

Evolution de *Borrelia burgdorferi* sensu lato,
agent de la borréliose de Lyme
dans la tique *Ixodes ricinus*
et étude de sa transmission à l'hôte.



THESE

Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences

MARA CRIPPA

2003

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Evolution de *Borrelia Burgdorferi* sensu lato,
agent de la borréliose de Lyme dans la tique
Ixodes ricinus et étude de sa transmission à l'hôte**

de Mme Mara Crippa

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Mmes L. Gern (directrice de thèse),
L. Beati (New Haven USA),
MM. P.-A. Diehl et
B. Baranton (Paris)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 15 avril 2003

Le doyen:

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'F' followed by a large, sweeping loop and ending in a horizontal stroke.

F. Zwahlen

1 INTRODUCTION

La maladie de Lyme est une zoonose causée par la bactérie *Borrelia burgdorferi* sensu lato et transmise à l'homme via la piqûre de plusieurs espèces de tiques du genre *Ixodes*. Le cycle de l'agent pathogène de cette maladie est maintenu dans la nature par une transmission entre tiques et hôtes vertébrés et vice versa. On appelle cette bactérie *B. burgdorferi* sensu lato (sl) parce que, comme on le verra ensuite, il s'agit d'un complexe de plusieurs génoespèces (cf. 1.2.2).

Dans les années 70, une épidémie d'arthrite s'est déclarée dans la petite ville de Lyme (Connecticut, USA). On a d'abord cru qu'il s'agissait de polyarthrite rhumatoïde juvénile mais en y regardant de plus près les épidémiologistes ont remarqué qu'il s'agissait d'une nouvelle maladie que l'on a d'abord nommée « arthrite de Lyme » [Steere et al 1977]. Par la suite, des chercheurs ont mis en évidence l'implication des tiques [Steere et al 1978]. Depuis lors, cette maladie pouvant comprendre divers signes cliniques a pris le nom de « maladie de Lyme » ou « borréliose de Lyme ».

Quelques années après que le rôle des tiques ait été suspecté, W. Burgdorfer découvre la bactérie responsable à l'intérieur de tiques *I. dammini* [Burgdorfer et al 1982]. Cette bactérie a ensuite été déterminée comme faisant partie du genre *Borrelia* [Schmid et al 1984] et a finalement été nommée *B. burgdorferi* en honneur de son découvreur [Johnson et al 1984]. La découverte de l'agent pathogène a permis de déterminer d'autres manifestations cliniques comme par exemple l'Erythema migrans, qui avaient préalablement été décrites en Europe [Steere 1989 ; Stanek et al 2002]. Maintenant on sait que la maladie de Lyme peut toucher plusieurs organes, et qu'elle peut comporter entre autres des manifestations dermatologiques, des manifestations cardiaques et neurologiques.

Selon Steere [1989] la maladie se déroule en trois étapes : 1) Infection localisée (erythema migrans), 2) Infection disséminée et 3) Infection chronique.

La borréliose de Lyme est répandue seulement dans l'hémisphère Nord : on la trouve en Amérique du Nord, en Eurasie et en Afrique du Nord. En Suisse, le principal vecteur est *Ixodes ricinus* et plusieurs hôtes réservoirs interviennent dans le cycle.

1.1 La tique : le vecteur

Chez les arthropodes, dans l'ordre des acariens, on trouve le sous-ordre des *metastigmata*, formé uniquement par des animaux parasites : les tiques (Tableau 1-1). Les tiques sont en effet des acariens hématophages, souvent vecteurs de plusieurs pathogènes. En Suisse, *I. ricinus* est le principal vecteur des agents de la maladie de Lyme, mais il a été montré qu'*I. hexagonus* peut aussi transmettre les borrélioses [Gern et al 1991].

PHYLUM		Arthropoda	
SOUS-PHYLUM		Cheliceriformes	
CLASSE		Chelicerata	
SOUS-CLASSE		Arachnida	
ORDRE		Acari	
SOUS-ORDRE		Metastigmata	
FAMILLE	Ixodidae	Argasidae	Nuttalliellidae
GENRE	<i>Ixodes</i>	<i>Otobius</i>	<i>Nuttalliella</i>
	<i>Haemaphysalis</i>	<i>Antricola</i>	
	<i>Aponomma</i>	<i>Argas</i>	
	<i>Bothriocroton</i>	<i>Ornithodorus</i>	
	<i>Amblyomma</i>		
	<i>Dermacentor</i>		
	<i>Rhipicentor</i>		
	<i>Cosmiomma</i>		
	<i>Hyalomma</i>		
	<i>Nosomma</i>		
	<i>Rhipicephalus</i>		
	<i>Anomalohimalaya</i>		
	<i>Boophilus</i>		
	<i>Margaropus</i>		

Tableau 1-1: Systématique des tiques adapté d'après Hoogstraal et Aeschlimann 1982, Keirans et al 1994 et Klompen et al 2002.

1.1.1 Cycle de vie

La tique *I. ricinus* passe au cours de sa vie par trois stades différents (tique triphasique): larve, nymphe et adulte (Figure 1-1).

Quand les oeufs éclosent la tique est au stade **larve** (0.5-1 mm), ensuite après un premier repas sur un hôte elle tombe au sol où elle commence la digestion et où elle va muer en nymphe. Au stade **nymphe** (1.5-2 mm) la tique cherche un nouvel hôte sur lequel elle prendra un nouveau repas sanguin. Une fois gorgée et détachée elle va muer en stade adulte. La **femelle** (3.5-4 mm) se gorge sur un nouvel hôte et ensuite se détache et tombe au sol où elle va mourir après avoir pondu des milliers d'œufs. Les **mâles** (2.5-3 mm) ne se nourrissent pas ou très peu et assurent la fécondation des femelles (Figure 1-1).

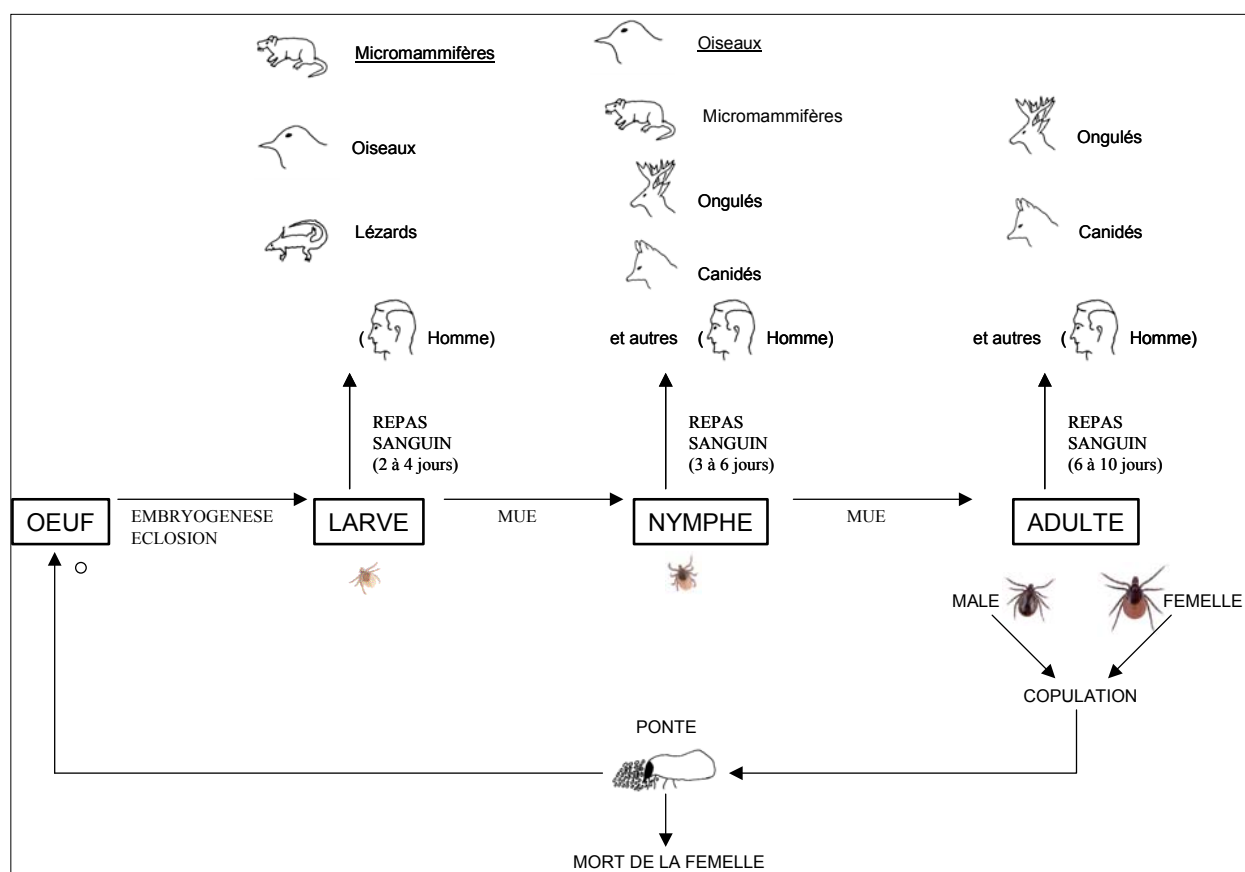


Figure 1-1 : Cycle d'*I. ricinus*. Institut de Zoologie, Olivier Rais

Il existe donc pour la tique *I. ricinus* une alternance de phases tout au long de sa vie. Il y a des phases libres durant lesquelles elle recherche son hôte, des phases parasites lorsqu'elle se nourrit sur un hôte et enfin à nouveau des phases libres de repos, diapause, morphogenèse et développement [Gigon 1985].

Les larves se nourrissent préférentiellement sur des animaux de petite taille comme des petits mammifères tels que les mulots ou aussi sur des oiseaux (Figure 1-1). Les nymphes aussi se nourrissent sur les micromammifères, mais en nombre inférieur à celui des larves, et aussi sur des mammifères de taille plus grande ainsi que sur les oiseaux. Les femelles se nourrissent principalement sur des animaux de grande taille et on ne les trouve pas sur les micromammifères et les oiseaux [Gern and Humair 2002]. Les tiques de tous les stades peuvent accidentellement se fixer sur l'homme s'il y a un contact.

1.1.2 Morphologie externe

La morphologie d'*I. ricinus* correspond à celle de la famille des *Ixodidae*, les tiques dures. Le corps est formé de deux parties : la première partie, le gnathosome ou capitulum est constitué d'une partie basale et des pièces buccales (le rostre) : l'hypostome avec des dents qui permettent à la tique de s'ancrer à l'hôte, une paire de chélicères qui permettent de percer la peau de l'hôte et aussi une paire de pédipalpes (Figure 1-2). La deuxième partie, l'idiosome, formé d'une zone où la cuticule est

chitinisée et dure (scutum dorsal) et d'une zone où le tégument est souple, peut se dilater et permettre l'étonnant changement de taille lors de la réplétion (Figure 1-3). Chez les mâles le scutum recouvre la quasi-totalité de la partie dorsale de la tique, alors que chez la femelle il est plus réduit. Les adultes et les nymphes possèdent 4 paires de pattes, les larves n'en possèdent que 3. La première paire de pattes porte l'organe de Haller qui est un organe sensoriel. L'anus est en position postéro-ventrale et l'orifice génital se trouve en position antéro-ventrale.

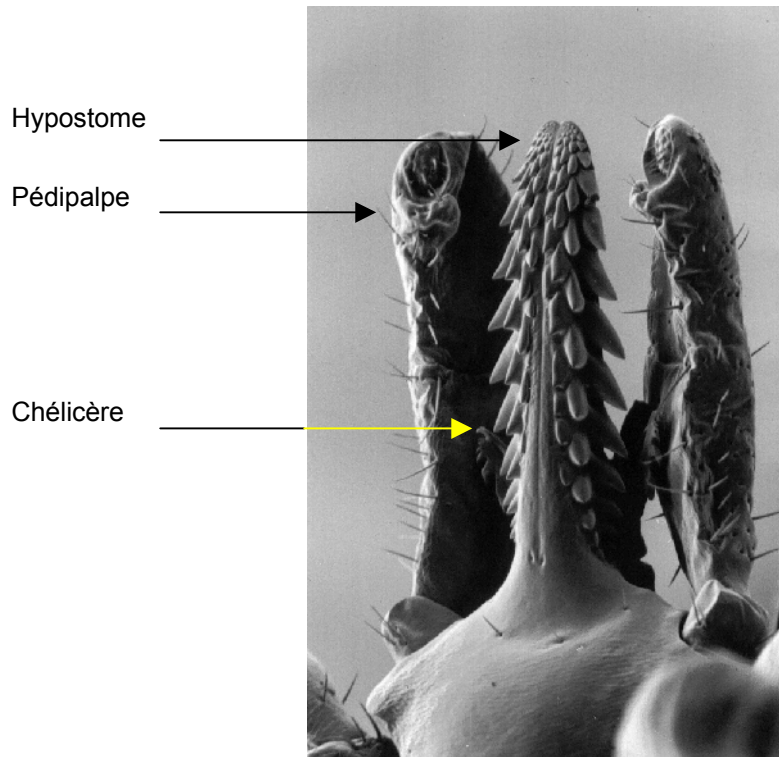


Figure 1-2 : Rostre de femelle d'*I. ricinus*. Institut de Zoologie, Michèle Vlimant



Figure 1-3 : *I. ricinus* femelle à jeun et femelle gorgée. Institut de Zoologie, Mara Crippa

1.1.3 Morphologie interne

Lorsqu'on dissèque une tique *I. ricinus* et qu'on enlève la partie dorsale de la cuticule, on peut observer les organes internes qui baignent dans l'hémolymphe (Figure 1-4).

Le **système digestif** occupe la plus grande partie de la tique ; il est divisé en trois parties : la partie antérieure (pharynx et œsophage), la partie médiane (ventricule central et plusieurs diverticules ou caeca) et la partie postérieure (ampoule rectale qui s'ouvre au niveau de l'anus).

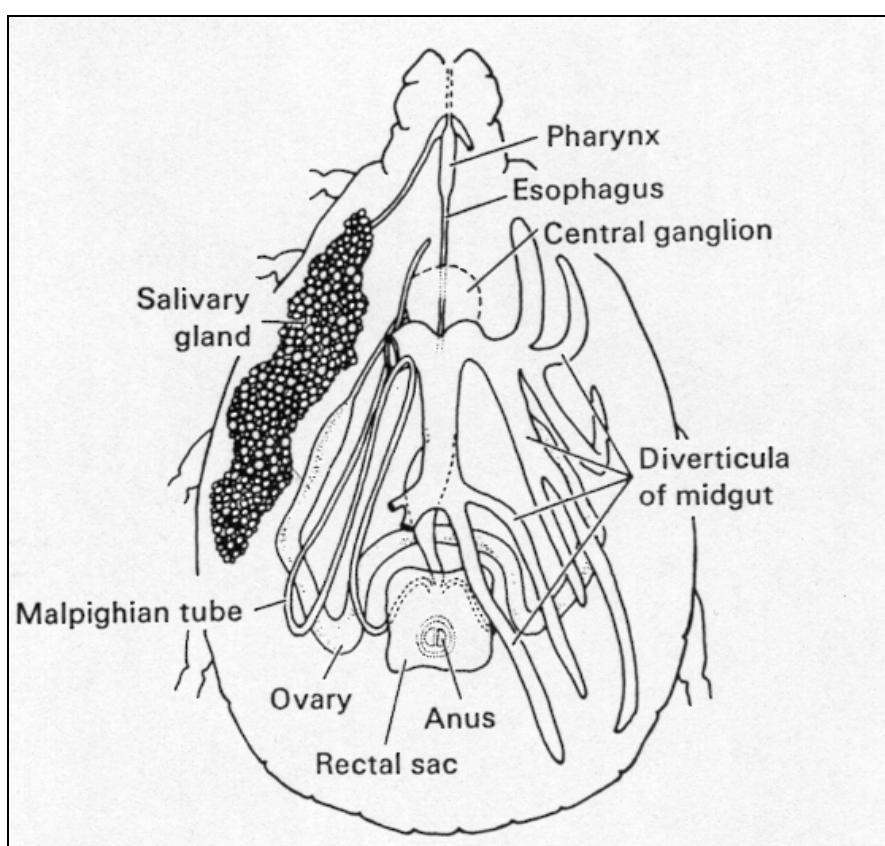


Figure 1-4 : Schéma des organes d'une tique. D'après Schmidt et Roberts 1985.

