteria; Sphingomonadales ; sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas sp</i> (<i>bactérie du sol</i>)	100	1	
	DQ065817	uncultured Enterobacteriale bacterium P02Y2D3	GammaProteobacteria , Enterobacteriales	<i>Escherichia sp.</i> (<i>gut cells</i>)	100	1	
	DQ074441	uncultured Pseudomonale bacterium clone N34D5		Gammaproteobacteria; Pseudomonale	<i>Pseudomonas sp.</i> (flore d'un acarien <i>Psoropte Ovis</i>)	95	2
	DQ074446	Uncultured Pseudomonadales bacterium clone N13D2				92	1
	DQ065819	<i>Ixodes ricinus</i> tick associated bacterium clone IRN4D5	Gammaproteobacteria, Legionellales ; Coxiellaceae.	<i>Legionellales</i> (environnement)	95	1	
	DQ065812	uncultured Coxiellaceae bacterium clone IRN34D4		<i>Coxiella burnetii strain RSA</i> (Q-fever <i>Coxiella burnetii</i> strain)	96	2	
	DQ074447	uncultured Coxiella sp. clone 6a1		<i>Coxiella sp</i> (associée à <i>Haemaphysalis sp.</i>)	97	1	
	DQ065805	Uncultured Coxiellaceae bacterium clone IRB04Y3D2		Coxiellaceae (symbionte de <i>Folsomia candida</i>)	94	1	
	DQ065809	uncultured Spiroplasma sp. clone IRN29D1		Gram-positive bacteria, Firmicutes, Entomoplasmatales, Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma sp.</i> (symbiont d'arthropode <i>Antonina crawii</i>)	100	3
	DQ065807	Mycobacterium sp. clone IRB04Z1D3	Gram-positive bacteria Actinobacteria Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium sp.</i> (environnement)	100	3	
	DQ065813	uncultured Rhodococcus sp. clone IRP28Y5D2	Gram-positive bacteria, Actinobacteria; Corynebacterineae; Nocardiaceae	<i>Rhodococcus sp.</i> (environnement sol)	97	1	
	DQ065811	Borrelia sp. clone IRN34D1	Spirochaetes, Borrelia	<i>Borrelia burgdorferi isolate St4</i> (tiques <i>Ixodes ricinus</i>)	97	1	
	DQ065815	uncultured eubacterial clone IRP28Y5	Eubacteria	pas de taxon présentant une séquence similaire		1	
DQ065814	uncultured eubacterial clone IRGD2						
	Non déposée	<i>Ixodes ricinus</i> 18S rRNA gene			100	4	

Afin d'essayer de déterminer la position phylogénétique des séquences sans taxon apparenté (DQ065800, DQ065801, DQ065814, DQ065815, DQ074448 et DQ074443) nous avons construit un arbre phylogénétique (fig. 28). Après alignement et comparaison des séquences, nous avons défini les *Borrelia* sp. comme groupe extérieur. La taille réduite de la séquence étudiée (52 nucléotides informatifs pour l'étude de distance) a conduit à l'obtention d'un arbre qui ne reflète pas toujours parfaitement la classification bactérienne couramment admise.

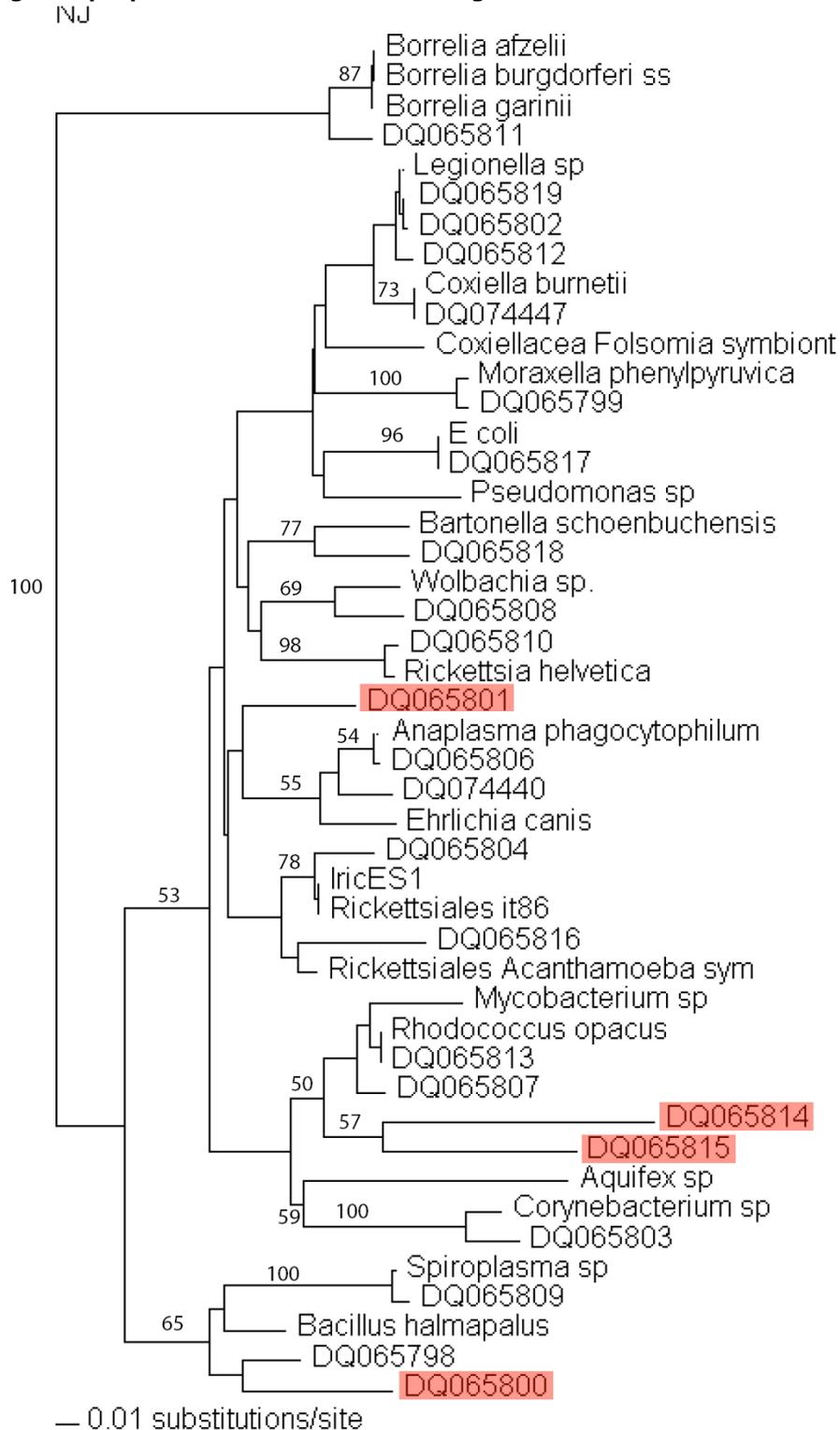
Deux de ces séquences (DQ074448 et DQ074443) se sont révélées aberrantes et perturbaient l'analyse. Elles pourraient correspondre à des séquences chimères générées par la PCR (Qiu et al., 2001). Elles ont été éliminées de l'analyse.

La séquence DQ065800, obtenue du profil d'un échantillon de tiques *R. sanguineus*, serait apparentée au groupe des bactéries Gram positif à faible GC%.

Les séquences DQ065814 et DQ065815, isolées sur le profil de deux pools de nymphes d'*I. ricinus*, sont apparentées au groupe des bactéries Gram positif à haut GC%.

En revanche, la position de la séquence DQ065801, isolée du profil d'une tique *Dermacentor* sp., est plus difficile à évaluer. D'après l'analyse de distance elle semble être rattachée aux Anaplasmatacea mais l'analyse de parcimonie ne confirme pas cette hypothèse.

Figure 28: Arbre de distance obtenu, à partir des séquences des fragments de la région V3 de l'ADN 16S isolés sur gel TTGE et des séquences de plusieurs bactéries (Genbank)*, à l'aide de l'analyse de «neighbor-joining» intégrée dans PAUP 4.0. Les pourcentages correspondent aux fréquences avec lesquelles les branches apparaissent avec une réplication de 100 bootstrap. Les séquences sans corrélation phylogénétique proche sont encadrées en rouge



* **Numéro d'accèsion GenBank :** *Borrelia afzelii* (X85197); *Borrelia burgdorferi ss* (NC001318). *Borrelia afzelii* (X85200); *Legionella sp.* (AB058918); *Coxiella burnetii* AE016960; *Coxiellaceae Folsomia symbiont* (AF327558); *Moraxella phenylpyruvica* (AF005192); *Escherichia coli* (AF527825); *Pseudomonas ps.* (AM084343); *Bartonella schoenbuchensis* (AJ278190); *Wolbachia sp.* (AY335935); *Rickettsia helvetica* (L36212); *Anaplasma phagocytophilum* (AY281809); *Ehrlichia canis* (AY394465); *IricES1* (AJ566640); *Rickettsiales It86* (AF525482); *Rickettsiales Acanthamoeba symbiont* (AF069962); *Mycobacterium sp.* (AY438071); *Rhodococcus opacus* (X80631); *Aquifex sp.* (AB175502); *Corynebacterium sp.* (AY914072); *Spiroplasma sp.* (AB030022); *Bacillus halmapalus* (X76447)

III.3 Bilan de l'analyse de la diversité de la flore microbienne des tiques

La PCR universelle-TTGE nous a permis de dresser l'inventaire des bactéries infectant les tiques. Bien entendu, la détection de bactéries par PCR universelle-TTGE n'est pas exhaustive et seules les populations les plus dominantes sont retrouvées. La technique permet néanmoins une analyse qui dépasse les possibilités limitées de la mise en culture et constitue actuellement l'un des outils les plus adaptés à l'étude de la diversité microbienne (Muyzer, 1999).

Etude de la population bactérienne colonisant les tiques

La littérature fait état de deux études de la biodiversité microbienne dans les tiques *Ixodes* sp. reposant sur l'amplification non sélective du gène de l'ARNr 16S et l'étude des séquences. La première a été menée en Autriche, sur 5 échantillons d'*I. ricinus* (3 pools d'adultes et 2 adultes traités individuellement). La région V3 de l'ADNr 16S bactérien a été amplifiée et les fragments ont été séparés en DGGE (Schabereiter-gutner *et al* , 2003). La seconde a été menée sur 7 nymphes d'*I. scapularis* aux Etats-Unis. Un fragment de 550 paires de bases de l'ADNr 16S incluant la région V3 a été amplifié et le clonage et le séquençage des clones a permis d'obtenir les séquences (Benson *et al.*, 2004). Les résultats comparés de ces deux études et de notre étude sont présentés dans le tableau 19 (page suivante).