Au cours du repas sanguin l'intestin se dilate pour contenir la quantité de sang de l'hôte ingurgité. Pendant le repas le pH dans l'intestin diminue de 7.4 à 6.8 [Yang et al 2000], et la température augmente grâce à l'apport de sang. De plus une structure particulière se forme au niveau de l'intestin moyen, la membrane péritrophique. La membrane péritrophique est une structure acellulaire qui se trouve dans l'intestin d'un animal et qui sépare la nourriture ingérée de l'épithélium intestinal. Cette structure a été décrite chez plusieurs phyla animaux, y compris chez les arthropodes [Peters 1992]. Plusieurs fonctions ont été suggérées, parmi lesquelles la protection des cellules intestinales de l'abrasion mécanique, la protection contre la dissémination de l'infection de parasites et pathogènes, la possibilité d'influencer l'efficacité de la digestion par la séparation de l'intérieur de l'intestin en deux parties (ce qui influence le flux des fluides et la distribution des molécules) [Eisemann and Binnington 1994].

Chez les tiques, comme cité par Zhu et al (1991) et par Peters (1992), une membrane péritrophique fut observée pour la première fois par Samson en 1909 chez *I. ricinus*. Zhu et al [1991] ont confirmé la présence de cette structure, qui avait aussi été observée dans un travail de thèse [Girardin 1986], et l'ont décrite chez *I. ricinus*. La membrane péritrophique a également été observée chez d'autres espèces de tiques : chez *I. scapularis* [Rudzinska et al 1982], chez *I. persulcatus*, *I. hexagonus* et *I. uriae* [Gern et al 1995] et aussi chez *Haemaphysalis longicornis* [Matsuo et al 2003].

Chez *I. ricinus*, une couche non continue de membrane péritrophique peut se détecter dans l'intestin de femelles se nourrissant sur lapin dès 2-3h de repas sanguin (M. Vlimant, communication personnelle). Une membrane péritrophique continue est produite dès 18h de repas sanguin sur lapin, et elle est présente chez les trois stades d'*I. ricinus*. Chez la nymphe l'épaisseur de cette couche est en moyenne entre 0,03-0,79µm, épaisseur variant pendant et après le repas sanguin, et elle est encore observable 30 jours après la fin du repas sanguin [Zhu et al 1991].

Chez *I. scapularis* (vecteur à l'Est des Etats-Unis de *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) génoespèce faisant partie du groupe *B. burgdorferi* sl) cette structure a aussi été décrite chez les trois stades de développement, par contre elle semble se former plus tard, soit après 24 à 27 heures de nutrition [Rudzinska et al 1982 ; Zung et al 1989].

Si on continue cette dissection virtuelle et que l'on enlève l'intestin, les **glandes salivaires** sont accessibles. Il y a une paire de glandes salivaires en forme de grappe de raisin (Figure 1-5) en position latéro-antérieure.

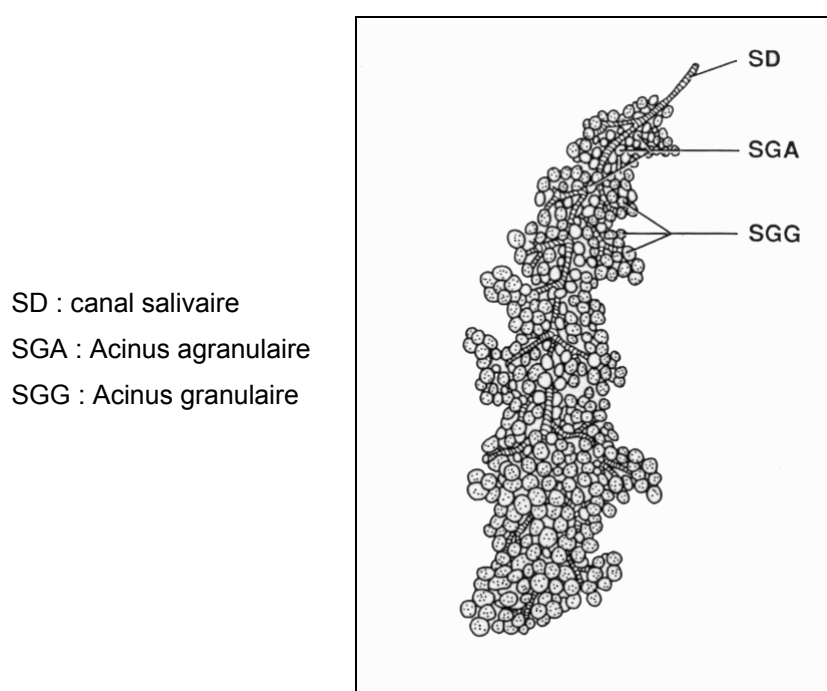


Figure 1-5 : Schéma d'une glande salivaire de tique d'après Sonenshine 1991.

Les glandes salivaires augmentent de taille pendant le repas de la tique et elles dégénèrent après la réplétion [Sonenshine 1991]. Plusieurs types d'acini composent une glande salivaire, les acini agranulaires (type I) et les acini granulaires (type II, III, IV). Les acini I auraient un rôle dans

l'osmorégulation, les acini II et III, sécrètent plusieurs substances nécessaires pour le repas telles que le « ciment » une substance qui permet à la tique de mieux se fixer dans la peau [Sonenshine 1991, Coons and Alberti, 1999]. Dans la salive des tiques des anticoagulants, des substances qui inhibent le système complément, d'autres protéines immunosuppressives, ainsi que des protéines assurant d'autres fonctions ont également été observées [Sonenshine 1991 ; Bergman et al 1998 ; Valenzuela 2000 ; Lebouille et al 2002 ; Valenzuela et al 2002]. Les acini II et III augmentent leur taille au cours du repas sanguin, et régressent quand le repas est fini ; les acini IV ont été observés seulement chez la tique mâle [Balashov 1983].

Le **synganglion** ou ganglion central du système nerveux est traversé par l'œsophage et se trouve en position antérieure. Le système excréteur est représenté par deux **tubes de Malpighi** qui se déversent dans l'ampoule rectale.

Le système respiratoire est formé d'un réseau de **trachées** qui s'ouvrent au niveau de la cuticule par des spiracles situés de part et d'autre du corps de la tique.

1.2 L'agent pathogène

Dans le règne des bactéries on retrouve le phylum des *Spirochetes*, composé de la seule classe des *Spirochaetes* et d'un seul ordre (*Spirochaetales*) partagé en trois familles (Tableau 1-2). Les spirochètes sont des bactéries mobiles, fines et longues et en forme d'hélice souple.

PHYLUM	<i>Spirochetes</i>		
CLASSE	<i>Spirochaetes</i>		
ORDRE	<i>Spirochaetales</i>		
FAMILLE	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Serpulinaceae</i>	<i>Leptospiraceae</i>
GENRE	<i>Borrelia</i>	<i>Brachyspira</i>	<i>Leptonema</i>
	<i>Brevinema</i>	<i>Serpulina</i>	<i>Leptospira</i>
	<i>Clevelandina</i>		
	<i>Cristispira</i>		
	<i>Diplocalyx</i>		
	<i>Hollandina</i>		
	<i>Pillotina</i>		
	<i>Spirochaeta</i>		
	<i>Treponema</i>		

Tableau 1-2 : Systématique du phylum *Spirochetes* d'après "Taxonomic outline of the procariotic genera", Bergey's manual of systematic bacteriology 2001

Le genre *Borrelia* est composé exclusivement de spirochètes infectieux transmis par des arthropodes hématophages, et plus précisément par les poux et par différentes espèces de tiques (Tableau 1-3).

<i>B. recurrentis</i>	<i>P. humanus humanus</i>	Homme	Mondiale	Fièvres récurrentes à poux
<i>B. duttonii</i>	<i>O. moubata</i>	Homme	Afrique centrale, de l'est et du sud	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. hispanica</i>	<i>O. erraticus</i>	Rongeurs	Espagne, Portugal, Maroc, Algérie, Tunisie	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. crocidurae</i> , <i>B. merionesi</i> , <i>B. microti</i> , <i>B. dipodilli</i>	<i>O. erraticus</i>	Rongeurs	Maroc, Lybie, Egypt, Iran, Turquie, Senegal, Kenya	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. persica</i>	<i>O. tholozani</i>	Rongeurs	Depuis la Chine de l'ouest et le Kashmir jusqu'à l'Iraq et l'Egypt, l'ex-USSR, Inde	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. caucasica</i>	<i>O. verrucosus</i>	Rongeurs	Depuis le Caucase jusqu'à l'Iraq	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. latyschewii</i>	<i>O. tartakowskyi</i>	Rongeurs	Iran, Asie centrale	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. hermsii</i>	<i>O. hermsi</i>	Rongeurs, Tamias, Ecureuils	Ouest des Etats-Unis	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. turicatae</i>	<i>O. turicata</i>	Rongeurs	sud-ouest des Etats-Unis	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. parkeri</i>	<i>O. parkeri</i>	Rongeurs	Ouest des Etats-Unis	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. manzottii</i>	<i>O. talaje</i>	Rongeurs	Sud des Etats-Unis, Mexique, Amérique centrale et du sud	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. venezuelensis</i>	<i>O. rudis</i>	Rongeurs	Amérique centrale et du sud	Fièvres récurrentes à tiques
<i>B. burgdorferi</i> sl	<i>I. scapularis</i>, <i>I. pacificus</i>, <i>I. ricinus</i>, <i>I. hexagonus</i>, <i>I. persulcatus</i>, <i>I. uriae</i>... et peut-être d'autres arthropodes haematophages.	Rongeurs, Oiseaux,...	Est des Etats-Unis, Ouest des Etats-Unis, Asie, Chine et Japon, Europe, Afrique du Nord	Borréliose de Lyme
<i>B. coriaceae</i>	<i>O. coriaceus</i>	Rongeurs, (Cerfs?)	Ouest des Etats-Unis	"Epizootic bovine abortion"
<i>B. theileri</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Boophilus</i> spp.	Bétail, Chevaux, Brébis (?)	Mondiale	Borréliose bovine
<i>B. anserina</i>	<i>Argas</i> spp.	Oiseaux	Mondiale	Borréliose aviaire

Tableau 1-3 : Caractéristiques et distribution des principales espèces de borrélioses transmises par des arthropodes. Adapté d'après Burgdorfer et Hayes 1989.

Parmi les différentes espèces de *Borrelia* on trouve le complexe *B. burgdorferi* sl qui regroupe plusieurs génoespèces responsables de la borréliose de Lyme transmis par des tiques du genre *Ixodes* [Burgdorfer et al 1982 ; Barbour et al 1983 ; Johnson et al 1984].

1.2.1 Morphologie et nutrition

La taille des *Borrelia* varie entre quelques μm à $30\mu\text{m}$ de longueur et entre 0.2 et $0.5 \mu\text{m}$ de diamètre [Barbour and Hayes 1986].

L'allure d'une *B. burgdorferi* sl est caractéristique de celle d'une *Borrelia* (Figure 1-6).

La morphologie cellulaire se résume en coupe transversale (Figure 1-7), depuis l'extérieur vers l'intérieur, d'une couche mucoïde dont l'origine est incertaine, une enveloppe ou membrane externe composée de 45-62% de protéines, 23-50% de lipides et 3-4% d'hydrates de carbone [Barbour and Hayes 1986 ; Coleman et al 1986]. Fait suite, jusqu'à la paroi cellulaire, un espace périplasmique à l'intérieur duquel on trouve les flagelles en nombre variable, chez *B. burgdorferi* il y en a entre 7 et 11, mais ce nombre varie même au sein d'une souche [Burgdorfer et al 1982 ; Hovind-Hougen 1984]. Les flagelles sont insérés aux deux pôles de la cellule dans les régions subterminales et sont disposés en hélice, leur fonction est d'assurer la mobilité du spirochète. La paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique forment le cylindre protoplasmique qui contient le cytoplasme de la cellule avec le génome.

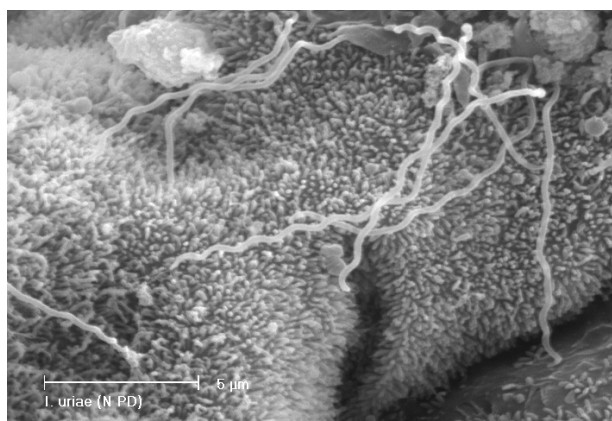


Figure 1-6 : *Borrelia* dans l'intestin d'une nymphe d'*I. uriae*. Institut de Zoologie, Michèle Vlimant

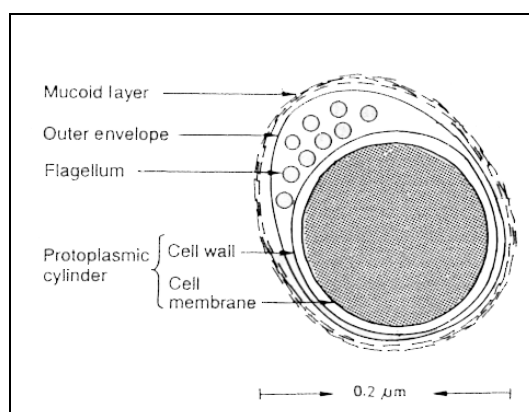


Figure 1-7 : Schéma de *B. burgdorferi* en section transversale. D'après Simon et al 1991

Comme source d'énergie et de carbone toutes les *Borrelia* utilisent des longues chaînes d'acides gras et des hydrates de carbone et comme déchet métabolique elles produisent de l'acide lactique [Johnson and Hughes 1992 ; Baranton and Old 1995]. Il s'agit de bactéries microaérophiles, elles peuvent être cultivées dans un milieu liquide standardisé et commercialisé par l'entreprise « Sigma Chemical » qui porte le nom de BSK-H [Pollack et al 1993]. Le spirochète *B. burgdorferi* sl se développe en culture à une température de 34-37°C et a un temps de régénération assez lent de 11-12h [Johnson et al 1984].