Il y a plusieurs façons d'aborder la diversité microbienne : on peut, d'une part, s'intéresser à la diversité taxonomique, ou d'autre part, se pencher sur les caractères biologiques des bactéries présentes.

Si l'on s'intéresse à la classification taxonomique des bactéries colonisant les tiques, la très grande proportion de séquences associées à des alphaprotéobactéries, et en particulier des Rickettsiales est remarquable et est également mis en avant dans les deux autres études (Schabereiter-gurtner *et al.*, 2003 ; Benson, 2004).

D'une manière générale, il est intéressant de noter que les mêmes groupes, voire les même genre bactériens, sont retrouvés d'une étude à l'autre : ainsi des *Rickettsia* sp. sont identifiées dans toutes les études. Une séquence identique, attribuée à une Rickettsiales

symbionte d'*Acanthamoeba*, est même retrouvée dans les tiques autrichiennes et dans notre étude.

groupes bactériens et familles	Etude Autrichienne DGGE (schabereiter-Gurtner <i>et al.</i> 2003)	Etude Américaine clonage (Benson <i>et al.</i> , 2004)	Notre Etude
	<i>I. ricinus</i>	<i>I scapularis</i>	<i>I. ricinus</i>
Bactéries Gram positif bas GC%	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus</i> sp. • <i>Haemobartonella felis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus</i> sp. • <i>Streptococcus</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Spiroplasma</i> sp. • bactérie non identifiée
Bactérie Gram positif haut GC%	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhodococcus</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhodococcus</i> sp. • <i>Propionibacterium</i> sp. • <i>Mycobacterium</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycobacterium</i> sp. • <i>Rhodococcus</i> sp. • bactéries non identifiées
alpha-proteobactérie Rickettsiales	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Rickettsia</i> sp. • endosymbionte d'<i>Acanthamoeba</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Rickettsia</i> sp. • <i>Ehrlichia</i> sp. • <i>Wolbachia</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Rickettsia</i> sp. • endosymbionte d'<i>Acanthamoeba</i> • <i>Ehrlichia</i> sp. • <i>Wolbachia</i> sp. • <i>A. phagocytophilum</i> • IricES1 endosymbionte d'<i>I. ricinus</i>
alpha-proteobactérie Rhizobiales	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bartonella</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Afipia felis</i> • <i>methylobacterium</i> sp. • bactérie non identifiée 	
alpha-proteobactérie Sphingomonales		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Sphingomonas</i> sp 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Sphingomonas</i> sp.
alpha-proteobactérie Caulobacterales		<ul style="list-style-type: none"> • Caulobacteraceae bacterium 	
Gamma proteobactéries	<ul style="list-style-type: none"> • Coxiellacea endosymbionte de <i>Folsomia candida</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Acinetobacter</i> sp. • <i>Stenotrophomonas</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> • Coxiellacea endosymbionte de <i>Folsomia candida</i> • <i>Coxiella</i> sp. • Legionellales bacterium • <i>Escherichia coli</i>
Beta proteobactéries		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Burkholderia</i> sp. • <i>Delftia</i> sp. • bactéries non identifiées 	
Spirochètes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Borrelia afzelli</i> 		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Borrelia</i> sp.
Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides		<ul style="list-style-type: none"> • endosymbionte d' <i>Ixodes scapularis</i> 	

Tableau 20 : comparaison des populations bactériennes identifiées dans les tiques *Ixodes* sp. de deux études de la littérature et de la présente étude.

Les gammaprotéobactéries constituent également un groupe bien représenté. Là encore, une séquence de Coxiellacea, endosymbionte d'un micro-arthropode, *Folsomia candida*, est retrouvée à la fois dans les tiques *I. ricinus* de l'étude autrichienne et dans notre étude.

Parmi les bactéries Gram+ à haut GC%, les Actinobactéries des genres *Mycobacterium* sp. ou *Rhodococcus* sp., sont représentées dans les trois études. En

revanche, on observe plus de diversité pour les bactéries à bas GC%. Les séquences apparentées à *Streptococcus* sp., retrouvées à la fois en Autriche et aux Etats-Unis, n'ont jamais été identifiées au cours de notre étude. Inversement, la séquence correspondant à un *Spiroplasma* sp., très fréquente dans nos échantillons d'*I. ricinus*, n'a été retrouvée ni dans les échantillons autrichiens ni dans les échantillons américains. L'amplification d'un fragment artefact d'ADNr 18S d'*Ixodes* sp. est également observée lors de l'étude autrichienne. Enfin, la proportion d'entérobactéries est globalement faible, comparée aux résultats observés pour la plupart des biotopes vivants (J.J. Godon, communication personnelle).

Les différences entre les populations de séquences sont plus marquées avec l'étude menée sur *I. scapularis* aux Etats-Unis. Les auteurs ont, par exemple, identifié un certain nombre de séquences de betaprotéobactéries qui n'ont été retrouvées ni en Autriche ni dans notre étude. Ces différences peuvent venir de la technique utilisée. Les tiques de l'étude américaine ne sont pas lavées avant l'extraction d'ADN. Le bain élimine une grande partie des bactéries présentes à la surface de la tique. Ceci peut expliquer la plus grande diversité observée dans l'étude Américaine. Par ailleurs, le fragment de gène amplifié est différent. Les auteurs expliquent l'absence d'amplification d'ADN de *Borrelia burgdorferi* par défaut d'appariement du primer sens à l'ADN de la bactérie (Benson *et al.*, 2004). Ce phénomène peut être observé avec d'autres taxons bactériens. Les primers utilisés au cours de notre étude s'hybrident dans des zones particulièrement bien conservées et sont les primers les plus fréquemment utilisés lors d'analyse de fragments. Enfin, la répartition géographique d'*I. ricinus* diffère de celle d'*I. scapularis*. Cette différence de niche écologique peut se répercuter sur la flore interne des tiques comme l'illustre l'existence de symbiotes spécifiques de chaque espèce de tique (IricES1 pour *I. ricinus* et le symbiote Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides d'*I. scapularis*).

Si on s'intéresse aux caractères biologiques des bactéries infectant les tiques quatre groupes bactériens apparaissent.

L'ensemble le plus représenté, en terme de diversité de séquences, rassemble des bactéries symbiotes (en particulier *Spiroplasma* sp. dans notre étude seulement, *Coxiella* sp., et des Rickettsiales). Elles semblent représenter une très grande fraction de la population bactérienne colonisant les tiques. Ces résultats sont probablement à mettre en

relation avec le régime strictement hématophage de ces arthropodes qui dépendraient de bactéries symbiotiques pour assurer l'apport de nutriments comme cela a été décrit pour les triatomés (Eichler et Schaub, 2002).

La distinction entre agents pathogènes et symbiontes est parfois difficile chez les alpha et les gammaprotéobactéries, dans la mesure où, dans ces groupes, beaucoup de bactéries considérées comme symbiotiques sont phylogénétiquement très proches des bactéries pathogènes (Noda *et al*, 1997). Pourtant, lors de notre étude, nous avons pu observer que les profils obtenus pour les espèces bactériennes pathogènes diffèrent de ceux associés aux séquences de bactéries symbiontes pourtant phylogénétiquement proches (c'est notamment le cas pour les *Coxiella* sp.). Ceci peut être corrélé au fait que le génome des symbiontes a subi des modifications importantes au cours de l'évolution. Il semble notamment que le pourcentage en bases GC du génome de bactéries symbiotiques soit plus faible que celui de bactéries non symbiotiques appartenant au même genre (Wernegreen, 2002).

Le fait que la tique femelle *I. ricinus* gorgée 6a ait présentée un profil caractérisé par la dominance d'une seule séquence rapporté à une *Coxiella* sp. symbionte, soulève de nouveau la question des relations entre les arthropodes et leurs symbiontes. La signification biologique de cette dominance est inconnue. D'autre part, aucun symbionte *Coxiella* sp. n'avait encore été décrit chez *I. ricinus*.

De nombreuses séquences sont apparentées à des bactéries de l'environnement (sol, plantes, eau). Il s'agit en particulier des séquences apparentées aux différentes bactéries Gram positif à haut GC%.

Certaines séquences ont été assimilées à celles de bactéries pathogènes, dont la vectorisation par les tiques est connue, comme *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* ou encore *Rickettsia* SFG sp..

Enfin, les séquences sans corrélation phylogénétique correspondent vraisemblablement à des taxons bactériens encore non identifiés et ont été pour la plupart apparentées à des bactéries Gram positif.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interrelation spécifique entre les différents groupes bactériens colonisant les tiques. Il faudrait pour cela, mener l'étude sur un plus

vaste échantillons et dans des conditions complètement standardisées. Néanmoins, ce type d'étude reste une perspective envisageable pour la technique.

Il faut noter que l'analyse reste qualitative. Le grand nombre de séquences apparentées à un groupe de bactéries peut être lié à des biais de PCR comme l'amplification préférentielle de l'ADN de certaines bactéries due à un plus grand nombre de copies du gène de l'ARNr 16S (Klappenbach *et al.*, 2001 ; Schabereite-Gurtner, *et al.*, 2003).

Pour *R. sanguineus* et *Dermacentor* sp., le petit nombre d'échantillons étudiés ne permet pas d'offrir une vision d'ensemble de la population bactérienne de ces tiques. Cependant, les populations bactériennes semblent assez distinctes d'un genre de tique à l'autre, puisque aucune séquence identique n'a été retrouvée chez des tiques de genres différents dans notre étude. Dans le cas des tiques *R. sanguineus* prélevées sur des chiens, la présence de séquences apparentées à celle de *Moraxella* sp. peut être expliquée par le léchage des zones d'adhésion des tiques par l'hôte car le genre *Moraxella* est commensal des muqueuses des carnivores domestiques (Talan *et al.*, 1999).