1.2.2 Génome et génoespèces

Récemment le génome de *B. burgdorferi* ss (souche B31) a été entièrement séquencé [Fraser et al 1997]. Le génome de *B. burgdorferi* sl est composé d'un chromosome linéaire d'environ un million de paires de bases, mais aussi de 12 plasmides linéaires et de 9 plasmides circulaires [Fraser et al 1997 ; Casjens et al 2000]. Sur ces plasmides on trouve par exemple les gènes qui codent pour des lipoprotéines [Brandt et al 1990] qui sont définies sous le nom de **Osp** de l'anglais « outer surface protein », à cause de leur exposition à la surface du spirochète (voir ci-dessous : 1.2.3). Un tableau récapitulatif des gènes responsables de l'expression de différentes protéines Osp (mais aussi de gènes responsables d'autres fonctions) de *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* et *B. garinii*, se trouve dans l'article écrit par Baranton et Old [1995]. D'autres informations sur la génétique de *B. burgdorferi* et sa biologie cellulaire se trouvent dans un récent article de review [Bergström et al 2002].

Le poids moléculaire de certaines de ces protéines de surface s'est révélé différent selon les isolats de *B. burgdorferi* sl dans différentes régions géographiques, et a permis de mettre en évidence des inégalités phénotypiques au sein de *B. burgdorferi* sl [Barbour et al 1984, 1985 ; Wilske et al 1985, 1986, 1993a, 1995].

Dès 1990 l'existence de deux groupes génomiques à l'intérieur de *B. burgdorferi* a été décrite [Postic et al. 1990]. Ensuite *B. garinii* a été distinguée de *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) [Baranton et al. 1992]. Puis en 1993 une nouvelle espèce, *B. japonica*, a été isolée au Japon d'*I. ovatus* [Kawabata et al. 1993 ; Postic et al. 1993]. *B. afzelii* a été identifiée pendant la même année [Canica et al. 1993]. Par la suite *B. andersonii* isolée d'*I. dentatus*, *B. tanukii* et *B. turdae* (maintenant appelée *B. turdi*) isolées d'autres Ixodides ont été décrites [Marconi et al. 1995; Fukunaga et al. 1996]. Encore plus récemment *B. lusitaniae* et *B. valaisiana* ont été identifiées [Le Flèche et al. 1997; Wang et al. 1997] et pour finir *B. bissettii* et *B. sinica* [Postic et al 1998 ; Masuzawa et al 2001]. Comme on l'a déjà mentionné, toutes ces génoespèces appartiennent au complexe *B. burgdorferi* sensu lato (sl).

B. japonica et *B. andersonii* ne semblent pas être pathogènes pour l'homme. En effet elles n'ont jamais été isolées chez les humains [Marconi et al. 1995]. Il en va de même pour *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, et *B. sinica*. Par contre *B. bissettii* a été détectée dans des patients avec des signes cliniques associés à la maladie de Lyme en Slovénie, indiquant que cette génoespèce pourrait être pathogène [Picken et al 1996 ; Strle et al 1997]. Cependant, cette génoespèce n'a jamais été détectée dans les tiques en Europe, mais l'a été dans les tiques en Amérique du Nord, où par contre elle n'a pas encore été détectée dans des patients [Schneider et al 2000 ; Burkot et al 2001].

Si l'on considère la distribution géographique des espèces pathogènes *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* et *B. garinii*, on observe qu'il existe des différences : *B. burgdorferi* ss apparaît tant aux Etats-Unis que sur le continent européen, par contre *B. garinii* et *B. afzelii* n'ont été trouvées qu'en Asie et en Europe. Il semble y avoir une corrélation entre signes cliniques et génoespèces [van Dam et al 1993]. Aux Etats-Unis, où l'on trouve *B. burgdorferi* ss, beaucoup d'arthrites ont été remarquées, tandis qu'en Europe et en Asie ce sont des complications neurologiques et des "acrodermatitis chronica atrophicans" (ACA) qui sont le plus fréquemment observées et qui sont liées, les premières plutôt à *B. garinii* et les deuxièmes, plus fréquentes en Europe du Nord, à *B. afzelii* [Canica et al 1993]. Quant à l'Erythema migrans on le trouve tant sur le continent nord américain qu'eurasien.

De nombreuses techniques ont été utilisées pour identifier les borrélioses, comme par exemple le Western blot, le séquençage du gène codant pour le rRNA 16S ou l'électrophorèse en champ pulsé comme mentionné par Wang et al [1999] et Farlow et al [2002]. Dans ce travail nous avons utilisé une technique décrite par Postic et al [1994] basée sur une des particularités du génome de *B. burgdorferi* sl, soit l'organisation des gènes ribosomiaux. En effet, chez la plupart des bactéries les gènes ribosomiaux sont disposés de la façon suivante : rrs (16S), rrl (23S) et rrf (5S), et il existe plusieurs copies de ces loci. Chez *B. burgdorferi* sl on trouve un seul gène 16S et deux copies de 23S et 5S qui se répètent l'une après l'autre. Le gène 16S est séparé du premier tandem 23S-5S, lequel est à son tour séparé du deuxième tandem 23S-5S par une région hautement variable au sein de l'espèce *B. burgdorferi* sl [Schwartz et al 1992 ; Postic et al 1994 ; Baranton and Old 1995]. La région hautement variable entre les deux tandems 23S-5S a été utilisée comme cible pour une PCR , le résultat de l'amplification est ensuite digéré et utilisé pour déterminer à quelle génoespèce de *B. burgdorferi* sl on se trouve confronté [Postic et al 1994].

1.2.3 OspA et OspC

Jusqu'à maintenant 6 Osp (OspA à OspF) ont été caractérisées [Barbour et al 1983, 1984 ; Wilske et al 1993b ; Norris et al 1992 ; Lam et al 1994]. Dans cette étude nous nous sommes intéressés exclusivement à deux d'entre elles : l'OspA et l'OspC. Ces deux protéines de surface ont montré une certaine hétérogénéité au sein de *B. burgdorferi* sl, en effet leur poids moléculaire peut varier selon les espèces de *B. burgdorferi* sl. Comme on l'a déjà brièvement écrit dans le chapitre précédent, ceci a permis de mettre en évidence les différences phénotypiques au sein de *B. burgdorferi* sl. De plus, ces protéines se sont montrées variables dans leur expression au cours du cycle de *B. burgdorferi* sl suivant que la bactérie se trouve dans l'hôte vertébré ou dans la tique vectrice (cf plus loin).

La protéine de surface OspA a été décrite par Barbour et al [1983]. Le poids moléculaire de cette protéine peut varier entre 31-34Kda dans les différents isolats de *B. burgdorferi* sl [Wilske et al 1993a ; Wang et al 1997]. L'utilisation de plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre l'OspA a permis de classer les différents isolats dans des sérotypes différents (n=8) selon leur réactivité avec ces anticorps. Il s'est avéré qu'il existe une bonne corrélation entre typage par sérotype OspA et génoespèce [Wilske et al 1993a]. Récemment Pal et al [2000] ont mis en évidence que cette protéine

de surface est une adhésine, c'est-à-dire qu'elle permet aux borrélioses qui l'expriment de se fixer à la membrane cellulaire des cellules intestinales de la tique.

La protéine de surface OspC, est une protéine stimulant une forte réponse immunologique précoce chez des patients avec une Borréliose de Lyme. Elle a été appelée au départ pC [Wilske et al 1986 ; Fuchs et al 1992] et plus tard elle a été définie comme étant une protéine de surface et a donc été renommée OspC [Wilske et al 1993b]. Cette protéine présente également un poids moléculaire variant selon les isolats et a aussi été utilisée pour un sérotypage, dans ce cas on compte jusqu'à 16 sérotypes OspC [Wilske et al 1995 ; 1996].

Le polymorphisme moléculaire du gène de cette protéine, a permis à des chercheurs [Seinost et al 1999 ; Baranton et al 2001] de classer les isolats de *B. burgdorferi* sl en différents groupes, suivant le degré de similitude des séquences. Ceci a permis de mettre en évidence une importante fonction de cette Osp. Ces chercheurs ont observé que parmi tous les groupes qui ont été isolés des tiques, la plupart ne se retrouvent pas chez l'homme. Parmi les isolats humains, certains proviennent uniquement de la peau de patients avec un erythema migrans et d'autres proviennent d'autres organes que la peau. Ceci laisse entendre qu'ils sont infectieux mais que leur pathogénicité est restreinte à la peau pour certains et que d'autres groupes sont capables d'envahir d'autres organes et montrent donc un pouvoir d'invasivité. Chez *B. burgdorferi* ss, seuls 4/17 groupes ont été retrouvés dans des formes invasives de la maladie [Seinost et al 1999]. Chez *B. afzelii* parmi les 14 groupes décrits, 9 ont été trouvés chez l'homme dont seulement 2 présentent une forme invasive, et chez *B. garinii* parmi les 22 groupes définis, 9 sont infectieux pour l'homme dont seulement 4 peuvent provoquer une forme invasive de maladie de Lyme [Baranton et al 2001].

1.3 Relation vecteur-hôte-agent pathogène

Nous avons présenté séparément la tique *I. ricinus* et la bactérie *B. burgdorferi* sl, il est important maintenant d'observer les dynamiques des relations entre ces « acteurs ».

On va donc reprendre le cycle de vie de la tique *I. ricinus*, et le mettre en relation avec l'infection par le spirochète *B. burgdorferi* sl (Figure 1-8). Partons d'une larve non infectée qui est prête à se nourrir sur un hôte (1). Si la larve prend son repas sanguin sur un hôte infecté (2), alors elle peut acquérir l'infection (3). Lorsqu'une tique s'infecte via le repas sanguin sur un hôte réservoir, elle garde l'infection quand elle se détache pour tomber au sol et passer du temps pour digérer et muer au stade suivant (4, 5). Ce phénomène s'appelle transmission transstadiale, et il a lieu soit lorsque la tique mue du stade larve au stade nymphe, soit pour une nymphe qui mue au stade adulte. La nymphe qui résulte de cette larve, sera donc déjà infectée en allant se fixer sur un autre hôte pour se nourrir à nouveau (6), et elle sera ainsi capable de transmettre des borrélioses à l'animal sur lequel elle se trouve (7). Toutes les larves ne se nourrissent pas sur des hôtes réservoirs infectés, ce qui fait que l'infection peut être acquise pour la première fois au stade nymphe et être gardée au stade adulte.

Les femelles prennent un repas sanguin important qui leur servira de ressource énergétique, d'acides aminés, de cholestérol,...pour la fabrication des œufs. Une femelle peut transmettre l'infection aux œufs qu'elle pond et ainsi aux larves qui vont naître. Ce phénomène s'appelle transmission

transovarienne et il a été décrit aux Etats-Unis (env. 2% larves de la nature infectées) et en Europe (env. 3% larves de la nature infectées) [Magnarelli et al 1987 ; Lane et Burgdorfer 1987 ; Burgdorfer et al 1983 ; Zhioua et al 1994, Bellet-Edimo 1997]. Ces valeurs ont été trouvées par analyse des tiques via l'immunofluorescence directe ce qui met en évidence tous les spirochètes. Récemment, un nouveau spirochète proche du groupe des spirochètes des fièvres récurrentes et pouvant être transmis par transmission transovarienne a été mis en évidence aux Etats-Unis [Scoles et al 2001]. Des nouvelles analyses avec de nouvelles méthodes sont donc nécessaires pour confirmer les valeurs de transmission transovarienne de *B. burgdorferi* sensu lato.

Le rôle des tiques mâles est principalement la fécondation des femelles et ils se nourrissent très peu ou pas du tout. Cependant chez *I. persulcatus* il a été montré que le mâle pouvait jouer un rôle dans la transmission du pathogène, car il semble qu'il y ait transmission sexuelle de *Borrelia* des tiques mâles aux femelles [Alekseev and Dubinia 1996 ; Alekseev et al 1999]. Tous les stades peuvent se nourrir accidentellement sur l'homme et c'est ainsi qu'il rentre en contact avec les agents de la maladie de Lyme.

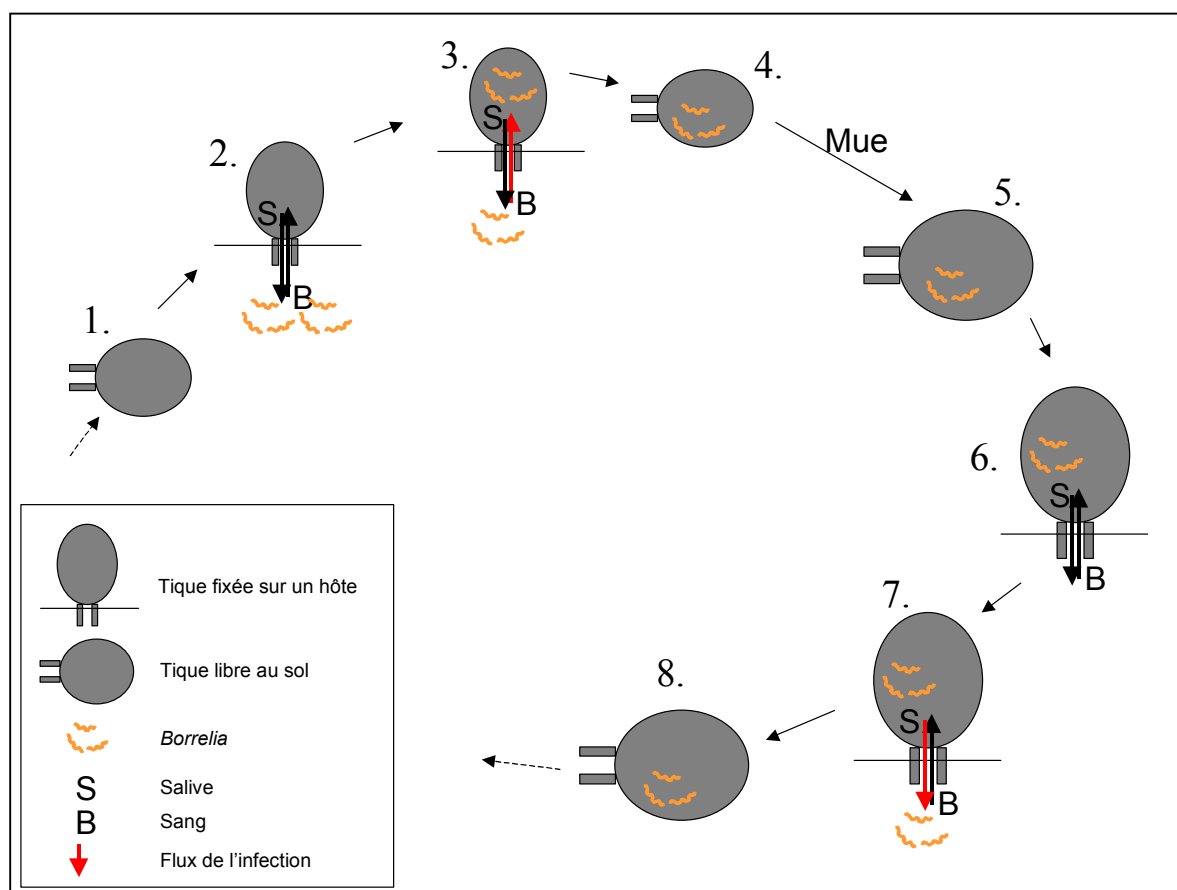


Figure 1-8 : Etapes de vie d'*Ixodes* et relation avec l'infection par *B. burgdorferi* sl.

Ces relations dynamiques entre le vecteur, l'hôte et l'agent pathogène peuvent donc se voir sous deux angles : la transmission de l'agent pathogène du vecteur à l'hôte (Figure 1-8 : 6-8) et la transmission de l'agent pathogène de l'hôte au vecteur (Figure 1-8 : 2-5).

1.3.1 Développement de *B. burgdorferi* dans la tique et transmission de l'agent pathogène du vecteur à l'hôte

L'agent de la maladie de Lyme est transmis à l'hôte via la salive de la tique pendant qu'elle prend son repas sanguin [Ribeiro et al. 1987 ; Zung et al. 1989 ; Gern et al. 1990 ; De Silva and Fikrig 1995 ; Gern et al. 1996 ; Ohnishi et al 2001]. Dans la plupart des tiques à jeun, les spirochètes sont localisés à l'intérieur de l'intestin [Burgdorfer et al 1982, 1989 ; Benach et al 1987 ; De Silva and Fikrig 1995 ; Gern et al 1996 ; Leuba-Garcia et al 1998 ; Ohnishi et al 2001]. A ce moment, les spirochètes dans la tique sont non infectieux et donc incapables d'établir une infection dans la souris. En effet les nymphes infectées broyées à jeun et injectées dans les souris n'établissent pas une infection [Piesman 1993].

Pendant le repas, les spirochètes qui se trouvent dans l'intestin d'une tique à jeun, migrent de l'intestin aux glandes salivaires d'où ils sont transmis à l'hôte par la salive [Ribeiro et al 1987 ; Zung et al 1989 ; Gern et al 1990 ; de Silva and Fikrig 1995 ; Gern et al 1996 ; Ohnishi et al 2001]. En même temps chez *I. scapularis* le nombre de spirochètes dans la tique augmente [Piesman et al 1990 ; De Silva and Fikrig 1995 ; Piesman et al 2001 ; Hodzic et al 2002]. Au début du repas sanguin, les spirochètes qui étaient non infectieux dans les tiques à jeun deviennent infectieux et sont capables d'établir une infection dans la souris si les tiques sont broyées et injectées dans la souris [Piesman 1993].

La transmission de *Borrelia* n'a généralement pas lieu dès que la tique se fixe et qu'elle commence à se nourrir. Aux Etats-Unis, il a été montré que l'efficacité de transmission par *B. burgdorferi* ss augmente au cours du repas sanguin de la tique *I. scapularis*. La transmission de l'infection a lieu occasionnellement déjà 24h après la fixation, mais un haut taux de transmission n'est obtenu qu'après 48h ou plus [Piesman et al 1987 ; Piesman 1993 ; Ohnishi et al 2001 ; Hodzic et al 2002].

En Europe également, chez *I. ricinus*, l'efficacité de transmission augmente avec le temps de fixation de la tique, mais cette transmission a lieu plus tôt et avec une efficacité plus grande [Kahl et al 1998]. En effet Kahl et al [1998] ont montré qu'après environ 17h de fixation déjà, les tiques avaient transmis *B. burgdorferi* si à 50% des animaux infestés. Cela montre qu'il existe une différence dans la dynamique de transmission entre *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss aux Etats-Unis et *I. ricinus* et *B. burgdorferi* si en Europe. Cette dissimilitude pourrait être due à un plus grand nombre de tiques présentant une infection systémique dans l'Ancien Monde. En effet on sait que chez certaines tiques à jeun on peut trouver une infection systémique, c'est-à-dire une infection généralisée de plusieurs organes de la tique même. Ce phénomène a été étudié tant en Europe avec *I. ricinus* qu'aux Etats-Unis avec *I. scapularis*. Chez *I. ricinus* des taux assez importants d'infection systémique, variant de 5% à 36%, ont été observés [Burgdorfer et al 1983 ; Leuba-Garcia et al 1994 ; Lebet and Gern 1994] alors que chez *I. scapularis* les infections systémiques sont beaucoup plus rares [Burgdorfer et al 1988 ; Burgdorfer and Hayes 1989]. Les facteurs qui conduisent à des infections systémiques chez les tiques à jeun ne sont pas connus. La présence de spirochètes dans les glandes salivaires des tiques lors d'une infection systémique est de grande importance dans la transmission de l'agent pathogène à l'hôte, car il est fort probable que la transmission puisse avoir lieu en un temps plus court de fixation de la tique. L'autre raison pourrait être liée à l'existence d'un plus grand nombre de génoespèces de *Borrelia* dans *I. ricinus*. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu contribuer à

éclaircir les dynamiques de transmission de *B. burgdorferi* si entre la tique *I. ricinus* et l'hôte et vice versa.

Pendant la migration des borrelies de l'intestin aux glandes salivaires au cours du repas sanguin, *B. burgdorferi* si change l'expression de plusieurs protéines de surface. Dans les tiques à jeun les spirochètes expriment la protéine de surface OspA et rarement l'OspC [Fingerle et al 1995 ; Hodzic et al 2002]. Au cours du repas sanguin, les borrelies chez *I. scapularis* expriment de moins en moins l'OspA et par contre elles commencent à exprimer la protéine de surface OspC [Schwan et al 1995] [De Silva et al 1996]. Dans les glandes salivaires, De Silva et al [1996] ne trouvent pas de spirochètes exprimant l'OspA. Récemment, chez *I. scapularis*, Ohnishi et al [2001] ont montré que dans l'intestin des tiques à jeun, une population de spirochètes exprimant l'OspA et pas l'OspC est présente, mais qu'une population de spirochètes n'exprimant ni OspA ni OspC s'y trouve également confinée. De plus, au cours du repas, dans l'intestin de la tique de nouvelles populations de borrelies apparaissent, les « OspA+ et OspC+ », et les « OspA- et OspC+ ». Ces 4 populations de spirochètes subissent des variations en nombre dans l'intestin en réponse au repas sanguin. Dans le même article les auteurs montrent qu'au cours du repas sanguin, un plus grand nombre de glandes salivaires infectées et un plus grand nombre de spirochètes dans cet organe sont observables après 53h (temps nécessaire à ces tiques pour transmettre l'infection aux souris). A ce moment là, ils ont remarqué, dans les glandes salivaires, une diminution des spirochètes exprimant l'OspA, une forte augmentation de ceux n'exprimant ni OspA ni OspC et l'apparition de ceux exprimant l'OspC.

Ces résultats semblent rapprocher un peu la situation décrite dans *I. scapularis* de celle décrite dans *I. ricinus* par Fingerle et al [1998]. En effet, la même gamme de populations de borrelies a été décrite par Fingerle et al [1998] dans la tique *I. ricinus*, cependant certaines différences subsistent. Chez *I. ricinus*, Fingerle et al [1998] ont travaillé avec des tiques enlevées de patients après différents temps de nutrition non connus, par conséquent le degré de fixation des tiques a été établi en fonction du poids des tiques. Ils ont montré que l'expression de l'OspC augmente avec la prise de poids de la tique, mais aussi que la diminution de spirochètes exprimant l'OspA n'est pas aussi importante que celle décrite par Schwan et al [1995] et que des spirochètes exprimant les deux protéines de surface ou aucune peuvent être présents dans les tiques. De plus, dans les glandes salivaires les spirochètes expriment l'OspA et l'OspC ou seulement l'une des deux protéines. Par contre, une nymphe ayant dans l'intestin et dans les glandes salivaires des spirochètes n'exprimant apparemment que l'OspA, a pu transmettre l'infection à la personne sur laquelle elle s'était fixée. La conclusion de ces chercheurs a été de supposer que les différences par rapport aux travaux de Schwan et al [1995] et De Silva et al [1996] pouvaient être dues aux différentes espèces de *Borrelia* présentes dans les tiques en Europe ou à l'espèce d'*Ixodes*.

Une autre étude récente [Hodzic et al 2002] chez *I. scapularis* a déterminé par real-time PCR la présence de l'ARN de différents gènes des borrelies (dont celui de l'OspA et l'OspC). La transcription de ces deux gènes est active tout le temps, mais arrive à un pic après 2 jours de nutrition et ensuite diminue.

En résumé, les études les plus récentes ont mis en évidence que la variation de l'expression de l'OspA et de l'OspC dans la tique au cours du repas sanguin est bien plus complexe que ce qui avait été déterminé par les premières études dans ce domaine.

Comme on l'a dit, après avoir migré dans les glandes salivaires, *Borrelia* est injectée dans l'hôte via la salive de la tique. En arrivant dans l'hôte vertébré, les spirochètes expriment les protéines de surface qu'ils exprimaient dans les glandes salivaires de la tique. Chez des souris infestées par des *I. ricinus* infectées par *B. afzelii*, Leuba-Garcia et al [1998] ont montré la présence de spirochètes exprimant l'OspC dans la peau.

Ohnishi et al [2001] ont analysé les parties de peau de souris se trouvant autour de l'hypostome d'*I. scapularis* arrachées des souris avant 53h et après 53h de fixation. La peau de moins de 53h de fixation contenait plus de spirochètes exprimant l'OspA que l'OspC, alors que la peau de plus de 53h de fixation des tiques contenait plus de bactéries exprimant l'OspC que l'OspA. Néanmoins, dans les deux cas la plus grande partie des spirochètes n'exprimait ni l'une ni l'autre de ces deux protéines de surface. Seules les spirochètes transmis après 53h ont pu établir une infection dans la souris. Dans une autre étude [Hodzic et al 2002], de l'ADN de *Borrelia* a été détecté dans la peau de souris dès 24h après la fixation d'*I. scapularis*, indiquant qu'une transmission avait déjà eu lieu. La transcription de l'OspA a été trouvée seulement pendant ce premier jour et plus après, par contre une transcription de l'OspC apparaît au moment où commence la dissémination de l'infection à partir du site d'injection, c'est-à-dire 3 jours après la fixation de la nymphe. Ce fait met en évidence encore une fois le lien entre l'OspC et la capacité de dissémination de l'infection décrit dans les travaux de Seinost et al [1999] et Baranton et al [2001].

En ce qui concerne le temps de dissémination de l'infection à partir du site d'inoculation par les tiques, plusieurs études tant avec *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss [Shih et al 1992, 1993] qu'avec *I. ricinus* et *B. burgdorferi* ss [Gern et Rais 1996] ont montré que les spirochètes restent localisés au site où la tique s'est fixée et les a transmis. Cependant, si les travaux de Shih et al [1992, 1993] montrent que la dissémination des spirochètes a lieu 2 à 3 jours après le détachement des nymphes, dans le travail de Gern et Rais [1996] cette infection disséminée est détectée seulement environ 22 jours après le détachement des nymphes. Dans ce dernier travail les auteurs ont effectué une stimulation par larves non infectées du site de fixation des nymphes infectantes, ceci nous a amené à essayer de déterminer si ce facteur pouvait être responsable de la différence observée entre ces deux études.

1.3.2 Transmission de l'agent pathogène de l'hôte à la tique

Lorsque la tique non infectée prend un repas infectieux sur un hôte infecté, le succès de la transmission de *Borrelia* de l'hôte à la tique est influencé par la quantité de tiques fixées sur l'hôte. Le taux de transmission des spirochètes de l'hôte aux tiques augmente avec le nombre de tiques fixées [Ogden et al 1998]. L'espèce d'hôte infecté sur lequel les tiques se sont fixées peut aussi influencer l'infection des tiques [Kurtenbach et al 1994 ; Humair et al 1999]. En effet ces derniers auteurs ont montré que le succès de transmission dépend de la réponse immunitaire des animaux à *Borrelia*, et

en général ils ont vu que le campagnol *Clethrionomys glareolus* développe moins d'anticorps anti-*B. burgdorferi* ss et montre un taux de transmission aux tiques plus élevé que le mulot *Apodemus flavicollis*.

Peu d'études se sont penchées sur ce qui se passe à l'intérieur d'une tique lorsqu'elle s'infecte en se nourrissant sur un hôte [Nakayama and Spielman 1989 ; Piesman et al 1990 ; Piesman 1991 ; De Silva et al 1997], car les efforts étaient principalement dirigés dans la compréhension de phénomènes liés à la transmission de *B. burgdorferi* à l'hôte. Ces études ont montré que le passage de l'infection de l'hôte vers la tique *I. scapularis* a déjà lieu durant les premières heures de nutrition [Piesman 1991] [De Silva et al 1997]. Par contre Nakayama et Spielman [1989] ont trouvé une infection dans les larves se nourrissant sur un hôte infecté seulement après 48h. Une multiplication des spirochètes a lieu dans *I. scapularis* qui prennent un repas sanguin infectieux [Piesman et al 1990] et l'expression de l'OspA par les spirochètes qui se trouvent depuis peu de temps dans la tique a également été démontrée [De Silva et al 1997]. Notons qu'aucune étude n'a été entreprise avec *I. ricinus*.

Plus récemment des études dans ce domaine, mais toujours chez le vecteur Nord Américain, ont également été publiées, et souvent il s'agit de recherches très complètes qui étudient en même temps le passage du spirochète de l'hôte à la tique et le passage du spirochète de la tique à l'hôte, en mettant l'accent sur les protéines de surface exprimées par les borrelies [Schwan and Piesman 2000], et sur la transcription de certains gènes exprimés [Gilmore et al 2001 ; Hodzic et al 2002].

En effet Schwan and Piesman [2000] ont montré que des spirochètes exprimant l'OspA sont présents dans les tiques se nourrissant sur un hôte infecté dès 24h, confirmant les résultats obtenus par De Silva et al [1997]. Dans les larves gorgées qui ont pris un repas infectieux, aucun spirochète exprimant l'OspC n'a été détecté [Schwan and Piesman 2000]. Cependant Hodzic et al [2002] ont détecté dans la tique de l'ARN messenger d'OspA et d'OspC tout au long du repas sanguin et Gilmore et al [2001] ont montré la présence d'ARN messenger de ces deux protéines chez des larves totalement gorgées sur une souris infectée.

Si aucune étude n'a été entreprise avec *I. ricinus* se nourrissant sur un hôte infecté par contre une étude sur *I. ricinus* et les génoespèces *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* a été publiée récemment, mais l'infection des tiques a été produite d'une façon artificielle par capillaire [Fingerle et al 2002]. Il y a été démontré clairement que l'OspC joue un rôle dans la dissémination des spirochètes *B. afzelii* et *B. garinii* dans la tique, et que les dynamiques de l'expression des protéines et de la dissémination dépendent de l'isolat.

Dans notre travail nous avons étudié comment le développement de l'infection par *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss chez *I. ricinus* lorsque cette tique se nourrit sur un hôte infecté par une de ces génoespèces.

Pour finir, on aimerait rappeler qu'une tique peut s'infecter grâce à un autre type de phénomène : la transmission par cofeeding [Gern and Rais 1996 ; Randolph et al 1996]. Il s'agit d'une transmission certainement directe entre tiques infectées et tiques non infectées fixées sur un hôte, en l'absence d'une infection systémique chez celui-ci. Lors de ce travail, nous n'avons pas étudié ce type de transmission.

1.4 Buts généraux

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié plusieurs aspects de la relation *I. ricinus*, *Borrelia* et hôte. Nous avons donc réalisé plusieurs expériences chacune ayant des buts différents :

- Etudier les modes et les dynamiques de la transmission et de l'infectiosité de *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* dans la tique *I. ricinus*.
- Etudier les facteurs capables de stimuler l'infectiosité de *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* dans la tique *I. ricinus*.
- Etudier la dissémination de l'infection chez une souris infectée par des nymphes lors d'une stimulation du site d'inoculation par des larves.
- Etablir si les spirochètes sont ou non capables de traverser la membrane péritrophique dans la tique.
- Etudier la localisation de *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* dans la tique au cours du repas sanguin.
- Observer l'expression des protéines de surface OspA et OspC par *B. burgdorferi* ss dans les nymphes au cours du repas sanguin.
- Déterminer si la protéine de surface OspA est une adhésine.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Spirochètes

Au cours de ce travail, plusieurs souches de *Borrelia* appartenant aux génoespèces *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* ont été utilisées (Tableau 2-1).