Limites de la PCR universelle-TTGE

Les limites de l'application de la PCR universelle-TTGE sont, tout d'abord, d'ordre technique. Outre la lourdeur et le temps d'expérimentation, la complexité de l'analyse limite l'exploitation de la technique. La reproductibilité des gels reste encore à améliorer et le manque de standards actuels se fait cruellement ressentir (Fromin *et al.*, 2002). D'autres facteurs peuvent moduler la qualité de l'analyse. Les erreurs générées par la PCR peuvent aboutir à des mutations ou des chimères dont la proportion est non négligeable (Qiu *et al.*, 2001) et qui conduisent à surestimer la diversité d'un échantillon. Ainsi, dans notre cas, la présence de plusieurs bandes de séquences identiques mais dispersées sur le gel, perturbe l'analyse et n'est pas clairement expliquée. Des erreurs commises par l'ADN polymérase, notamment en début et en fin d'élongation, et l'ajout de bases en fin d'élongation peuvent être à l'origine de ces bandes aléatoires. Les séquences DQ074448 et DQ074445, quant à elles, correspondent vraisemblablement à des chimères. A l'inverse, la séparation est parfois insuffisamment discriminante et certaines bandes peuvent être composées d'un mélange de

fragments (Muyzer, 1999 ; Kirk *et al.*, 2004 ; Nikolausz *et al.*, 2005), ce qui explique que le séquençage ait parfois été infructueux.

Les limites de la technique sont également «conceptuelles». La surreprésentation de certaines séquences, comme évoquer précédemment, peut masquer la présence de bactéries sous-dominantes dont l'ADN n'est jamais amplifié. En outre, il faut garder à l'esprit le fait que l'on travaille, non pas sur une population de bactéries, mais sur une population de séquences. On considère souvent que le nombre de séquences uniques obtenu correspond à la diversité des micro-organismes en oubliant que le génome des bactéries peut comporter plusieurs copies hétérogènes du gène de l'ARNr 16S (Klappenbach *et al.*, 2001).

Quoiqu'il en soit, utilisée en connaissance de ses limites, la PCR universelle-TTGE ouvre des perspectives d'études écologiques remarquables comme en témoigne le nombre toujours croissant d'études utilisant cette technique. Elle nous a permis de fournir une vue d'ensemble du bactériome complexe associé à *I. ricinus*. Nous avons pu mettre en évidence l'abondance de symbiontes, certains identifiés également dans d'autres études (Coxiellaceae ou Rickettsiales) et d'autres associés pour la première fois aux tiques (*Spiroplasma* sp.). La proximité des symbiontes et des agents pathogènes nous autorisent à les considérer comme potentiellement transmissibles et pathogènes et il s'agit peut être de la détection de futurs agents pathogènes émergents. Ces bactéries symbiontes peuvent aussi constituer la cible de programme de contrôle des populations de lutte. Dans ces deux contextes, la PCR-universelle TTGE ouvre de nouveaux champs d'investigation.

IV Conclusion du deuxième chapitre

La PCR universelle, accompagnée de l'utilisation de techniques d'étude des séquences, ouvre donc de nouvelles perspectives pour l'étude du portage d'agents bactériens par les tiques.

L'une des perspectives particulièrement attractives de cette technique, dans le cadre de l'étude des tiques, est l'association d'une étude de portage de bactéries pathogènes à une

étude «écologique » ; elle offrirait un nouvel angle pour appréhender la vectorisation de bactéries pathogènes.

En outre, elles permettent de détecter des bactéries sans a priori ; elles pourraient, dans ce cadre, accompagner des suivis d'émergence. Il est intéressant de noter que c'est d'ailleurs le principe de « détection moléculaire à large spectre » qui dans un contexte différent a permis l'identification d'un corona virus comme étant responsable du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère seulement quelques semaines après l'émergence clinique de la maladie (Peiris *et al.*, 2003).

L'utilisation de routine de ces techniques demande encore des efforts de mise au point et leur complexité d'analyse oblige à une certaine prudence dans l'interprétation des résultats. Quoiqu'il en soit, elles représentent des outils puissants, au potentiel encore peu exploité dans le domaine de la recherche biomédicale.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail de thèse nous avons mis au point des techniques simples, adaptées à l'étude du portage d'ADN d'agents pathogènes par les tiques. Ceci nous a permis d'étudier le portage de plusieurs bactéries par les tiques *Ixodes ricinus* en milieu naturel et d'évaluer différents facteurs de risque de transmission de ces agents ainsi que de les caractères biologiques déterminant leur cycle naturel. Ainsi nous avons montré la réalité du risque de transmission de *B. burgdorferi* sI, *A. phagocytophilum* et SFG *Rickettsia* sp., aussi bien dans les bois que dans les pâtures, en Auvergne. Nous avons montré que le portage de ces agents était dépendant de facteurs comme l'habitat de la tique mais que ces facteurs n'avaient pas la même influence suivant le stade ou le sexe des tiques. Nous avons également déterminé le rôle des tiques en tant que vecteur potentiel des bactéries du genre *Bartonella* en France et montré l'implication probable d'autres arthropodes hématophages dans la vectorisation des *Bartonella* infectant les ruminants. Enfin nous avons développé de nouvelles stratégies d'étude du portage de bactéries pathogènes par les tiques en adaptant des techniques de biologie moléculaire innovantes comme la PCR universelle-TTGE et PCR universelle-SSCP. Nous avons montré que ces techniques offraient des perspectives prometteuses dans ce cadre.

L'étude et la connaissance des phénomènes qui gouvernent la relation tiques-agents pathogènes sont essentielles à la veille dynamique et à l'évaluation du risque représenté par les maladies vectorisées. Le portage de l'ADN des agents pathogènes par les responsables par les tiques est un bon indicateur épidémiologique. Les études de détection d'ADN d'agents pathogènes dans les tiques, conduites de manière standardisée, sont donc des outils très utiles. Des études complémentaires sont nécessaires pour appréhender le problème complexe posé par les maladies à tiques.

Des études expérimentales de transmission, permettront de reproduire ce que nous avons cru percevoir dans les cycles naturels et affineront les connaissances en confirmant ou infirmant les hypothèses posées. La mise en place d'un protocole expérimental de

transmission des bactéries du genre *Bartonella* par les tiques et les hippoboscides, par exemple, permettra de définir le cycle biologique de cette bactérie. En parallèle, des études de co-transmission avec d'autres agents pathogènes vectorisés permettront de répondre à la question de l'existence de complexes de transmission. Ces études permettront de définir des indicateurs utiles et souvent manquants, comme la compétence vectorielle des vecteurs pour les différents agents pathogènes.

La connaissance précise du statut médical de la population humaine et animale dans les zones étudiées par rapport aux agents ciblés est également fondamentale et des études doivent être menées en parallèle à toute investigation de portage chez les vecteurs. Si des études de séroprévalence humaine existent, nous ne disposons pas du même recul en ce qui concerne les animaux domestiques et surtout sauvages. Or, la plupart des maladies infectieuses vectorisées sont des zoonoses possédant un réservoir sauvage. Certaines, comme l'anaplasmose granulocytaire à *A. phagocytophilum*, sévissent dans les populations animales domestiques, ont un potentiel infectieux chez l'homme, et pourraient donc émerger à la faveur d'une modification infime de l'environnement. L'étude de telles affections, intimement liées à l'environnement et impliquant de nombreuses espèces animales vertébrées et invertébrées, nécessite une collaboration étroite entre de nombreux corps de métiers, chercheurs, médecins, vétérinaires mais aussi spécialistes de la faune sauvage (ONC; ONF). D'autres disciplines comme la géographie, l'écologie et la sociologie doivent également être prises en compte. Il est nécessaire de traiter le maximum d'informations aussi bien formelles qu'informelles et d'évaluer leur degré de pertinence.

Etudes expérimentales et épidémiologiques doivent se nourrir les unes des autres et seule la combinaison de l'ensemble de leurs résultats permettra de comprendre les mécanismes intimes qui régissent la transmission d'agents pathogènes par les tiques et, peut être, un jour, de relever le défi qu'est la prédiction de l'émergence d'une maladie.

Bibliographie

Adelson ME, Rao RV, Tilton RC, Cabets K, Eskow E, Fein L, Occi JL, Mordechai E. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. J Clin Microbiol. 2004; 42(6):2799-2801.

Aksoy S. Control of tsetse flies and trypanosomes using molecular genetics. Vet Parasitol. 2003; 25;115(2):125-145.

Alexander B. A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1995 ; 52(4):354-359.

Allsopp MT, Visser ES, du Plessis JL, Vogel SW, Allsopp BA. Different organisms associated with heartwater as shown by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. Vet Parasitol. 1997; 71(4):283-300.

Amyx HL, Huxsoll DL. Red and gray foxes, potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. J Wildl Dis. 1973; 9(1):47-50.

Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1991; 29(12):2838-2842.

Anderson BE, Sims KG, Olson JG, Childs JE, Piesman JF, Happ CM, Maupin GO, Johnson BJ. *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. Am J Trop Med Hyg. 1993; 9:239-244.

Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 203-219.

Arraga-Alvarado C. Human ehrlichiosis. Review Invest Clin. 1994; 35(4):209-22.

Arzouni JP. Une enquête séro-épidémiologique dans le Puy-de-Dôme, à propos de trois maladies transmissibles par les tiques: la maladie de Lyme, la fièvre boutonneuse méditerranéenne, la fièvre Q. Thèse de doctorat en médecine, Université Clermont-Ferrand I, Clermont-Ferrand, France. 1990 ; 169 p.

Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerg Infect Dis. 1998; 4(2):179-186.

- Baneth G, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Pappalardo B, Ryan J.** A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Vet Parasitol.* 1998; 74(2-4):133-142.
- Barbet AF.** Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Vet Parasitol.* 1995 ; 57(1-3):43-49.
- Bellet-Edimo R.** Importance de la transmission trans-stadiale et de la transmission transovarienne du spirochète *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales : Spirochaetaceae) chez la tique *Ixodes ricinus* (Acari : Ixodidae) dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme. PhD thesis, University of Neuchatel, Neuchatel, Suisse. 1997; 152p.
- Belongia E.** Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne zoonotic Dis.* 2002; 2(4):265-273.
- Beninati T, Lo N, Noda H, Esposito F, Rizzoli A, Favia G, Genchi C.** First detection of spotted fever group *Rickettsiae* in *Ixodes ricinus* from Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9):983-986.
- Beninati T, Lo N, Sacchi L, Genchi C, Noda H, Bandi C.** A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(5):2596-2602.
- Benson MJ, Gawronski JD, Eveleigh DE, Benson DR.** Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(1):616-620.
- Bermond D, Boulouis HJ, Heller R, Van LG, Monteil H, Chomel BB, Sander A, Dehio C, Piemont Y.** *Bartonella bovis*, Bermond *et al.* sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52(2):383-390
- Black WC, Piesman J.** Phylogeny of hard and soft-tick taxa (Acari : Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:10034-10038.
- Black WC, Klompen JSH, Keirans JE.** Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Mol Phylogenet Evol.* 1997; 7:129-144.
- Blanco JR, Oteo JA.** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8(12):763-772.