Nom de la souche	Espèce	Origine	Obtenue par
NE496	<i>B. afzelii</i>	Tique, CH	Université Neuchâtel
NE2963	<i>B. afzelii</i>	Mammifère, CH	Université Neuchâtel
NE2961	<i>B. afzelii</i>	Mammifère, CH	Université Neuchâtel
NE3932	<i>B. afzelii</i>	Mammifère, CH	Université Neuchâtel
NE3933	<i>B. afzelii</i>	Mammifère, CH	Université Neuchâtel
NE1849	<i>B. burgdorferi</i> ss	Tique, CH	Université Neuchâtel
ZS7	<i>B. burgdorferi</i> ss	Tique, D	Max Plank Inst., Freiburg (Dr. Simon)
B31	<i>B. burgdorferi</i> ss	Tique, USA	Inst. Pasteur, Paris (Dr. Baranton)
B31 mutant Osp-A less	<i>B. burgdorferi</i> ss	mutant	Inst. Pasteur, Paris (Dr. Baranton)

Tableau 2-1: Liste des isolats de *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* utilisés au cours de ce travail.

2.2 Culture

Le milieu pour la culture de *Borrelia burgdorferi* sl est le BSK (Barbour, Stoenner, Kelly). Ce milieu porte ce nom parce qu'il est le résultat de plusieurs modifications et améliorations apportées par Stoenner d'abord et Barbour ensuite au milieu décrit par Kelly pour l'isolement de *B. hermsii*. C'est avec la première version de ce milieu (BSK-I) que *B. burgdorferi* a été isolée [Barbour et al, 1983].

Le milieu BSK-II a été ensuite créé avec une optimisation du BSK-I par Barbour [1984]. Enfin en 1993 [Pollack et al. 1993], le milieu a été modifié pour une standardisation. Le nouveau milieu s'appelle BSK-H (Sigma-Aldrich, Suisse).

Seul le milieu BSK-H modifié selon Sinsky et Piesman [Sinsky and Piesman, 1989], donc avec l'ajout entre autres d'antibiotiques pour diminuer les contaminations, a été utilisé au cours de ce travail (isolements à partir de biopsies, de tiques, nutrition par capillaire des tiques,...). Nous allons dorénavant utiliser le terme BSK-H pour désigner le milieu modifié selon Sinsky et Piesman.

La culture a été faite dans des tubes 5 ml remplis avec 4 ml de milieu BSK-H en incubation à 34°C. La culture de certaines souches (B31 et B31 OspA-less) a par contre été faite en incubation à 30°C. Pour l'observation des cultures, les tubes n'ont été ouverts que sous une hotte stérile à flux laminaire après dix jours d'incubation, et une goutte de milieu a été posée entre lame et lamelle. Les lames ainsi préparées, ont été observées au microscope à fond noir (Wild MD G4-10822) à un grossissement de 500x pour la détection de borrelies. Si les spirochètes sont là, ils apparaissent blancs, longs, spiralés et en mouvement.

2.3 Tiques

Un élevage de tiques non infectées est maintenu à l'institut de Zoologie de l'Université. Les tiques au stade larvaire sont nourries sur des souris, alors que les nymphes et les adultes sont nourries sur lapin. Les tiques gorgées récoltées et comptées sont ensuite maintenues à température ambiante et à une humidité proche de la saturation (>95%), jusqu'à leur mue ou à l'éclosion des œufs pondus par les femelles [Graf, 1978].

2.3.1 Tiques infectées

Les tiques infectées utilisées dans ce travail ont été obtenues de différentes façons. La majeure partie des tiques utilisées étaient infectées de manière naturelle : elles provenaient soit de la nature où elles avaient été récoltées, soit de souris infectées en laboratoire. Certaines tiques ont par contre été infectées par voie artificielle par l'administration active d'une culture de spirochètes, en utilisant la technique des capillaires.

2.3.1.1 Récolte des tiques dans la nature

Les tiques de la nature utilisées dans cette étude ont été prélevées dans la forêt de Chaumont, sise au Nord de la ville de Neuchâtel. Les tiques ont été récoltées à l'aide d'un drapeau blanc qui a été glissé sur la végétation au bord du sentier forestier et sur lequel elles se sont accrochées. Le drapeau blanc a été régulièrement retourné et inspecté pour la présence de tiques. Seules les tiques au stade nymphal ont été prélevées à l'aide de brucelles. Elles ont été mises dans des tubes en plastique contenant des brins d'herbe fraîchement récoltée. De retour au laboratoire, elles ont été comptées et gardées dans des conditions d'humidité >95% et à température ambiante.

2.3.1.2 Infection des tiques par voie naturelle

L'infection par voie naturelle des tiques a été faite avec le stade larvaire pour obtenir des nymphes infectées ou avec le stade nymphal pour obtenir des adultes infectés. Pour l'infection des larves, les souris sont endormies comme détaillé dans le chapitre 2.4 et des larves ont été délicatement posées à l'aide d'un pinceau sur la tête des souris, les cages des souris ont ensuite été posées dans un bac contenant de l'eau et les larves gorgées ont été récoltées une fois qu'elles se trouvaient dans l'eau.

L'infection des nymphes a été faite d'une façon un peu différente. Les souris, une fois endormies, ont été rasées sur le dos et une capsule en plastique (15 mm de diamètre) a été appliquée avec de la cire [Mbow et al. 1994]. Les nymphes ont ensuite été placées à l'intérieur de la capsule et ont été récupérées une fois gorgées.

2.3.1.3 Nutrition des tiques par voie artificielle

Les tiques ont été collées sur un scotch double face posé sur un support en plastique. Des capillaires (type : GB 120-TF 10, Science Products GmbH, Allemagne) effilés ont été préparés à l'aide d'un « microelectrode puller » (Scientific and Research Instruments Ltd, Angleterre) et ensuite coupés au bon diamètre. Les capillaires ainsi préparés ont été plongés dans du milieu de culture contenant au

moins 1×10^7 spirochètes/ml. Les capillaires ont ensuite été posés sur le rostre de chaque tique [Monin et al. 1989]. Le gonflement de l'abdomen et la présence de fèces sont les facteurs qui ont été pris en compte pour déterminer si la tique s'était nourrie ou pas.

2.3.2 Mise en évidence de l'infection chez la tique

L'infection des tiques a été mise en évidence essentiellement par deux méthodes, la mise en culture, qui nous permet de détecter la présence de borrelies vivantes et l'immunofluorescence directe.

2.3.2.1 Mise en culture de la tique

Les nymphes ont été lavées à l'éthanol 70% dans une petite boîte de Petri, elles ont ensuite été séchées et coupées sur une lame avec une lancette pointue, puis elles ont été mises dans des tubes de milieu de culture (BSK-H, Sinsky-Piesman). Les tubes ainsi préparés ont été maintenus à l'étuve (34°C, ou 30°C s'il s'agissait de tiques infectées par B31 ou B31 OspA-less) pendant 10 jours avant la première observation au microscope à fond noir (cf. 2.2). Si après un mois d'incubation aucun spirochète n'a été détecté, la culture a été considérée comme négative.

2.3.2.2 Immunofluorescence directe

Les anticorps contenus dans un pool de sérums humains ayant démontré une forte réponse anti-*B. burgdorferi* si par test Elisa et par immunofluorescence directe, ont été conjugués au fluorochrome isothiocyanate de fluorescéine. Ce conjugué a été mis à réagir avec le contenu des tiques. Lors de la présence de spirochètes, les anticorps se lient aux antigènes de surface des borrelies et, du moment que ces anticorps sont liés au composant fluorescent, ils rendent visibles les borrelies sous un microscope à immunofluorescence avec une lumière ultraviolette.

Les nymphes ont d'abord été lavées dans une solution d'alcool éthanol 70%. Puis leur contenu a été étalé dans des spots d'une lame à 21 puits préalablement dégraissée.

L'étalement a été fait de la façon suivante : sous une loupe on a mis la nymphe sur le spot de la lame, à l'aide d'une pointe métallique on a fait un petit trou dans l'abdomen de la tique, puis à l'aide de fines brucelles, on a étalé le contenu qui en sortait. Après avoir fixé le matériel à l'acétone pendant 15 min, avec une pipette, on a mis sur chaque puits du conjugué fluorescent de façon à le recouvrir totalement. Les lames ainsi traitées ont été mises dans une chambre humide (boîte contenant du papier très mouillé et fermée) en incubation à 37°C pendant 30 à 45 min. Ce temps passé, les lames ont été lavées deux fois avec du PBS pendant 5 min sous agitation, et rincées à l'eau distillée. Les lames ont ensuite été séchées. À ce moment les lamelles ont été posées sur les lames avec une goutte de glycérine tamponnée. Les lames ont été gardées à l'obscurité et à -4°C.

L'observation a été faite à l'immersion et à un grossissement de 400x avec un microscope à fluorescence avec une lumière UV (Olympus BH-2). Les spirochètes apparaissaient vert fluorescent. Le taux d'infection de chaque lot de tiques a été détecté par immunofluorescence directe sur 10 nymphes de ce même lot.

Préparation du tampon PBS :

NaCl	8 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l

Ajuster le pH à 7.35

Le conjugué anti-*Borrelia* a été préparé selon le mode opératoire décrit par Peacock et al [1971]. Le mode opératoire figure dans l'Annexe 1.

2.4 Souris

Des souris Balb/c provenant de l'élevage maintenu à l'Institut de Zoologie de l'Université ou des souris AKR/N provenant soit du Max-Planck-Institut for Immunobiology de Freiburg (Allemagne), soit de l'élevage de l'Institut de Zoologie, ont été utilisés pour les différentes études de ce travail de thèse.

Avant toute manipulation, chaque souris a été endormie par une injection intramusculaire de 0.04 ml d'un mélange de Narketan (Chassot AG, Bern, Suisse) et Xylasol (Gräub AG, Bern, Suisse) (respectivement en proportions de 5 à 8).

2.4.1 Souris infectées

L'infection des souris a été obtenue soit par voie naturelle par piqûre de tiques infectées, soit par voie artificielle par injection de spirochètes en milieu de culture ou par injection de broyat de tiques infectées. De plus, une infection par dépôt de broyat de tiques infectées a également été expérimentée.

2.4.1.1 Infection des souris par voie naturelle

La souris sous narcose a été tondue sur le dos, et une capsule de plastique de 15 mm de diamètre a été appliquée sur sa peau à l'aide de cire [Mbow et al 1994]. Des nymphes infectées ont été placées à l'intérieur de la capsule où elles ont pu se fixer, se nourrir et transmettre l'infection.

2.4.1.2 Infection des souris par injection

Deux types d'infection artificielle par injection ont été réalisées. L'une des manières consistait en une injection sous-cutanée de spirochètes en milieu de culture. Les spirochètes ont été comptés à l'aide d'une lame de Helber et 150µl d'une solution contenant au moins 1×10^7 spirochètes/ml ont été injectés dans chaque souris. Un deuxième type d'infection a été réalisé par injection de broyat de tiques. Des nymphes infectées ont été broyées à l'aide d'un petit mortier dans du milieu de culture BSK-H Sinsky-Piesman en quantité de 25 à 30 µl par tique. Une injection sous-cutanée d'environ 60 à 70 µl de cette préparation a été effectuée pour chaque souris infectée de cette façon.

2.4.1.3 Infection des souris par dépôt

Certaines souris ont reçu un dépôt de broyat de tiques infectées, dont la préparation a été expliquée dans le paragraphe ci-dessus, sur la peau du dos préalablement tondue. La goutte de préparation déposée était d'environ 60 µl et a été laissée sur la peau de l'animal pendant 15 min.

2.4.2 Mise en évidence de l'infection chez la souris

L'infection a été mise en évidence par deux méthodes différentes nous permettant de détecter des borrelies vivantes dans les souris : la mise en culture de biopsies de peau ou la xénodiagnose.

2.4.2.1 Biopsie de peau et mise en culture

Les souris ont été endormies, puis le dos (là où les nymphes se sont fixées), ou une des oreilles, a été désinfecté avec une solution 70% d'éthanol. Ensuite à l'aide d'une paire de fins ciseaux une biopsie a été prélevée et mise dans un tube contenant 4 ml de milieu de culture et le tube a été incubé à 34°C pour la culture des spirochètes (cf. 2.2).

2.4.2.2 Xénodiagnose

Cette technique consiste à prendre des tiques non infectées et à les laisser se gorger sur un animal supposé infecté. Après la mue, elles sont analysées pour pouvoir éventuellement détecter une infection. Si ceci est le cas, on peut affirmer que l'animal en question était infecté et qu'il a pu transmettre l'agent pathogène à la tique.

Après la narcose (cf. 2.4), à l'aide d'un pinceau, une cinquantaine de larves de tiques ont été mises sur la tête de chaque souris qui a été ensuite remise dans sa cage. Les cages sont mises dans un bac avec le fond rempli d'eau. Les larves, une fois gorgées, se sont détachées, se sont déplacées et sont restées piégées dans l'eau, où elles ont été récoltées et comptées. Ces larves gorgées ont été placées dans des conditions d'humidité >95% et à température ambiante en attendant leur mue. Les nymphes issues de ces larves ont ensuite été analysées pour détecter une infection par immunofluorescence directe ou, plus rarement, par mise en culture (cf. 2.3.2).

2.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Comme la méthode d'observation avec le microscope à fond noir permet à quelques spirochètes, s'ils ne se sont pas multipliés en grand nombre, d'échapper au contrôle, une PCR a parfois été faite pour détecter de l'ADN de *Borrelia* dans des milieux de culture apparemment non infectés.

La PCR est une technique qui permet l'amplification d'une région particulière de l'ADN désirée.

En ce qui concerne cette étude, c'est de l'ADN codant pour de l'ARN ribosomal qui a été amplifié. Plus précisément, c'est la partie d'ADN se trouvant entre deux régions qui se répètent et qui codent pour les gènes 23S et 5S de l'ARN ribosomal, qui a été amplifiée [Postic et al. 1994].

Les cultures ont été lavées avant de faire une PCR. Lorsque la culture était positive en microscopie à fond noir, 1 ml de culture a été pris pour être lavé. Quand la culture était en apparence négative, tout

le contenu du tube (4 ml) a été pris. Les échantillons ont été préparés de la manière suivante :

- Centrifuger le milieu pendant 15 min à 10000 rpm
- Enlever le surnageant, rajouter 1 ml de PBS/MgCl₂ pH 7.3
- Centrifuger 10 min à 10000 rpm et enlever de nouveau le surnageant
- Rajouter 1 ml de PBS/MgCl₂ pH 7.3
- Centrifuger 10 min à 10000 rpm et enlever le surnageant
- Ajouter 30 à 50 microlitres de H₂O nanopure
- Chauffer à 100°C pendant 15 min

À ce stade on peut garder les échantillons au congélateur à -20°C

Pour chaque PCR, il faut avoir des contrôles positifs, permettant de contrôler la bonne marche de la PCR. Les contrôles positifs sont des cultures de spirochètes d'espèce connue, préalablement lavées, chauffées et stockées à -20°C. Il faut aussi avoir des contrôles négatifs contenant seulement de l'eau nanopure avec le « mix », qui doivent rester négatifs après la réaction PCR. Ceci dans le but de pouvoir exclure une contamination .

Préparation du « mix »

H ₂ O nanopure	23.7 µl
10x Taq buffer / 15 mM MgCl ₂ (Boehringer)	5 µl
Primer 1 5 pmoles	5 µl
Primer 2 5 pmoles	5 µl
dNTP's 200µM	1 µl
Taq polymérase 1.5U	<u>0.3 µl</u>
	40 µl Mix/tube

Dans les tubes pour la réaction PCR, nous avons chargé 40µl mix/tube pour les échantillons, 40µl mix + 10µl H₂O nanopure pour les contrôles négatifs et 49µl mix + 1µl de souche contrôle positif.

Programme PCR

Le programme utilisé est le suivant:

(denaturation)	94°C pendant 3 min	1 cycle
(denaturation)	94°C pendant 1 min	} 36 cycles
(annealing)	55°C pendant 1 min	
(extention)	72°C pendant 1 min	
(extention)	72°C pendant 9 min	1 cycle

L'échantillon est ensuite gardé à 4°C

Analyse du résultat sur gel d'Agarose

Un gel d'agarose 1% a été préparé:

- 0.5 g agarose dans 50 ml 0.5x TBE
- Chauffer pendant 1 min jusqu'à ébullition dans un four à micro-ondes
- Ensuite rajouter 2 µl de bromure d'ethidium et couler le gel
- Charger 10 µl d'échantillon mélangé avec 2 µl de bleu de bromophénol
- Laisser migrer pendant environ 40 min à 95V.

Le gel est visualisé en UV, la taille des fragments d'ADN amplifiés est de 226-256pb.

2.6 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Il s'agit d'utiliser un enzyme de restriction pour couper l'ADN amplifié par PCR. L'endonucléase de restriction reconnaît et coupe à plusieurs endroits spécifiques, donc si elle est mise en contact avec plusieurs brins d'ADN identiques, nous obtiendrons un certain nombre de morceaux d'ADN, avec la même taille, et qui vont être spécifiques de l'ADN utilisé. Par contre si la même endonucléase est mise avec deux ADN différents, la coupure va donner lieu à deux profils distincts formés par les morceaux d'ADN ayant des tailles différentes lors de l'électrophorèse qui suit la digestion enzymatique de l'ADN amplifié.

Dans ce travail c'est l'enzyme (*Mse I*) qui a été utilisé sur les échantillons de PCR [Postic et al, 1994].

Préparation du mélange de digestion

10x <i>Mse I</i> buffer	3.5 µl
100x BSA	0.35 µl
<i>Mse I</i> 4 u/µl	<u>1 µl</u>
	4.85 µl mix par échantillon

- Mélanger les 4.85 µl avec tout l'échantillon de PCR
- Laisser les échantillons en incubation à 37°C pendant au moins 4 heures

À ce moment les échantillons peuvent être gardés au congélateur à -20°C

L'analyse du résultat est faite sur minigel d'Acrylamide. Le gel utilisé est un minigel (Bio-Rad) avec gel de concentration et gel de séparation d'acrylamide.

Gel de séparation

H2O nanopure	4.95 ml
40% Acrylamide (19:1) (National diagnostics, England)	4 ml
10x TBE	1 ml
Persulfate d'ammonium 10%	75 µl
TEMED	8.75 µl

Gel de concentration

H2O nanopure	1.9 ml
40% Acrylamide (19:1)	325 µl
10x TBE	250 µl
Persulfate d'ammonium 10%	20 µl
TEMED	6 µl

- Couler le gel de séparation et, une fois qu'il a polymérisé, couler le gel de concentration et rajouter le peigne
- Une fois tout le gel polymérisé, charger les échantillons et les contrôles + de la PCR en les mélangeant avec 5 µl de bleu de bromophénol
- Laisser migrer à 120 V pendant 100 min (le tampon de migration est le TBE 1x)
- Colorer le gel dans 20 ml de TBE 1x mélangés avec 1 µl de bromure d'éthidium pendant 15 min

A ce moment le gel est prêt pour être observé sous UV. Chaque espèce de *B. burgdorferi* ss a un profil de fragments d'ADN différent.

2.7 Microscopie électronique à transmission

Le microscope électronique à transmission (TEM) a été utilisé dans le but de détecter et d'observer l'emplacement des *Borrelia* à l'intérieur d'une tique. Cette méthode permet grâce à son grand pouvoir d'agrandissement une visualisation très précise des structures de la tique et des endroits dans lequel un spirochète se trouve. En effet l'utilisation de ce microscope permet de travailler avec une bonne résolution au niveau cellulaire.

Les tiques doivent être disséquées afin d'avoir une bonne fixation et inclusion de tous les organes. La cuticule a donc été coupée à plusieurs endroits ou, si possible, enlevée jusqu'au niveau du scutum. Cette dissection a été faite dans une goutte de PBS (pH=7.35).

2.7.1 Préparation des échantillons

La préparation des tiques incluses dans la résine a été réalisée en quatre étapes : la fixation, la déshydratation, l'inclusion et la polymérisation.

2.7.1.1 Fixation

La fixation est une étape très importante, car elle permet le maintien en place des organes et la préservation des structures cellulaires de la tique afin qu'elles soient reconnaissables, ceci pour que les échantillons puissent supporter les nombreuses manipulations qu'exigent la déshydratation, l'inclusion et la polymérisation et enfin la préparation des coupes.

Le fixateur qui a été utilisé est un mélange de paraformaldéhyde (PFA) (2%) qui pénètre rapidement et durcit, et de glutaraldéhyde (GA) (2.5%) qui pénètre plus lentement et augmente la fixation.

Mode opératoire :

- Disséquer les nymphes et les plonger dans le fixateur I pendant 2h (3-4h)* à température ambiante ou une nuit à 4°C (* temps indiqué dans le protocole de base établi pour des tiques adultes)
- Laver 3x 10mn et une nuit à 4°C dans du tampon cacodylate (0.1M) avec sucrose (4%)
- Placer le tissu dans le fixateur II pendant 4h à température ambiante
- Laver 3x 10mn dans du tampon cacodylate (0.1M) avec sucrose (4%)

Préparation de :PFA (paraformaldéhyde) 20% frais préparé en journée

Dissoudre 2g de PFA dans environ 8 ml d'eau nanopure

Secouer et chauffer à 60-70°C pendant 5 mn

Ajouter 1 à 2 gouttes de NaOH 1N pour éclaircir la solution

Compléter à 10 ml et laisser refroidir au besoin sous agitation

Tampon cacodylate 0,2M

Dissoudre 4.28 g de cacodylate dans environ 90 ml d'eau nanopure

Ajuster le pH à 7.4 avec du HCl 1N

Compléter à 100 ml

Fixateur I

GA 2.5 % + PFA 2% dans du tampon cacodylate 0.1M + sucrose 0.8%

Pour 10 ml	GA 25%	1ml
	PFA 20%	1ml
	Cacod. 0.2M	5ml
	Eau nanopure	3ml
	Sucrose	0.08g

Fixateur II !! utiliser des gants !!

OsO₄ 1% dans du tampon cacodylate 0.1M + sucrose 4%

Pour 4 ml	OsO ₄ 4%	1ml	} à mettre en 1 ^{er} , bien dissoudre le sucrose
	Cacod. 0.2M	2ml	
	Eau nanopure	1ml	
	Sucrose	0.16g	

Deux autres types de fixation, la fixation Dalton et la fixation Uranyl en bloc ont aussi été testées. Le mode opératoire de ces deux fixations figurent dans l'Annexe 2 et dans l'Annexe 3.

2.7.1.2 Déshydratation

Suivant le type de résine utilisée, Spurr (hydrophobe) (Plano, Allemagne) ou LR White (LRW) (Plano, Allemagne) le choix de la méthode de déshydratation a été différent. Avec la Spurr, il est essentiel de déshydrater complètement les tissus et dans ce cas il a été nécessaire de faire plusieurs bains à des concentrations croissantes d'acétone. Dans le cas de la résine LRW, qui supporte une déshydratation partielle grâce au fait qu'elle est plus hydrophile, la déshydratation a été faite par des bains de concentration croissante d'éthanol, ce qui rend la déshydratation moins agressive.

Spurr :Déshydratation à l'acétone 30%, 50%, 70%, 90% 10 mn pour chaque % puis 3 fois 15mn dans l'acétone 100%

LRW : Déshydratation dans l'éthanol 30%, 50%, 70%, 90% 15mn pour chaque % et 30mn dans l'éthanol 100%

2.7.1.3 Inclusion

Pour que la Spurr puisse pénétrer jusqu'au milieu des tissus de la tique avant de polymériser, elle a été rajoutée à l'acétone dans un rapport $\frac{1}{2}$ / $\frac{1}{2}$ (15mn) puis dans un rapport $\frac{2}{3}$ / $\frac{1}{3}$ (30 mn). La Spurr pure a ensuite été utilisée 3 fois 30 mn et la nuit à température ambiante.

Pour la résine LRW le principe est le même : la tique a été placée dans un bain éthanol/LRW dans un rapport $\frac{1}{2}$ / $\frac{1}{2}$ pendant 2 fois 30 mn puis dans la LRW pure pendant une heure. Puis la nuit entière et finalement à nouveau une heure.

2.7.1.4 Polymérisation

Les tiques choisies pour être incluses dans la résine Spurr, ont été placées dans un moule rempli de cette même résine. Par contre les tiques incluses dans la LRW ont été placées dans une capsule de gélatine de 0.5 ml (Baltec, Lichtenstein) contenant de la résine LRW. La polymérisation a toujours été réalisée dans un four à 60°C pendant 24 h.

2.7.2 **Coupes semi-fines et ultra-fines**

Le bloc autour de la tique a été taillé grossièrement au moyen d'une lame de rasoir et mis dans la rotule de l'ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung par Leica, Suisse). Le bloc a ensuite été taillé de chaque côté avec un angle de 30°.

Deux types de coupes ont été réalisées :

- Les coupes semi-fines sont d'une épaisseur de 3µm environ et ont été réalisées au moyen d'un couteau de verre. La vitesse de l'ultramicrotome était d'environ 3mm/sec. Les coupes ont été récoltées et déposées sur une lame albuminée puis colorées au bleu de toluidine à 1% (50ml d'eau, 0,5 g de borate de Na et 0,5g de bleu de toluidine). Ces coupes ont été observées au microscope photonique afin de pouvoir distinguer les divers organes.
- Les coupes ultra-fines sont d'une épaisseur d'environ 70-90 nm et ont été réalisées au moyen d'un couteau en diamant. La vitesse de l'ultramicrotome est de 1,5mm/sec. Les coupes sont ensuite récoltées sur une grille de cuivre préalablement recouverte d'une membrane de Formvar (Baltec) carbonnée. Ce sont ces coupes qui ont été utilisées pour l'observation en microscopie électronique.

2.7.3 Contrastation des coupes

Chaque grille a été pincée dans les fentes d'un support en plastique.

Méthode classique :

Des gouttes d'acétate d'uranyl aqueux 7% ont été déposées afin de recouvrir les grilles qui ont ainsi été laissées pendant 15 min à l'obscurité. Un rinçage à l'éthanol 50% puis un à l'eau distillée ont été faits. Après avoir bien séché les grilles, nous les avons recouvertes de gouttes de citrate de plomb (solution de Reynolds) que nous avons laissé agir pendant 5-30 min. Ensuite un rinçage avec du NaOH 0,04% puis un à l'eau distillée ont été effectués. Les grilles ainsi préparées ont été placées dans une boîte de Petri avant d'être observées au microscope électronique (Philips CM 100).

Deux techniques d'augmentation de la contrastation ont aussi été testées.

Augmentation de la contrastation avec l'acide tannique :

Les grilles sont placées 15 mn dans l'acétate d'uranyl aqueux 7% puis rincées à l'éthanol 50 %. Les grilles sont ensuite trempées 10 mn dans une solution d'acide tannique 2% puis la méthode est identique à la méthode classique.

Augmentation de la contrastation selon Daddow

Les grilles sont placées 1-5 mn dans la solution de Reynolds, lavées à l'eau distillée puis trempées dans l'acétate d'uranyl aqueux 7% pendant 40 mn. Ensuite ces grilles sont lavées à l'éthanol 50% et placées dans la solution de Reynolds pendant 20 mn. Finalement un dernier lavage à l'eau est effectué.

2.8 Microscopie confocale

Le principe du microscope confocal (MC) est identique à celui d'un microscope à fluorescence, mais le microscope confocal permet de réaliser des coupes virtuelles dans l'épaisseur de l'échantillon grâce à

un rayon laser et a la présence des « Pinholes » qui permettent la vision du plan focal voulu (cf. Figure 2-1). Une vision plus complète de l'organe entier peut ainsi être obtenue. La limite d'épaisseur de l'échantillon est de 80µm.

Nous avons utilisé ce microscope pour détecter la présence et l'emplacement des borrélias à l'intérieur des organes des nymphes ainsi que l'expression de certaines protéines. Les observations ont été faites avec un microscope confocal Leica TCS 4D.

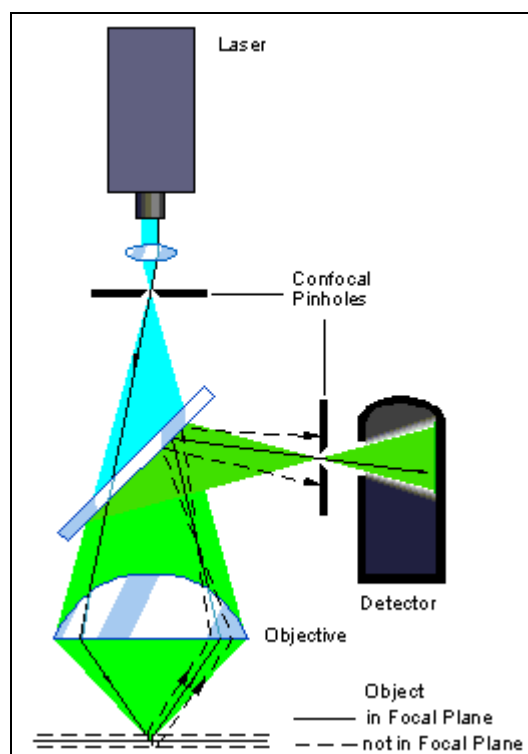


Figure 2-1 : Principe du microscope confocal

2.8.1 Immunofluorescence directe (IFD) pour détecter les borrélias

Pour la détection des borrélias le conjugué anti-*Borrelia*, voir chapitre (cf. 2.3.2.2), a été utilisé. La nymphe a soit été disséquée pour en enlever les organes désirés, soit seule la cuticule dorsale a été entièrement enlevée en laissant tous les organes de la tique en place.

La préparation des échantillons a été faite d'après De Silva et Fikrig (1995) :

- Disséquer la nymphe dans une goutte de PBS (pH=7.35)
- Si seuls les organes sont prélevés, ceux-ci sont fixés sur une lame « Silanated slides » (Biorad, Suisse) en chambre humide 2h, sinon la nymphe ouverte a été posée sur une lame conventionnelle.
- Fixer avec du PFA (Paraformaldéhyde) 4% fraîchement préparé, une nuit à 4°C ou 30 min à température ambiante
- Laver 2x 5 à 10 min dans du PBS

- Incuber 5 min à température ambiante avec 0.5% Triton-X 100
- Incuber 30 min à température ambiante avec 5% Sérum fœtal de veau
- Réaction immunologique: faire réagir avec le conjugué anti-*Borrelia* pendant 30 min à 37°C
- Laver 3x 10 min dans du PBS
- Laver 1x brièvement à l'eau distillée
- Monter entre lame et lamelle dans du Vectashield mounting medium (Vector lab, Suisse)
- Immobiliser les lamelles avec du vernis à ongles
- Garder les lames à l'obscurité et à 4°C

2.8.2 Immunofluorescence indirecte (IFI) pour détecter les protéines de surface exprimées

Dans le but d'observer le changement des protéines de surface exprimées par les spirochètes au cours du repas sanguin, les deux protéines de surface OspA et OspC ont été choisies. Pour la détection de l'expression de ces protéines de surface nous avons utilisé une technique d'immunofluorescence indirecte. Les anticorps (AC) primaires qui ont été utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine recherchée. Les deux AC primaires utilisés appartiennent à deux sous types d'IgG (Tableau 2-2).