Blaskovic D, Barak I. Oligo-chip based detection of tick-borne bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 243(2):473-478.

Bosshard PP, Santini Y, Gruter D, Stettler R, Bachofen R. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000; 31(2):173-182.

Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005; 36(3):383-410.

Boulouis HJ, Chomel B. Actualité sur les bartonelloses. *Bull Acad Netle Méd.* 1999; 183(7):1399-1412.

Boulouis HJ, Chomel B. Infections émergentes à *Bartonella*. *Rev Prat.* 2004 ; 54(18):1982-1986.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B; ESCMID Study Group on *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Bartonella*; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004 ; 10(12):1108-1132.

Brun I. Les maladies transmises par les tiques : d'après l'expérience Auvergnate. Thèse de doctorat en médecine, Université Clermont-Ferrand I, Clermont-Ferrand, France. 2000; 213p.

Bussieras J, Chermette R. Entomologie vétérinaire (Abrégé de parasitologie vétérinaire, fascicule IV). Service de Parasitologie de l'E.N.V.A : Maisons-Alfort. 1991 ; 163p.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Heller RM, Ueno H, Yamamoto K, Bleich VC, Pierce BM, Gonzales BJ, Swift PK, Boyce WM, Jang SS, Boulouis HJ, Piemont Y. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg Infect Dis.* 2000 ; 6:306-311.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(4):1221-1226.

Chang CC, Hayashidani H, Pusterla N, Kasten RW, Madigan JE, Chomel BB. Investigation of *Bartonella* infection in ixodid ticks from California. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2002; 25(4):229-236.

Chang YF, Novosel V, Chang CF, Kim JB, Shin SJ, Lein DH. Detection of human granulocytic ehrlichiosis agent and *Borrelia burgdorferi* in ticks by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 1998; 10(1):56-59.

Chen CL, Swallow WJ. Using group testing to estimate a proportion and to test the Binomial Model. *Biometrics.* 1990; 46: 1035-1040.

Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L, Goncalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3):1316-1318.

Collin E. L'anaplasmose bovine. Recueil du colloque Européen Francophone, "Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses", Ploufragan, France. 2003 ; 123- 125.

Combes C. Interactions durables. Ecologie et évolution du parasitisme, Edit. Masson, France. 1995; 524 p.

Cotte V. Maladies transmises par les tiques en Auvergne : étude de risque. Mémoire de master Master 2 recherche, Biodiversité et fonctionnement des écosystèmes. Université de Clermont-Ferrand I, Clermont-Ferrand, France. 2005; 30p.

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(7):3164-3168.

Dalton MJ, Clarke MJ, Holman RC, Krebs JW, Fishbein DB, Olson JG, Childs JE. National surveillance for Rocky Mountain spotted fever, 1981-1992: epidemiologic summary and evaluation of risk factors for fatal outcome. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 52(5):405-413.

Davoust B. Ehrlichioses canines et félines autres que celles à *Anaplasma phagocytophilum*. Recueil du colloque Européen Francophone "Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses", Ploufragan, France. 2003; 26- 28. a

Davoust B. *A. phagocytophilum* chez le cheval en France et en Europe. Recueil du colloque Européen Francophone "Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses", Ploufragan, France. 2003; 45-47. b

Dehio C, Sauder U, Hiestand R. Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. J Clin Microbiol. 2004; 42(11):5320-5323.

De Meeûs T, Beati L, Delaye C, Aeschlimann A, Renaud F. Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. Evolution Int J Org Evolution. 2002; 56(9):1802-1807.

De Meeûs T, Lorimier Y, Renaud F. Lyme borreliosis agents and the genetics and sex of their vector, *Ixodes ricinus*. Microbes Infect. 2004; 6(3):299-304.

De Moura AB, Vidotto O, Yamamura MH, Vidotto MC, Da Luz Pereira AB. Studies on the *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) infection in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) using "nested" PCR. Rev Bras Parasitol Vet. 2003; 12(1): 27-32.

Derdakova M, Halanova M, Stanko M, Stefancikova A, Cislakova L, Pet'ko B. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med. 2003; 10(2):269-271.

Des Vignes F, Fish D. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by host-seeking *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae) in southern New York state. J Med Entomol. 1997; 34(4):379-382.

Diza E, Papa A, Vezyri E, Tsounis S, Milonas I, Antoniadis A. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. Emerg Infect Dis. 2004; 10(9):1692-1693.

Dournon E, Villemainot S, Hubert B. La maladie de Lyme en France : enquête réalisée auprès d'un réseau sentinelle de médecins généralistes. Bull Épidémiol Hebd. 1989 ; 185-186.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales : unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(6):2145-2165.

Dumler JS, Sutker WL, Walker DH. Persistent infection with *Ehrlichia chaffeensis*. Clin Infect Dis. 1993; 17(5):903-905.

Dworkin MS, Shoemaker PC, Anderson DE. Tick paralysis: 33 human cases in Washington state, 1946-1996. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:1435-1439.

Eichler S, Schaub GA. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol.* 2002; 100(1):17-27.

Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(4):631-646.

Eremeeva M, Yu X, Raoult D. Differentiation among spotted fever group Rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:803-810.

Eskow E, Rao RV, Mordechai E. Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex. *Arch Neurol.* 2001; 58(9):1357-1363.

Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, ITG Library, Zaragoza, Espagne. 2004; 131 pp.

Euzéby JP. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, [en ligne] <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/> Mise à jour avril 2005

Euzéby JP. *Borrelia burgdorferi* et la maladie de Lyme chez les animaux : revue générale. *Revue Méd Vét.* 1989;140(5):371-388.

Faburay B, Munstermann S, Geysen D, Bell-Sakyi L, Ceesay A, Bodaan C, Jongejan F. Point seroprevalence survey of *Ehrlichia ruminantium* infection in small ruminants in the Gambia. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12(4):508-512.

Feldman KA. Tularemia. *J Am Vet Med Assoc.* 2003; 222(6):725-730.

Fialho RF, Stevens L. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2000; 267(1451):1469-1473.

Fournier PE, Gunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, Eastern France. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6(4):389-392 a

Fournier PE, Tissot-Dupont H, Gallais H, Raoult D. *Rickettsia mongolotimonae*: a rare pathogen in France. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6(3):290-292. b

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol.* 2002; 4(11):634-643.

Gasser AM, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB. Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2001; 37(1):41-48.

George JC. Maladies liées à la morsure de tiques [en ligne] <http://www.ifrance.com/maladies-a-tiques>. mise à jour mars 2005.

Gilot B, Degeilh B, Pichot J, Doche B, Guiguen C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) in *Ixodes ricinus* populations in France, according to a phytoecological zoning of the territory. *Eur J Epidemiol.* 1996; 12(4):395-401.

Guttman DS, Wang PW, Wang IN, Bosler EM, Luft BJ, Dykhuizen DE. Multiple infections of *Ixodes scapularis* ticks by *Borrelia burgdorferi* as revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(3):652-656.

Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol.* 2004; 293(37):86-92.

Harvey WT, Salvato P. Lyme disease: ancient engine of an unrecognised borreliosis pandemic? *Med Hypoth.* 2003; 60:742-759.

Heller R, Artois M, Xemar V, De Briel D, Gehin H, Jaulhac B, Monteil H, Piemont Y. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(6):1327-1331.

Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, Elkins KL, Sjostedt A, Shipley M, Ibrahim MS. Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62(2):310-318.

Hill CA, Gutierrez JA. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Med Vet Entomol.* 2003; 17(2):224-227.

Hofmeister EK, Kolbert CP, Abdulkarim AS, Magera JM, Hopkins MK, Uhl JR, Ambyaye A, Telford SR, Cockerill., FR, Persing DH. Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. *J Infect Dis.* 1998; 177:409-416.

Holden K, Boothby JT, Anand S, Massung RF. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) from a coastal region of California. *J Med Entomol.* 2003; 40(4):534-539.

Hoogstral H, Aeschlimann A. Tick-host specificity. *Bull Soc Entomol Suisse.* 1982; 55:5-32.

Hubalek Z, Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol.* 1997; 13(8):951-957.

Hubbard MJ, Cann KJ, Wright DJ. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. *Exp Appl Acarol.* 1995; 19(8):473-478.

Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(11):4219-4221.

Ji N, Peng B, Wang G, Wang S, Peng X. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *J Microbiol Methods.* 2004; 57(3):409-413.

Johnson BJ, Happ CM, Mayer LW, Piesman J. Detection of *Borrelia burgdorferi* in ticks by species-specific amplification of the flagellin gene. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47(6):730-741.

Joncourt G. et Collin E. L'éhrlichiose bovine dans l'Ouest de la France, de 1999 à 2003. réstitution des résultats. Recueil du colloque Européen Francophone "Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses", Ploufragan, France. 2003; 58-111.

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods.* 2004; 58(2):169-188.

Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* 2001 ;29(1):181-184.

Klompen JSH, Black WC, Keirans JE, Oliver JH. Evolution of ticks. *Annu Rev Entomol.* 1996; 41:141-161.

Kocan AA, Levesque GC, Whitworth LC, Murphy GL, Ewing SA, Barker RW. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6(5):477-480.

Kocan KM, Hair JA, Ewing SA, Stratton LG. Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by *Dermacentor andersoni* (Stiles) and *Dermacentor variabilis* (Say). Am J Vet Res. 1981; 42(1):15-18.

Kock ND, van Vliet AH, Charlton K, Jongejan F. Detection of *Cowdria ruminantium* in blood and bone marrow samples from clinically normal, free-ranging Zimbabwean wild ungulates. J Clin Microbiol. 1995; 33(9):2501-2504.

Kolbert C. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. In D. Persing (ed.) : PCR protocols for emerging infectious diseases, ASM Press, Washington, USA. 1996; p.106-111

Kopecky J, Konik P, Slavikova V, Salat J, Reznickova J, Dvorožnakova E, Kyckova K, Chmelar J. Immunomodulatory molecules in *Ixodes ricinus* saliva and transmission of *Borrelia burgdorferi*. In proceedings of the Fifth International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens, Neuchâtel, Suisse 29 08- 02 09 2005 p 69.

Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Southwick KL, Colitz CM, Hancock SI, Bradley JM, Rumbough R, Mcpherson JT, MacCormack JN. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. J Clin Microbiol. 1999; (37):2631-2638.

Kramer VL, Randolph MP, Hui LT, Irwin WE, Gutierrez AG, Vugia DJ. Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60(1):62-65.

Kurtti TJ, Munderloh UG, Andreadis TG, Magnarelli LA, Mather TN. Tick cell culture isolation of an intracellular prokaryote from the tick *Ixodes scapularis*. J Invertebr Pathol. 1996 ;67(3):318-21.

Kurtti TJ, Palmer AT, Oliver JH. *Rickettsiella*-like bacteria in *Ixodes woodi* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 2002; 39(3):534-540.

Lakos A. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA). Wien Klin Wochenschr. 2002; 114(13-14):648-654.

Lane RS, Steinlein DB, Mun J. Human behaviors elevating exposure to *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) nymphs and their associated bacterial zoonotic agents in a hardwood forest. J Med Entomol. 2004; 41(2):239-248.

Leutenegger CM, Pusterla N, Mislin CN, Weber R, Lutz H. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. J Clin Microbiol. 1999; 37:3390-3391.

Levin ML, des Vignes F, Fish D. Disparity in the natural cycles of *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. Emerg Infect Dis. 1999; 5(2):204-208.

Levin ML, Fish D. Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks. Infect Immun. 2000; 68(4):2183-2186.

Liveris D, Gazumyan A, Schwartz I. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 1995 ;33(3):589-595

Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M. PCR detection of granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. J Clin Microbiol. 2000; 38(3):1002-1007

Liz JS, Sumner JW, Pfister K, Brossard M. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). J Clin Microbiol. 2002; 40(3):892-897.

Lockhart JM, Davidson WR, Stallknecht DE, Dawson JE, Wowerth EW. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. J Clin Microbiol. 1997; 35:1681-1686.

Long SW, Zhang X, Zhang J, Ruble RP, Teel P, Yu XJ. Evaluation of transovarial transmission and transmissibility of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 2003; 40(6):1000-1004.

Lorenz H, Jager C, Willems H, Baljer G. PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(11):4234-4237.

Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, Garcia M, Hollis DG, Wegner S, Morgan G, Almeida R, Leong D, Greisen KS, et al. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. Clin Infect Dis. 1992; 14(3):683-688.

Magnarelli LA, Dumier JS, Anderson JF. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis and Lyme borreliosis in human sera. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:3054-3057.

Maillard R, Vayssier-Taussat M, Bouillin C, Gandoin C, Halos L, Chomel B, Piemont Y, Boulouis HJ. Identification of *Bartonella* strains isolated from wild and domestic ruminants by a single-step PCR analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *Vet Microbiol.* 2004; 98(1):63-69.

Maillard R. Bartonellose bovine : étude de l'épidémiologie de l'infection par les bactéries du genre *Bartonella* chez les bovins et de leur pouvoir pathogène. Thèse de doctorat universitaire. Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, France. 2004; 272 p.

Marconi RT, Garon CF. Development of polymerase chain reaction primers sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:2830-2834.

Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG. Nested PCR assay for detection of granulocytic *Ehrlichiae*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(4): 1090-1095.

Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:717-722.

Matthewman L, Kelly P, Hayter D, Downie S, Wray K, Bryson N, Rycroft A, Raoult D. Domestic cats as indicators of the presence of spotted fever and typhus group *Rickettsiae*. *Eur J Epidemiol.* 1997; 13(1):109-111.

Mather TN, Vaenzuela JG, Ribeiro JMC, Karim S, Miller NJ, Choudhury S, Pichu S, Caldwell K, Faghri S, Francischetti IMB, Pham VM. Prospect for anti-tick vaccines to prevent tick-borne diseases. In proceedings of the Fifth International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens, Neuchâtel, Suisse 29 08- 02 09 2005 p 82.

Mauel MJ, Carlton SJ, Mather TN. Polymerase chain reaction detection efficiency of the human granulocytic ehrlichiosis agent (Rickettsiaceae: *Ehrlichiae*) in ticks (Acari: *Ixodidae*) is dependent on the DNA extraction method. *J Med Entomol.* 1999; 36(6):649-652.

Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(4):518-553.

McQuiston JH, Paddock CD, Holman RC, Childs JE. The human ehrlichioses in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5(5):635-642.

Michel H, Wilske B, Hettche G, Gottner G, Heimerl C, Reischl U, Schulte-Spechtel U, Fingerle V. An *ospA*-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and *OspA* types. *Med Microbiol Immunol.* 2004; 193(4):219-226.

Misonne MC, Hoet PP. Species-specific plasmid sequences for PCR identification of the three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involved in Lyme disease. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(1):269-272.

Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of co-infection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti* and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:724-727.

Mittermayer T, Brezina R, Urvolgyi J. First report of an infection with *Rickettsia slovaca*. *Folia Parasitol.* 1980; 27(4):373-376.

Morel PC. Chapitre 3 : Maladies du bétail transmises par les tiques. in Chartier C, Itard J, Troncy PM, Morel PC. Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Editions Médicales Internationales (coll. Universités Francophones), Paris, France. 2000; 451-768.

Morozova OV, Cabello FC, Dobrotvorsky AK. Semi-nested PCR detection of *Bartonella henselae* in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2004; 4(4):306-309.

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 1995; 1(1):7-15.

Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol.* 1998; 79(4):325-339.

Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(3):695-700.

Muyzer G. DGGE/TGGE : a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 3:317-322.

Needham GR, Teel PD. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annu Rev Entomol.* 1991; 36:659-681.

Niebylski ML, Peacock MG, Fischer ER, Porcella SF, Schwan TG. Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(10):3933-3940.

Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:773-778

Nielsen H, Fournier PE, Pedersen IS, Krarup H, Ejlertsen T, Raoult D. Serological and molecular evidence of *Rickettsia helvetica* in Denmark. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36(8):559-563.

Nikolausz M, Sipos R, Revesz S, Szekely A, Marialigeti K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 244(2):385-390.

Nilsson K, Lindquist O, Liu AJ, Jaenson TG, Friman G, Pahlson C. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(2):400-403. a

Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet.* 1999; 354(9185):1169-1173. b

Noda H, Munderloh UG, Kurtti TJ. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(10):3926-3932.

Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1797-1803.

Nutall P, Trimnel A, Kazimirova M, Labuda M. Towards a broad spectrum anti-tick vaccine. In proceedings of the Fifth International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens, Neuchâtel, Suisse 29 08- 02 09 2005: p 83.

Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol.* 1998; 12(4):423-429.

Pappalardo BL, Correa MT, York CC, Peat CY, Breitschwerdt EB. Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. *Am J Vet Res.* 1997; 58(5):467-471.

Parola P, Beati L, Cambon M, Brouqui P, Raoult D. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *J Med Entomol.* 1998; 35:180-183. a

Parola P, Beati L, Cambon M, Raoult D. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17:95-100. b

Parola P, Vestris G, Martinez D, Brochier B, Roux V, Raoult D. Tick-borne rickettsiosis in Guadeloupe, The French West Indies: isolation of *Rickettsia africae* from *Amblyomma variegatum* ticks and serosurvey in humans, cattle, and goats. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60:883-887.

Parola P, Roux v, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. Detection of *Ehrlichiae* in African ticks by PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94:707-708.

Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:897-928.

Parola P. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27(5):297-304.

Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003; 361(9366):1319-1325.

Perez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:2133-2139.

Pichon B, Godfroid E, Hoyois B, Bollen A, Rodhain F, Perez-Eid C. Simultaneous infection of *Ixodes ricinus* nymphs by two *Borrelia burgdorferi* sensu lato species: possible implications for clinical manifestations. *Emerg Infect Dis.* 1995; 1(3):89-90.

Piesman J, Maupin GO, Campos EG, Happ CM. Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J Infect Dis.* 1991; 163:895-897.

Piesman J, Zeidner NS, Schneider BS. Dynamic changes in *Borrelia burgdorferi* populations in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) during transmission: studies at the mRNA level. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003; 3(3):125-132.

Pusterla N, Huder JB, Feige K, Lutz H. Identification of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other *Rickettsiae* of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup. J Clin Microbiol. 1998; 36(7):2035-2037.

Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. Appl Environ Microbiol. 2001;67(2):880-7.

Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Parasitol Today. 1996; 12(12):472-479.

Raoult D, Lakos A, Fenollar F, Beytout J, Brouqui P, Fournier PE. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. Clin Infect Dis. 2002; 34(10):1331-1336.

Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997; 10:694-719.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol. 1991; 173(5): 1576-1589.

Rehacek J, Urvolgyi J, Kocianova E, Sekeyova Z, Vavrekova M, Kovacova E. Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. Eur J Epidemiol. 1991; 7(3):299-303.

Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka FR. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. Appl Environ Microbiol. 2004;70(11):6414-6419.

Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. 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(12):3091-3095.

Rolain JM, Locatelli C, Chabanne L, Davoust B, Raoult D. Prevalence of *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11(2):423-425.

Sangioni LA, Horta MC, Vianna MC, Gennari SM, Soares RM, Galvao MA, Schumaker TT, Ferreira F, Vidotto O, Labruna MB. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(2):265-270.

Sanogo YO, Davoust B, Inokuma H, Camicas JL, Parola P, Brouqui P. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 2003; 70(3):205-212. a

Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(3):329-332. b

Sarih M, M'Ghirbi Y, Bouattour A, Gern L, Baranton G, Postic D. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(3):1127-1132.

Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W, Rolleke S. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J Microbiol Methods.* 2003; 52(2):251-260.

Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(7):2215-2222.

Schwan TG, Piesman J. Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(2):115-21.