Nom de l'AC primaire	Classe	Dirigé contre	Provenance
LA2	IgG2b	OspA	Dr R. Wallich
LA97.1	IgG1	OspC	Dr R. Wallich

Tableau 2-2 : Liste et caractéristiques des anticorps primaires utilisés.

Les anticorps secondaires qui ont été utilisés sont l'Alexa Fluor 647, dirigé contre les IgG2b de souris et l'Alexa Fluor 568, dirigé contre les IgG1 de souris (Molecular probes, Pays-Bas). Ces deux fluorochromes, ayant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes (Alexa Fluor 647 : ex=650/em=668 ; Alexa Fluor 568 : ex=578/em=603), ils peuvent être distingués lors de l'observation à la microscopie confocale.

Cependant, l'utilisation seule des deux anticorps secondaires dirigés contre les deux anticorps primaires anti-OspA et anti-OspC, n'aurait pas permis de détecter dans la tique les borrelies n'exprimant ni l'OspA ni l'OspC. Pour rendre détectable ce dernier type de bactéries le conjugué anti-*Borrelia* (cf. 2.3.2.2) a été utilisé.

Mode opératoire:

- Disséquer la nymphe dans une goutte de PBS (pH=7.35)
- Intestin et glandes salivaires sont prélevés, ceux-ci sont posés sur une lame à IF et déchiquetés à l'aide d'aiguilles lancéolées modifiées pour les rendre aplaties et coupantes à l'extrémité. Ces lames sont séchées en incubation à 37°C.
- Fixer avec de l'acétone 10-15min.
- Incuber 30 min à température ambiante avec 5% Sérum fœtal de veau
- Réaction immunologique primaire: faire réagir avec un mélange 1 :1 des anticorps LA2 et LA97.1 pendant 30 min à 37°C
- Laver 3x 10 min avec 0.5% Sérum fœtal de veau dilué dans du PBS
- Réaction immunologique secondaire : faire réagir avec un mélange de conjugué anti-*Borrelia* (dilution finale dans le mélange comme établi au laboratoire pour une réaction d'immunofluorescence directe), Alexa Fluor 647 et Alexa Fluor 568 (dilution finale dans le mix 1/50 chacun), pendant 30min à 37°C
- Laver 3x 10 min dans du PBS
- Laver 1x brièvement à l'eau distillée
- Monter entre lame et lamelle dans du Vectashield mounting medium (Vector lab, Suisse)
- Immobiliser les lamelles avec du vernis à ongles
- Garder les lames à l'obscurité et à 4°C

2.9 Test statistique

Le test statistique qui a été utilisé est le Test exact de Fisher. La valeur de p est de 0.05 et la différence entre les deux paramètres a été considérée comme significative, lorsque p était ≤ 0.05 .

3 RESULTATS

Avant tout on aimerait signaler que dans les chapitres résultats et discussion, lorsque on donne un temps de nutrition pour une tique prenant un repas sanguin, il faut considérer cette valeur comme une valeur maximale, puisque certaines tiques peuvent ne pas s'être fixées immédiatement sur la souris après la mise dans la capsule (cf 2.3.1.1). On aimerait aussi spécifier que lorsqu'on parle d'infection systémique ou disséminée chez la souris, on entend que l'infection a pu s'établir et se déplacer du lieu d'injection, par exemple de niveau de la peau du dos au niveau de la peau d'oreille. Ces termes n'ont donc pas été utilisés pour affirmer que l'infection avait atteint les organes internes de la souris. En ce qui concerne les tiques on parle d'infection systémique lorsque l'infection est présente simultanément dans l'intestin et dans d'autres organes.

3.1 Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks.

Crippa Mara, Rais Olivier and Gern Lise

Publié dans: Vector borne and zoonotic diseases, 2002, Vol. 2 (1), pag:3-9.

3.1.1 Abstract:

Borrelia burgdorferi sensu lato (sl), the agent of Lyme disease, is transmitted to the host during the blood meal of *Ixodes* ticks. In most unfed ticks, spirochetes are present in the midgut and migrate during blood feeding to the salivary glands from which they are transmitted to the host via saliva. In the present study, the efficiency of *I. ricinus* ticks to transmit *B. afzelii* and *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) and their infectivity for mice were examined in relation to the duration of the blood meal. In addition, we investigated whether these two *Borrelia* species can penetrate intact skin.

Three modes of infection of mice were studied: tick-bite infection, inoculation of tick homogenates and transcutaneous infection by topical application of tick homogenates on mouse skin. The success of transmission of *B. burgdorferi* sl from *I. ricinus* nymphs to mouse increased with duration of tick attachment. *B. afzelii* infected ticks start to transmit infection earlier (≤ 48 h) than *B. burgdorferi* ss infected ticks. As previously shown for *B. burgdorferi* ss in *I. scapularis*, *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* in unfed *I. ricinus* were non infectious for mice when tick homogenates were inoculated. However the inoculation of homogenates of ticks fed for 24h readily produced infection in mice. So *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* spirochetes are potentially infectious in the tick before natural transmission can occur. Concerning the infection by transcutaneous transmission, none of the mice (n=33) became infected, when tick homogenates were applied on mouse skin, showing that *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* are unable to penetrate intact skin, in contrast to relapsing fever spirochetes.

In this study, it was shown that *B. afzelii* is transmitted by *I. ricinus* to the host earlier than *B. burgdorferi* ss and that *I. ricinus* seems to be a more efficient vector of *B. afzelii* than *B. burgdorferi* ss.

3.1.2 Introduction:

Borrelia burgdorferi sensu lato (sl), the agent of Lyme disease, is transmitted to the host via infected saliva during the blood meal of *Ixodes* ticks. In most unfed ticks spirochetes are present in the midgut and migrate during blood feeding to the salivary glands from which they are transmitted to the host via saliva (Ribeiro et al. 1987, Zung et al. 1989, Gern et al. 1990, de Silva et al. 1995, Gern et al. 1996, Schwan and Piesman 2000).

Borrelia transmission does not occur at the beginning of the blood uptake but later. In fact, the transmission efficiency increases with the duration of the blood meal, as described for the North American vector *I. scapularis* infected with *B. burgdorferi* sensu stricto (ss). Nymphal ticks must be attached to the host for at least 24h before transmission of *B. burgdorferi* ss starts and a high level of transmission is reached after 48h of attachment or later (Piesman et al. 1987, Piesman 1993, Ohnishi et al. 2001; des Vignes et al. 2001). Similarly, the transmission efficiency increases in relation to the duration of the blood meal in the European vector *I. ricinus* (Kahl et al. 1998). However, an early transmission with high efficiency was described for *I. ricinus*: 50% of animals were infected by *B. burgdorferi* sl after 16.7h of tick attachment (Kahl et al. 1998). The observations of high infection rates in salivary glands of unfed *I. ricinus* collected in Switzerland suggested that systemically infected ticks can transmit *Borrelia* early after attachment to hosts (Leuba-Garcia et al. 1994, Lebet and Gern 1994). In contrast, systemic infections are rare in *I. scapularis* (Burgdorfer et al. 1989). All these observations seem to indicate that the transmission dynamics of the various *Borrelia* species might be different in *I. ricinus* compared to *B. burgdorferi* ss in *I. scapularis*.

Not only the efficiency of *Borrelia* transmission but also the *Borrelia* infectivity are influenced by the tick blood meal (Piesman 1993, Ohnishi et al. 2001). Piesman (1993) reported that *Borrelia* in the midgut of unfed ticks are non infectious. Host infection could not occur when unfed nymphal *I. scapularis* infected with *B. burgdorferi* ss (JD1 strain) were homogenized and injected intradermally into mice. Host infection was detected only if the inoculated ground nymphs had previously been attached to a host for at least 24h. It is not known if other pathogenic *Borrelia* species infecting *I. ricinus* are also non infectious for the vertebrate host before the beginning of blood feeding.

Among the genus *Borrelia*, additional modes of transmission than the salivary route have been described. *B. duttoni*, the agent of African relapsing fever, is transmitted via saliva but also via coxal fluid by the soft tick *Ornithodoros moubata*, and *B. recurrentis*, the agent of louse borne relapsing fever, is transmitted by contamination of the bite wound with infectious hemolymph of *Pediculus humanus humanus* lice (Felsenfeld 1971). Moreover, in addition to these modes of transmission, *B. duttoni* and *B. recurrentis* are able to establish an infection in a host by active passage through intact skin (Burgdorfer 1976). Today, it remains unknown if *B. burgdorferi* sl is able to penetrate intact skin. If so, the removal of ticks by naked hands could represent a risk of *Borrelia* transmission to human.

In the present study, the transmission efficiency and the infectivity of *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss were examined in *I. ricinus* in relation to the duration of the blood meal. In addition, we investigated whether these two *Borrelia* species can penetrate intact skin.

3.1.3 Materials and Methods:

Mice, *Borrelia*, and ticks: AKR/N mice from a breeding colony maintained at the Institute of Zoology in Neuchâtel (Switzerland) were used in this study.

Four *Borrelia* isolates were used: *B. burgdorferi* ss ZS7 isolated from a female tick collected in the Freiburg area (Germany) (Schaible et al. 1989), *B. burgdorferi* ss NE1849 isolated from a female tick collected in the Neuchâtel area (Switzerland), *B. afzelii* NE496 obtained from the midgut of a free-living *I. ricinus* adult collected in Aarberg (Switzerland) (Leuba-Garcia et al. 1998) and *B. afzelii* NE2963 isolated from a biopsy of a Balb/c mouse infected by *I. ricinus* nymphs collected in Neuchâtel (Switzerland). Isolates were typed with a restriction fragment length polymorphism on the PCR product according to Postic et al. (1994). Briefly, 4 ml of culture medium were centrifuged and washed two times, then the pellet was suspended in 50 µl of ultrafiltered water. After incubation at 100°C for 10 min the thermolysates were stored at -20°C until use for PCR reaction. Primers used to amplify the variable spacer region between two repeated genes encoding for ribosomal 23S and 5S were: primer 1 (5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3') and primer 2 (5'-TCCTAGGCATTACCATA-3'). Ten µl of each sample were added to 40 µl of PCR mix containing 23.7 µl H₂O nanopure, 5 µl of 10X Taq buffer, 5 µl of primer 1 (5 pmoles), 5 µl of primer 2 (5 pmoles), 1 µl of dNTP (200 µM) and 0.3 µl of Taq (1.5 U). Each amplification reaction was carried out for 35 cycles. Denaturation was performed for 1 min at 95°C, annealing at 50°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. PCR products were first digested with *Mse*I restriction endonuclease for 2h at 37°C, and then electrophoresed in a 16% acrylamide gel for 1h30 at 120V. Digested DNA was stained with ethidium bromide.

To obtain infected nymphs, larvae from a laboratory colony free of *B. burgdorferi* sl and maintained at the Institute of Zoology of Neuchâtel were allowed to feed on mice infected with either isolates (NE1849 and ZS7) of *B. burgdorferi* ss or isolates (NE2963 and NE496) of *B. afzelii*. Replete larvae were maintained at room temperature and 95% relative humidity until they moulted. The infection rates in nymphs were evaluated using immunofluorescence, as previously described (Gern et al. 1997b). Tick infection rates reached 70% for *B. burgdorferi* ss ZS7, 60% for *B. burgdorferi* ss NE1849, 80% for *B. afzelii* NE496 and 60% for *B. afzelii* NE2963.

Infection of mice: Three modes of infection of AKR/N mice were considered in this study:

a) *Tick-bite infection:* The back of AKR/N mice was sheared and a hollow plastic cap (15 mm in diameter) was glued with wax (Mbow et al. 1994). Six infected *I. ricinus* nymphs/mouse were placed on each mouse inside the plastic cap and allowed to feed for determined intervals: 24h, 48h, 72h and 96h. Ticks collected from each mouse were ground as described below and used to infect additional mice.

b) *Needle inoculation of tick homogenates*: Unfed ticks and ticks fed for 24h, 48h, 72h and 96h (max. 5 nymphs/mouse) were separately ground in 250 µl BSK-H medium. These homogenates were used to infect AKR/N mice either by needle inoculation or by transcutaneous infection after topical application on intact skin.

For needle infection, each AKR/N mouse was inoculated intradermally with 60 µl of tick homogenate.

c) *Transcutaneous infection*: To test transcutaneous infection, the back of mice was sheared and 60 µl of the infected tick homogenate was applied on the intact skin for approximately 15 minutes. Mice were exposed to homogenates of ticks infected by *B. burgdorferi* ss ZS7, *B. burgdorferi* ss NE1849, *B. afzelii* NE496 and *B. afzelii* NE2963; only unfed ticks and ticks fed for 48h and 96h were used.

Before any infection, mice were anaesthetised by intramuscular injection of 0.03 ml of a mixture of 0.5:0.8 of Narketan® (Chassot AG, Bern, Switzerland) and Xylasol® (Gräub AG, Bern, Switzerland), respectively.

To examine *Borrelia* infection in mice, ear biopsies were taken at day 30 and 60 after infection. Ear biopsies were obtained from anaesthetised mice using little scissors after cleaning the skin with 70% ethanol. Skin samples were placed into 4 ml tubes containing BSK-H supplemented medium according to Sinsky and Piesman (1989), and incubated at 34°C to allow isolation of *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii*. Cultures were screened for the presence of spirochetes by dark-field microscopy after 10 days and 4 weeks of incubation.

BSK medium containing ear biopsies was screened using the PCR protocol described by Postic et al. (1994) to detect *Borrelia* DNA as described above. Mice were considered as infected when spirochetes were isolated from ear biopsies or when *Borrelia* DNA was detected by PCR in culture fluid containing ear biopsies.

Statistics were made using the Fisher's exact test with the R program (version 0.90.0) on a Linux machine.

3.1.4 Results:

a) *Mice infection through tick bite*: All mice exposed to the bite of *B. burgdorferi* ss infected ticks for 24h and 48h (n=18) remained uninfected (Table 1). In contrast, 1/7 (14%) and 4/8 (50%) mice exposed for the same time periods to *B. afzelii* infected ticks became infected. The difference of transmission between the two species is statistically significant for ticks attached for 48h and less (0/18 and 5/15 (33%), respectively, Fisher's test p=0.01). The transmission risk increased with the duration of tick attachment (Table 1). When mice were exposed to ticks for 72h and longer, 4/9 (44%) and 7/9 (78%) mice exposed to *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* infected ticks, respectively acquired infection (Table 1). The difference of transmission between the two species is no more significant for ticks attached for 72h and more (Fisher's test p=0.33).

b) *Mice infection through inoculation of tick homogenates*: All mice (n=15) inoculated with homogenates of unfed nymphs infected with *B. burgdorferi* ss or *B. afzelii* remained uninfected (Table 1). Among mice inoculated with homogenates of *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* infected ticks fed for 48h and less, 10/20 (50%) and 15/20 (75%) respectively, became infected. This is not statistically

different ($p=0.19$). Inoculation of homogenates of *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* infected ticks fed for 24h already induced infection in mice: 6/9 (67%) and 5/9 (56%), respectively. When *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* infected ticks fed for 72h and more were homogenized and injected into mice, 11/12 (92%) and 10/12 (83%) mice, respectively, became infected (Table 1).