Schwartz I, Fish D, Daniels TJ. Prevalence of the rickettsial agent of human granulocytic ehrlichiosis in ticks from a hyperendemic focus of Lyme disease. *N Engl J Med.* 1997; 337:49-50. a

Schwartz I, Varde S, Nadelman RB, Wormser GP, Fish D. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 56(3):339-342. b

Sekeyova Z, Fournier PE, Rehacek J, Raoult D. Characterization of a new spotted fever group *Rickettsia* detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. *J Med Entomol.* 2000; 37(5):707-713.

Shaw SE, Birtles RJ, Day MJ. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *J Feline Med Surg.* 2001; 3(4):193-209. a

Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* 2001; 17(2):74-80. b

Shimada MK, Yamamura MH, Kawasaki PM, Tamekuni K, Igarashi M, Vidotto O, Vidotto MC. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1026:95-102.

Shukla SK, Vandermause MF, Belongia EA, Reed KD, Paskewitz SM, Kazmierczak J. Importance of primer specificity for PCR detection of *Anaplasma phagocytophila* among *Ixodes scapularis* ticks from Wisconsin. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8):4006.

Simpson RM, Gaunt SD, Hair JA, Kocan KM, Henk WG, Casey HW. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res.* 1991; 52(9):1537-1541.

Simser JA, Palmer AT, Munderloh UG, Kurtti TJ. Isolation of a spotted fever group *Rickettsia*, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(2):546-552.

Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A. Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2002; 9:25-28.

Smith M, Gray J, Granström M et coll. EUCALB 1997-2004. European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis. <http://vie.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/> [en ligne] (mise à jour mai 2003).

Sparagano OA, Allsopp MT, Mank RA, Rijpkema SG, Figueroa JV, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. *Exp Appl Acarol.* 1999; 23(12):929-960.

Spyridaki I, Psaroulaki A, Loukaides F, Antoniou M, Hadjichristodolou C, Tselentis Y. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 ;66(1):86-90.

Stanczak J, Gabre RM, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and

Babesia microti in urban and suburban forests. Ann Agric Environ Med. 2004 ;11(1):109-114.

Stanek G, Steere F. Lyme borreliosis. Lancet. 2003; 362 (9396):1639-1647.

Stich RW, Bantle JA, Kocan KM, Fekete A. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: *Ixodidae*) with the polymerase chain reaction. J Med Entomol. 1993; 30(4):781-788.

Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. Am J Vet Res. 1989; 50(8):1377-1380.

Stiller D, Coan ME. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. Vet Parasitol. 1995; 57(1-3):97-108.

Stuen S, Bergstrom K, Palmer E. Reduced weight gain due to subclinical *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) infection. Exp Appl Acarol. 2002; 28(1-4):209-215.

Suksawat J, Xuejie Y, Hancock SI, Hegarty BC, Nilkumhang P, Breitschwerdt EB. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. J Vet Intern Med. 2001; 15(5):453-462.

Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Moran GJ, Goldstein EJ. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. Emergency Medicine Animal Bite Infection Study Group. N Engl J Med. 1999; 340(2):85-92.

Tan CK, Owens L. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a *Rickettsia, Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. J Clin Microbiol. 2004; 42(11):5320-5332.

Tuttle AD, Birkenheuer AJ, Juopperi T, Levy MG, Breitschwerdt EB. Concurrent bartonellosis and babesiosis in a dog with persistent thrombocytopenia. J Am Vet Med Assoc. 2003; 223(9):1306-1310.

Vassallo M, Pichon B, Cabaret J, Figureau C, Pérez-Eid C. Methodology for sampling questing nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*), the principal vector of Lyme disease. Europe Entomol Soc Am. 2000; 37 (3):335-339.

Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, Mandelco L, Sechrest JE, Weiss E, Woese CR. Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. J Bacteriol. 1989; 171(8):4202-4206.

Welburn SC, Maudlin I. Tsetse-trypanosome Interactions : Rites of Passage. Parasitology Today. 1999; 15(10):399-403.

Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, Persing DH, Robison DA, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. J Clin Microbiol. 1999; 37(8):2598-2601.

Weller SJ, Baldrige GD, Munderloh UG, Noda H, Simser J, Kurtti TJ. Phylogenetic placement of *Rickettsiae* from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. J Clin Microbiol. 1998; 36(5):1305-1317.

Wernegreen JJ. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. Nat Rev Genet. 2002; 3(11):850-861.

Willadsen P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. Vet Parasitol. 2001; 101(3-4):353-368.

Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1942-1946.

Yoshino K, Nishigaki K, Husimi Y. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. Nucleic Acids Res. 1991; 19: 3153.

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des tiques *Ixodes* sp., *Rhipicephalus* sp. et *Dermacentor* sp. femelle et mâle en vue dorsale (Estrada-pena et al., 2004).

14

Figure 2 : Représentation schématique des rostris et capitulum des principaux genres d'Ixodidés (George, 2005).

15

Figure 3 : Distribution géographique des principales espèces de tiques présentes en France (Estrada pena et al., 2004).

17

Figure 4 : Les différents stades évolutifs chez *I. ricinus* (crédit photo : Dr. Gabuzzi : http://mypage.bluewin.ch/dr_gabuzzi/clyme.htm).

18

Figure 5 : cycle évolutif et hôtes préférentiels des différentes stases d'*I. ricinus*.

20

Figure 6 : Femelle *I. ricinus* pratiquant l'affût sur la végétation (crédit photo: unité d'épidémiologie animale INRA clermont-Theix).

21

Figure 7 : Hypostome d'Ixodidé ancré dans la peau de son hôte. (crédit photo: Pr A Aeschlimann institut de zoologie, Neuchâtel).

22

Figure 8 *B. burgdorferi* sl. en microscopie électronique à balayage (crédit photo: Pr Baranton Institut Pasteur Paris).

32

Figure 9 : Cycle de transmission de *B. burgdorferi*.

33

Figure 10 : *Rickettsia* sp. infectant une cellule de l'hémolymphe de tique (crédit photo: www.vet.uga.edu).

37

Figure 11 : Morula d'*Ehrlichia canis* dans un granulocyte de chien (crédit photo: www.cvm.okstate.edu).

42

Figure 12 : *A. marginale* dans des érythrocytes de bovin (crédit photo : www.cvm.okstate.edu).

46

Figure 13 : *A. platys* dans des plaquettes de chien. (crédit photo : www.goldenvetlab.co.za).

46

Figure 14 : *A. phagocytophilum* dans un granulocyte humain (crédit photo : www.infektionsbiologie.ch).

46

Figure 15 : Cellule de singe infectée par *C. burnetii* en microscopie électronique (Crédit photo : R Heinzen, NIAID)

52

Figure 16 : Représentation schématique du cycle de transmission de *C. burnetii*

52

Figure 17 : *F. tularensis* en microscopie électronique à balayage (crédit photo : rainews24)

54

Figure 18 : *B. chomelii* en microscopie électronique (crédit photo: UMR BIPAR).

56

Figure 19 : Collecte de tiques par la technique du drapeau le long d'une «tranche» de végétation dans les Combrailles.

91

Figure 20 : Taux de portage observés pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* chez les adultes et les nymphes.

96

Figure 21 : Taux de portage observés pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* chez les femelles et les males.

97

Figure 22 : Taux de portage observés pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures.

98

Figure 23 : Taux de portage observés pour *A. phagocytophilum* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures en fonction du stade et du sexe.

98

Figure 24 : Taux de portage observés pour *B. burgdorferi* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures en fonction du stade et du sexe.

99

Figure 25 : Répartition du portage observé pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* en fonction du sexe et du type d'échantillon (adultes individuels; pools

de nymphes) par rapport au total des échantillons infectés pour chaque catégorie.

100

Figure 26 : Histogramme sectoriel de comparaison des résultats obtenus en PCR spécifique et en PCR-universelle-TTGE pour la détection de *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A. phagocytophilum* dans une cohorte de 93 échantillons d'extraits d'ADN d'*I. ricinus*.

131

Figure 27 : Analyse sur gel de polyacrylamide à 10% des migrations TTGE de fragments d'ADNr 16S amplifiés à partir des échantillons de tiques : 9p; 12p; 3c; 6A; N4; P46Y2; P02Y2.

139

Figure 28 : Arbre de distance obtenu à partir des séquences des fragments de la région V3 de l'ADNr 16S isolés sur gel après migration TTGE et des séquences de plusieurs bactéries (GenBank) à l'aide de l'analyse de «neighbor-joining» intégrée dans PAUP 4.0.

145

Tableau 1 : Classification des tiques (d'après Hoogstral 1982).

13

Tableau 2 : Principaux symbiotes identifiés par biologie moléculaire ou isolés de tiques dures.

31

Tableau 3 : Position phylogénétique des principales bactéries associées aux tiques

31

Tableau 4 : Répartition, vecteurs hôtes mammifères et pathogénie des différentes espèces de *Borrelia* sp (d'après Euzéby 2005 ; Parola et Raoult, 2001).

36

Tableau 5 : Répartition, vecteurs, et pouvoir pathogène des différentes espèces de SFG *Rickettsia* (d'après Euzéby 2005, et Parola et Raoult, 2001).

41

Tableau 6 : Répartition, vecteurs hôtes mammifères et pathogénie des différentes espèces de *Ehrlichia* sp. (d'après Euzéby 2005 et Parola et Raoult, 2001).

45

Tableaux 7a et 7b : Répartition, vecteurs hôtes mammifères et pathogénie des différentes espèces de *Anaplasma* sp. (d'après Euzéby 2005 et Parola et Raoult, 2001). 50-

51

Tableau 8 : Distribution, hôtes réservoirs et hôtes accidentels des différentes espèces de *Bartonella*.

59

Tableaux 9a et 9b : principaux couples d'amorces utilisés pour la détection d'ADN de bactéries pathogènes dans les tiques.

69-70

Tableau 10 : Taux de portage observés et écart-type pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* chez les adultes et les nymphes.

96

Tableau 11 : Taux de portage observés et écart-type pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* chez les femelles et les males.

97

Tableau 12 : Taux de portage observés et écart-type pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures.

98

Tableau 13 : Taux de portage observés et écart-type pour *A. phagocytophilum* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures en fonction du stade et du sexe.

98

Tableau 14 : Taux de portage observés et écart-type pour *B. burgdorferi* entre les échantillons prélevés dans les bois et ceux prélevés dans les pâtures en fonction du stade et du sexe.

99

Tableau 15 : Répartition du portage observé et écart-type pour *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp. et *A.phagocytophilum* en fonction du sexe et du type d'échantillon par rapport au total des échantillons infectés pour chaque catégorie.

100

Tableau 16 : Bilan des tests de spécificité et de sensibilité de la PCR universelle-TTGE pour la détection de *B. burgdorferi*, *Rickettsia* sp., et *A. phagocytophilum* dans des échantillons d'ADN extraits de tiques *Ixodes ricinus*.

130

Tableau 17 : Origine et nature des échantillons de tiques utilisés pour la mise au point de l'étude.

134

Tableau 18 : Présentation des bandes isolées dans chaque échantillon de tique : valeur du Rf, taxons apparentés aux séquences et numéro d'accession sous GenBank de chaque séquence déposée.

141

Tableau 19 : Taxons bactériens dont la séquence du fragment de la région V3 de l'ADNr 16S est la plus proche phylogénétiquement des séquences retrouvées dans les tiques, numéro d'accession sous GenBank et nombre d'échantillons présentant cette séquence.

143

Tableau 20 : Comparaison des populations bactériennes identifiées dans les tiques *Ixodes* sp. de deux études de la littérature et de la présente étude.

147

Annexes

- **Annexe 1 : Couples d'amorces utilisés au cours de cette étude**

- **Annexe 2 : Article 5 : *Hippoboscidae* flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants.**

Halos L, Jamal T, Maillard R, Girard B, Guillot J, Chomel B, Vayssier-Taussat M, Boulouis HJ. Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. Infecting wild and domestic ruminants. Appl Environ Microbiol. 2004;70 (10): 6302-5.

- **Annexe 3 : Article Point Vétérinaire : La borreliose de Lyme chez le chien et le chat.**

Halos L. Etat des lieux de la borreliose de Lyme chez les carnivores domestiques Point Vétérinaire 2005;253:48-53.

- **Annexe 4 : Article Point Vétérinaire : Les ehrlichioses félines : des bactérioses émergentes.**

Halos L. Les ehrlichioses félines : des bactérioses émergentes ? Point Vét. 2004;248:48-50.

Annexe 5 : Application de la PCR universelle-SSCP à la détection de bactéries pathogènes dans les tiques

PCR universelle

Les amorces utilisées pour la PCR universelle SSCP (voir tableau 20, annexe 1) bordent la même région V3 du gène de l'ARN ribosomal 16S et permettent donc l'amplification du même fragment d'environ 180 paires de bases que celles utilisées en PCR universelle TTGE. L'une des deux amorces porte un fluorochrome (FAM6).

Electrophorèse SSCP

Les produits PCR sont dilués 10 à 250 fois en fonction de l'intensité observée sur gel d'agarose. Un aliquot de 1- μ l produit de dilution est ensuite mélangé à 18.5 μ l de formamide désionisée (Applied Biosystems) et 0,2 μ l d'un marqueur standard interne, le « DNA molecular weight standard Genescan-400HD ROX » (Applied Biosystems). Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes puis immédiatement refroidis dans un mélange eau-glace pendant 10 minutes. C'est à ce moment que les fragments d'ADN simple brin adoptent une structure secondaire qui ne dépend que de leur séquence. L'électrophorèse capillaire SSCP est conduite sur un séquenceur "ABI Prism 310 genetic analyzer" (Applied Biosystems). La matrice de polymère non dénaturant utilisée est composée de 5.6% de polymère GeneScan (Applied Biosystems), 10% de glycerol et du TBE 1x. Le tampon est constitué de TBE 1X et de 10% de glycerol. La migration des fragments d'ADN qui dépend de leur conformation qui elle dépend de leur séquence est réalisée dans un capillaire de 47-cm. Les conditions d'électrophorèse sont les suivantes : un temps d'injection de 5 s à un voltage de 15 kV ; un voltage d'électrophorèse de 12 kV, un temps d'aspiration de la seringue de 300 s, une température constante de 32°C, et un temps de collection de 30 min. Un laser détecte l'ADN marqué avec le FAM6 et le signal est automatiquement analysé par le logiciel GeneScan Analysis (Applied Biosystems) qui permet de visualiser un profil composé de pics. Chaque pic correspond théoriquement à un fragment et donc à une séquence.

ADN testés

ADN bactériens

Les ADN de *B. burgdorferi* sl (*B. garini*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss) ; d'*A. phagocytophilum*, de *R. conorii* et *R. helvetica*, de *C. burnetii*, de *B. bovis*, *B. henselae* et *B. capreoli* ont été testés en PCR universelle-SSCP.

ADN de tique

Quarante échantillons d'ADN de tiques issus de l'étude menée en Auvergne et sélectionnés au hasard parmi les 93 ayant été testés à la fois en PCR spécifique et en TTGE ont été utilisés.

Produit d'amplification PCR

Le produit d'amplification PCR issus de la bande TTGE correspondant à la bactérie Rickettsiales symbionte d'*Ixodes ricinus* IRRB9F1 (accession number DQ065804) a été utilisé comme ADN matrice.

Mise au point d'un « marqueur pathogène »

Comme pour l'analyse en PCR universelle-TTGE, nous avons tout d'abord analysé le profil de migration de plusieurs bactéries pathogènes afin de mettre au point un marqueur de référence SSCP.

Les profils de migration en électrophorèse SSCP obtenus pour les fragments d'ADN de *B. garinii* (Borrel garinii), *B. afzelii* (Borrel afzelii), *B. burgdorferi* ss (Borrel bss); *A. phagocytophilum* (A phago), *R. conorii* (Rick conorii), *C. burnetii* souche C2 (Cox burnetii C2) et B5 (Cox burnetii B5), *B. schoenbuschensis* (Barto schoen), *B. henselae* (Barto henselae) et *B. capreoli* (Barto capreoli) ainsi que celui obtenu pour le symbionte IRRB9F1 (D2) sont représentés figure A5a. Le marqueur SSCP théorique, formé par la migration de symbionte IRRB9F1, *B. schoenbuschensis*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii*, *B. garinii*, et *C. burnetii* souche C2 est représenté figure A5b.

La répartition des profils sur la fenêtre de lecture met en évidence trois zones :

- Le fragment correspondant au symbionte IRRB9F1 offre un profil très en avant sur le gel (scan 6500).

- Les pics correspondant à l'ADN de *Bartonella* spp., *A. phagocytophilum* et *R. conorii* sont regroupés au centre de la fenêtre (scan 6600 à 6700)
- Les pics correspondant à *B. burgdorferi* et *C. burnetii* apparaissent en fin de gel (scan 6850 à 6950). C

Cette répartition est différente de celle obtenue en électrophorèse en TTGE. Elle est associée à différentes tailles du fragment d'ARNr 16S chez les bactéries (Godon, communication orale).

Les profils de migrations de la plupart des bactéries se présentent sous la forme d'un double pic.

Les pics obtenus pour plusieurs des espèces bactériennes ciblées se superposent : Le premier pic du profil d'*A. phagocytophilum* se superpose au second pic du profil de *B. schoenbuschensis* et le second pic du profil d'*A. phagocytophilum* se superpose au pic de *R. conorii*.

La superposition des profils des principales bactéries pathogènes portées par les tiques rend toute lecture prédictive impossible.

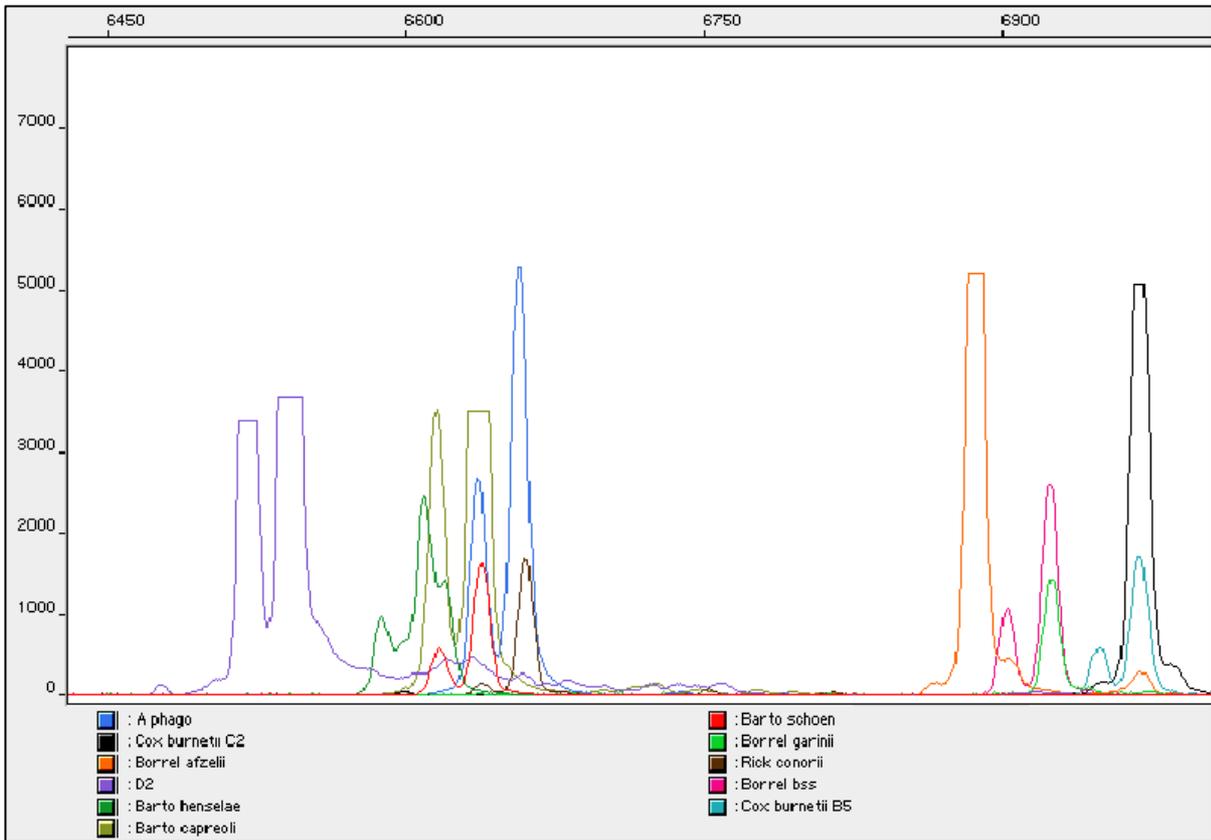
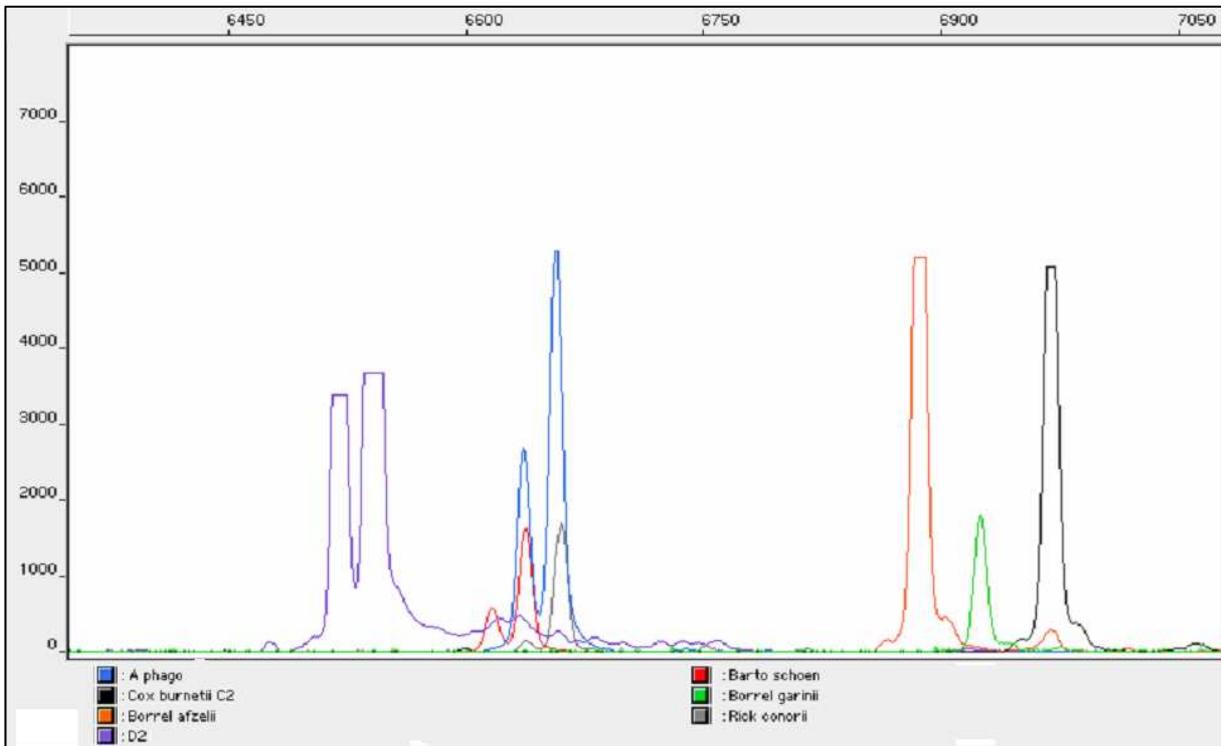


Figure A5 a: Profil de migration en électrophorèse SSCP de fragments d'ADN amplifiés à partir de de *Borrelia garinii* (Borrel garinii), *Borrelia afzelii* (Borrel afzelii), *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Borrel bss); *Anaplasma phagocytophilum* (A phago), *Rickettsia conorii* (Rick conorii), *Coxiella burnetii* souche C2 (Cox burnetii C2) et B5 (Cox burnetii B5), *Bartonella schoenbuschensis* (Barto schoen), *Bartonella henselae* (Barto henselae) et *Bartonella capreoli* (Barto capreoli) ainsi que celui obtenu pour le symbionte IRRB9F1 (D2)



**Figure A5b : Marqueur SSCP théorique : de gauche à droite : D2, Barto schoen, A phago, Rick conorii, Borrel afzelii, Borrel garinii, Cox burnetii C2
Profils de migration en SSCP d'échantillons de tiques**

Nous avons étudié les profils de migration en électrophorèse SSCP de quelques échantillons de tiques déjà étudiés en TTGE et en PCR spécifique.

Le nombre de pics observés sur les profils de migration SSCP correspond au nombre de bandes observées sur les profils TTGE en tenant compte des variations liées à l'existence de double pics potentiels sur les profils de certains taxons.

Un grand nombre de pics sont regroupés dans la même zone que les pics de *Bartonella* sp., *A. phagocytophilum* et *Rickettsia* sp.

On observe un regroupement de pics dans une zone dans laquelle aucun des fragments issus des bactéries du marqueur ne migrent (autour du scan 6750). Ces pics pourraient correspondre aux profils de bactéries Gram+, comme *Spiroplasma* sp. ou *Mycobacterium* sp.

La figure A5c montre les deux profils de migration en TTGE et SSCP obtenus pour le même échantillon (B15Y1), ainsi que les marqueurs, « marqueur théorique SSCP » (profil noir) et « marqueur pathogène TTGE » (Mttge).

EN TTGE, la présence d'ADN de *B. burgdorferi* sl, de *Spiroplasma* sp., de *Rickettsia* sp., d'une *Wolbachiae* et de la bactérie Rickettsiales symbionte d'*I. ricinus* ainsi que d'un fragment d'ADN 18S d'*Ixodes* sp. a été démontrée. La PCR spécifique a confirmé la présence de *B. burgdorferi* et *Rickettsia* sp.

Le nombre de pics correspond au nombre de bandes observées en TTGE mais il n'y a pas de pic correspondant à celui de *B. burgdorferi*. En revanche, on observe le pic correspondant au symbionte IRRB9F1.

La plus grande partie des bandes est regroupée dans la zone située entre 6550 et 6750.

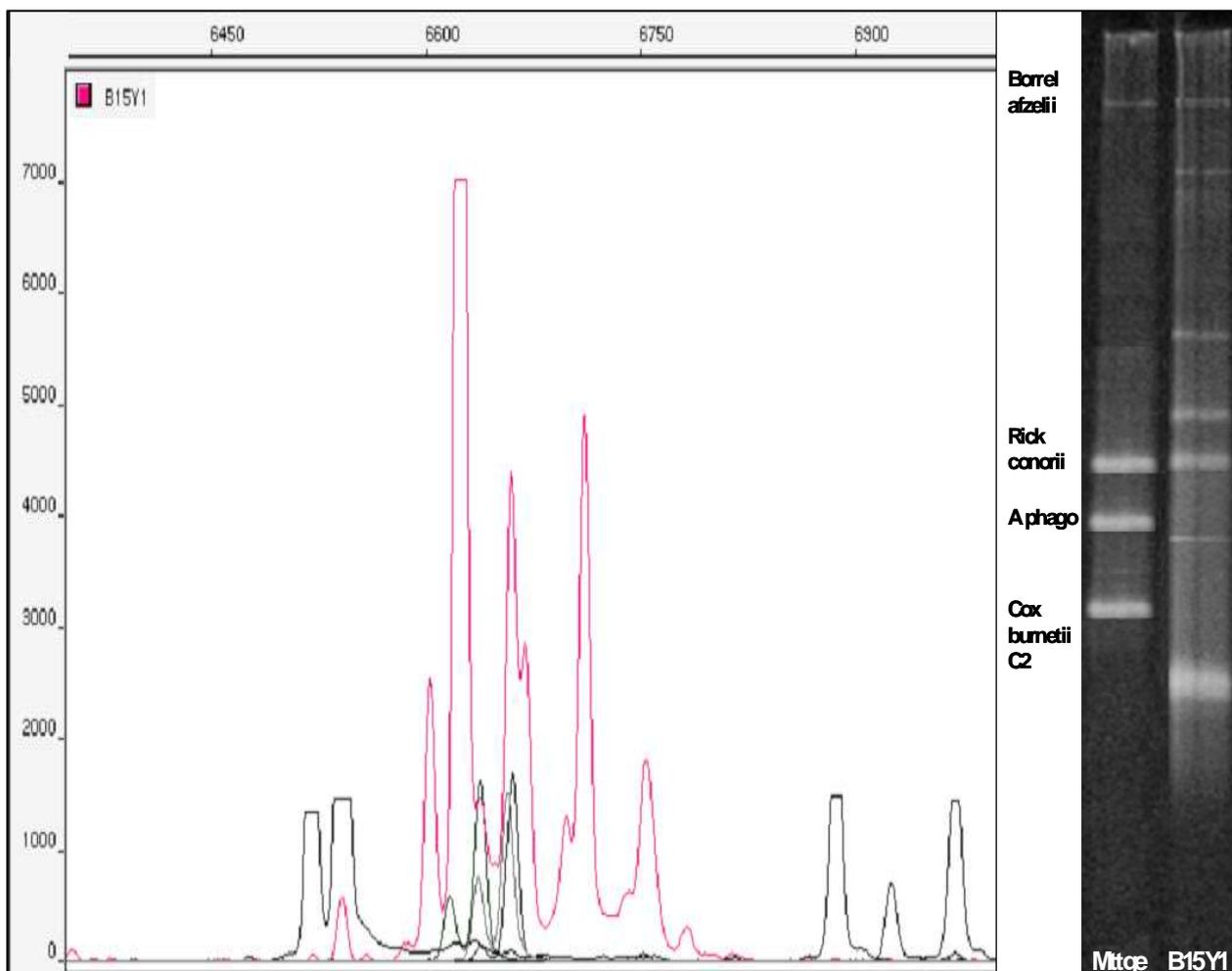


Figure A5c : Profils de migration en PCR universelle-SSCP (en rouge) à gauche et PCR universelle TTGE (ligne B15Y1) à droite obtenus pour le même échantillon extrait d'ADN d'*I. ricinus* (B15Y1). Sur le profil SSCP le profil en noir représente le marqueur théorique (voir fig. A5b). Mttge représente le marqueur pathogène défini en TTGE.

Perspectives

La PCR universelle SSCP offre l'avantage d'être automatisée mais son application à la détection de bactéries pathogènes dans les tiques n'est pas envisageable sans modification en profondeur. L'une des pistes potentielles pour pouvoir résoudre le problème de la superposition des pics serait de s'intéresser à une autre région variable du gène de l'ARNr 16S, la région V2 ou la région V6, qui peuvent présenter une variabilité de séquence plus intéressante pour notre étude. Afin d'améliorer la précision de lecture, il est envisageable de pratiquer une PCR multiplexe sur deux régions variables du gène en parallèle.