Comparison of infection success by tick bite and tick homogenate inoculation during the second part of the blood meal (72h and 96h) when tick bite transmission is known to be the highest (Piesman 1993, Ohnishi et al. 2001, des Vignes et al. 2001, Kahl et al. 1998) showed that there is a difference between *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii*. Success of transmission of *B. burgdorferi* ss by *I. ricinus* was significantly lower via natural tick bite transmission ($n=4/9$) than via homogenate inoculation ($n=11/12$) (Table 1) (Fisher's test $p=0.046$), and this is not the case for *B. afzelii*. In fact, success of transmission via tick bite ($n=7/9$) and via homogenate inoculation ($n=10/12$) was not statistically different for *B. afzelii* (Table 1) (Fisher's test $p=1$). The same phenomenon was observed for each *B. burgdorferi* ss isolate (NE1849 and ZS7) and for each *B. afzelii* isolate (NE496 and NE2963) (data not shown).

c) *Mice infection via topical application of tick homogenate*: The topical application of homogenates of tick infected with *B. burgdorferi* ss (ZS7: 9 mice; NE1849: 9 mice) and *B. afzelii* (NE496: 9 mice; NE2963: 6 mice) on the intact skin of mice did not produce any infection in mice, whether ticks were fed or not.

	Infection rate at given feeding interval by genospecies									
	0h		24h		48h		72h		96h	
	Bb	Ba	Bb	Ba	Bb	Ba	Bb	Ba	Bb	Ba
Naturally infected mice	nd	nd	0/10	1/7	0/8	4/8	2/4	5/5	2/5	2/4
Injected mice	0/7	0/8	6/9	5/9	4/11	10/11	4/4	5/5	7/8	5/7

Table 1 : Infection rates of mice infected by tick bite and by inoculation of tick homogenates.

AKR/N mice were infected by different modes: tick bite or inoculation of tick homogenates. Ticks infected with *B. burgdorferi* (Bb) or *B. afzelii* (Ba), were permitted to feed on mice for 24h, 48h, 72h or 96h. These ticks as well as unfed infected ticks were subsequently homogenised and injected into other mice. Infection in mice was monitored by cultivation of ear biopsy and PCR amplification.

3.1.5 Discussion:

It is now well documented that *B. burgdorferi* sl is transmitted via saliva during the blood meal, and that dissemination from the midgut to the salivary glands is necessary for efficient transmission to the host (Ribeiro et al. 1987, Zung et al. 1989, Gern et al. 1990, 1996, de Silva et al. 1995, Schwan and Piesman 2000). We investigated the mode and dynamics of transmission and infectivity of two species of *Borrelia* in *I. ricinus*. *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* infected ticks were used because ticks infected by these 2 species are easy to obtain from laboratory infected mice which is not the case for *B. garinii*

(Fikrig et al. 1995, Gern et al. 1997a, Dolan et al. 1998, Hu et al. 2001). The experiments were carried out with two different isolates of *B. burgdorferi* ss and two of *B. afzelii*.

We observed that the success of transmission of *B. burgdorferi* sl from *I. ricinus* to mice increased with duration of attachment. This confirms previous results with *I. scapularis* (Piesman 1993, Ohnishi et al. 2001, des Vignes et al. 2001) and *I. ricinus* (Kahl et al. 1998). However, we observed an earlier transmission by *I. ricinus* ticks infected by *B. afzelii* than by *B. burgdorferi* ss. In fact, during the first 48h of attachment, *B. burgdorferi* ss infected ticks did not infect the 18 exposed mice whereas *B. afzelii* infected ticks transmitted infection to 33% of mice (5/15). So the observations of *B. burgdorferi* ss in *I. ricinus* ticks are similar to what observed for *B. burgdorferi* ss in *I. scapularis* (Piesman 1993, des Vignes et al. 2001, Ohnishi et al. 2001), while *B. afzelii* infected ticks showed a different dynamic of transmission to the host. Different hypothesis could explain this earlier transmission of *B. afzelii*. First, we can hypothesized that *B. afzelii* infected ticks had a systemic infection. In *I. ricinus*, high salivary gland infection rates by *B. burgdorferi* sl have been observed in unfed ticks (Leuba-Garcia et al. 1994, Lebet and Gern 1994) whereas in *I. scapularis*, systemic infections by *B. burgdorferi* ss are rare (Burgdorfer and Hayes 1989). Although *Borrelia* species responsible for systemic infection in *I. ricinus* have never been identified, our results suggest that very invasive *B. afzelii* may be responsible for a more frequent systemic infection in unfed ticks. A second explanation to the different dynamics of transmission observed at the beginning of tick attachment between *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* infected ticks might be related to different strategies used by spirochetes once in the host skin. Shih et al. (1992, 1993) and Gern and Rais (1996) reported that *B. burgdorferi* ss remains at the tick bite site and disseminate later. Moreover Ohnishi et al. (2001) described the presence of *B. burgdorferi* ss in the skin attached to the rostrum of ticks that had been removed from the host. We suggest that, when ticks are removed at the beginning of the blood meal, when the number of *B. burgdorferi* ss transmitted by the tick is still low in the host skin (Ohnishi et al. 2001), the few transmitted spirochetes are removed with the skin attached to the tick mouthparts. This removal of spirochetes would prevent the establishment of *B. burgdorferi* ss infection in mice. In contrast, *B. afzelii*, which is often associated with dermatological manifestations, might disseminate in the host skin more rapidly from the tick bite site. When *B. afzelii* infected ticks are removed during the first 48h of attachment, a part of the spirochetes could have already been able to migrate in the skin and establish the infection in mice.

Looking at detailed results obtained with the 4 different isolates (data not shown), we observed that the success of tick transmission to the host appears to be more isolate-dependent than species-dependent. In fact, *B. afzelii* (NE496) infected ticks transmitted *Borrelia* more efficiently, infecting 100% of mice when attached for 72h and more, than ticks infected by the 2 *B. burgdorferi* ss (ZS7 and NE1849) and the other *B. afzelii* (NE2963) isolates, which transmitted *Borrelia* to only 40-50% of mice. Fingerle et al. (2001) demonstrated that in *B. afzelii* and *B. garinii* capillary infected *I. ricinus*, the velocity of dissemination of spirochetes in the tick organs varies among isolates. This fact can explain the difference in success of tick transmission observed in our study between the two *B. afzelii* isolates. Looking at results of mice infection via inoculation of homogenates of ticks, we observed that *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* in unfed *I. ricinus* are non infectious. Host infection was detected only if the inoculated ground *I. ricinus* had previously been attached to a host for 24h, this confirms previous

observations obtained with *B. burgdorferi* ss and *I. scapularis* (Piesman 1993), although infectivity of inoculated spirochetes was higher in our study reaching 67% for *B. burgdorferi* ss. This means that *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* spirochetes are infectious in the tick before natural transmission occurs. Interestingly, Piesman (1995) showed that inoculation of homogenised salivary glands produced infection in mice only if *B. burgdorferi* ss ticks had previously engorged for 60h. This suggests that spirochetes become infectious in the tick before reaching the salivary glands. In our work, the localisation of the spirochetes in the ticks is not known since the entire ticks were injected to mice.

At the end of the blood meal, when tick transmission is known to be the highest (Piesman 1993, Ohnishi et al. 2001, des Vignes et al. 2001, Kahl et al. 1998), *B. burgdorferi* ss infected ticks showed a lower infection success in mice than the same ticks injected into mice. That means that *B. burgdorferi* ss spirochetes are very infective in the tick, but that they are not transmitted with the same efficacy via *I. ricinus* bite. This is not the case for *B. afzelii*. In addition, *B. burgdorferi* ss is transmitted only after 48h of tick attachment, whereas *B. afzelii* is transmitted earlier. All this together suggests that *I. ricinus* is a more efficient vector for *B. afzelii* than for *B. burgdorferi* ss.

An additional aim of this study was to investigate if *B. burgdorferi* sl can penetrate intact skin. Usually, various methods are used to remove *I. ricinus* ticks (Kahl et al. 1998). Although tweezers are frequently used, some individual removes attached ticks with naked hands. Up to now it was unknown whether this was a risk for acquiring Lyme disease spirochetes. Although it is well known that *B. burgdorferi* sl is transmitted via saliva (Piesman et al. 1987), other *Borrelia* species, like *B. duttoni* and *B. recurrentis*, the agents of African relapsing fever and louse borne relapsing fever, respectively, are able to infect vertebrates by active penetration through intact skin (Burgdorfer, 1976). In this study, we observed that homogenates of ticks infected by *B. afzelii* (NE2963, NE496) or *B. burgdorferi* ss (ZS7, NE1849) applied on mouse skin, never infected mice. *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* appear not to be able to penetrate intact skin. However whether the other *Borrelia* species belonging to the *B. burgdorferi* sl complex are able to cross intact skin remains to be tested. We conclude that tick bite is a prerequisite for transmission of *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii*.

3.1.6 Acknowledgements:

We warmly thank Pierre-François Humair for critical reading of a previous version of the manuscript, Emmanuelle Medjitna and Yves Cheminade for technical assistance and Jean-Luc Perret for statistics. This paper is part of the PhD thesis of Mara Crippa.

3.1.7 References:

- Burgdorfer, W. The epidemiology of the relapsing fevers. In: Johnson, RC, ed. *The Biology of Parasitic Spirochetes*, New York: Academic Press; 1976:191-234.
- Burgdorfer, W, Hayes, SF. Vector-spirochete relationships in louse-borne and tick-borne borrelioses with emphasis on Lyme disease. *Adv Dis Vector Res* 1989; 6:127-150.
- de Silva, AM, Fikrig, E. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53(4):397-404.

- des Vignes, F, Piesman, J, Heffernan, R, Schulze, TL, et al. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. J Infect Dis 2001; 183:773-778.
- Dolan, MC, Piesman, J, Mbow, ML, Maupin, GO, et al. Vector competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for three genospecies of *Borrelia burgdorferi*. J Med Entomol 1998; 35:465-470.
- Felsenfeld, O. Human borreliosis. In: *Borrelia. Strains, vectors, human and animal borreliosis*. Green, WH, ed. St. Louis : Warren H. Green ; 1971:3-98.
- Fikrig, E, Telford, SR, Wallich, R, Chen, M, et al. Vaccination against Lyme disease caused by diverse *Borrelia burgdorferi*. J Exp Med 1995; 181(1):215-221.
- Fingerle, V, Rauser, S, Hammer, B, Kahl, O, et al. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different european *Borrelia burgdorferi* s.l. strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. J Clinical Microbiol In press.
- Gern, L, Rais, O. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1996; 33:189-192.
- Gern, L, Zhu, Z, Aeschlimann, A. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. Annls Parasitol Hum Comp 1990; 65:89-93.
- Gern, L, Lebet, N, Moret, J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. Exp Appl Acarol 1996; 20:649-658.
- Gern, L, Hu, CM, Voet, P, Hauser, P, et al. Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against *Ixodes ricinus* tick bites infected by *Borrelia burgdorferi* ss, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*. Vaccine 1997a; 15:1551-1557.
- Gern, L, Rouvinez, E, Toutoungi, LN, Godfroid, E. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. Folia Parasitol 1997b; 44:309-314.
- Hu, CM, Wilske, B, Fingerle, V, Lobet, et al. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. J Clin Microbiol 2001; 39:1169-1171.
- Kahl, O, Janetzki-Mittmann, C, Gray, JS, Jonas, Ret al. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. Zentbl Bakt 1998; 287:41-52.
- Lebet, N, Gern, L. Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. Exp Appl Acarol 1994; 18:177-183.
- Leuba-Garcia, S, Kramer, MD, Wallich, R. Gern, L. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1994; 280:468-475.
- Leuba-Garcia, S, Martinez, R, Gern, L. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and the skin of mice. Zentbl Bakt 1998; 287:475-484.
- Mbow, ML, Christe, M, Rutti, B, Brossard M. Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in Balb/c mice developing cutaneous reactions. J Parasitol 1994; 80: 81-87.
- Ohnishi, J, Piesman, J, de Silva, AM. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi*

- populations transmitted by ticks. PNAS 2001; 98:670-675.
- Piesman, J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. J Infect Dis 1993; 167:1082-1085.
- Piesman, J. Dispersal of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to salivary glands of feeding nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1995; 32:519-521.
- Piesman, J, Mather, TN, Sinsky, RJ, Spielman A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. J Clin Microbiol 1987; 23:557-558.
- Postic, D, Assous, MV, Grimont, PAD, Baranton, G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. Int J Syst Bacteriol 1994; 44:743-752.
- Ribeiro, JMC, Mather, TN, Piesman, J, Spielman, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1987; 24:201-205.
- Schaible, UE, Kramer, MD, Musetenau, C, Zimmer, G, et al. The severe combined immunodeficiency (scid) mouse: a laboratory model for the analysis of Lyme arthritis and carditis. J Exp Med 1989; 170:1427-1432.
- Schwan, TG, Piesman, J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. J Clin Microbiol 2000; 38:382-388.
- Shih, CM, Pollack, RJ, Telford, SR, Spielman, A. Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice. J Infect Dis 1992; 166:827-831.
- Shih, CM, Telford, SR, Pollack, RJ, Spielman, A. Rapid dissemination by the agent of Lyme disease in hosts that permit fulminating infection. Infect Immun 1993; 61:2396-2399.
- Sinsky, RJ, Piesman, J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. J Clin Microbiol 1989; 27:1723-1727.
- Zung, JL, Lewengrub, S, Rudzinska, MA, Spielman, A, et al. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. Can J Zool 1989; 67:1737-1748.

3.2 Etude sur les facteurs pouvant stimuler l'infectiosité des spirochètes

Dans les tiques infectées à jeun, les spirochètes ne sont pas infectieux. En effet Piesman [1993] n'arriva pas à obtenir une infection dans les souris quand celles-ci avaient été injectées par un broyat d'*I. scapularis* à jeun infectées par *B. burgdorferi* ss. Comme nous venons de le voir (cf 3.1), nous avons obtenu le même résultat avec des nymphes *I. ricinus* infectées par *B. afzelii* ou *B. burgdorferi* ss. Le broyat de tiques infectées, est devenu infectieux pour les souris, seulement 24h après que les nymphes aient commencé leur repas sanguin. Ces 24h de fixation n'ont pas été suffisantes, dans la majeure partie des cas, pour que les nymphes puissent transmettre l'infection aux souris d'une façon naturelle. Ceci nous a indiqué que les spirochètes acquièrent un pouvoir infectieux dans la tique

durant les premières 24 heures de repas sanguin et avant que la tique ne les transmette à l'hôte via la salive.

Dans le but de rechercher le ou les facteurs stimulants l'infectiosité des spirochètes à l'intérieur de la tique une nouvelle expérience a été effectuée.

3.2.1 Mode opératoire.

Des nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) et *B. afzelii* (NE 2961) et des souris AKR/N ont été utilisées. Les tiques infectées ont été partagées en plusieurs groupes et ont subi différents traitements avant d'être broyées et injectées à des souris :

Groupe 1 : Les tiques à jeun ont été nourries par capillaire (cf. 2.3.1.3), mais avec du milieu de culture BSK-H sans borrelies.

Groupe 2 : Les tiques à jeun de ce groupe ont été nourries par capillaire avec du sérum de souris AKR/N.

Groupe 3 : Dans ce groupe les tiques à jeun ont été nourries par capillaire avec du liquide physiologique TC199 (Sigma-Aldrich, Suisse).

Groupe 4 : Des tiques à jeun ont été maintenues à différentes températures pendant des laps de temps contrôlés. Pour ce faire, les tiques à jeun ont été placées dans un tube contenant une solution saturée de K_2SO_4 ou tout simplement de l'eau, pour maintenir une humidité saturée à l'intérieur.

Groupe 5 : Les tiques à jeun ont été broyées et mises en culture (cf. 2.3.2.1) dans un petit tube gardé en incubation à 34°C pendant 24h.

Groupe 6 : En guise de contrôle positif, les tiques ont été nourries 24h sur une souris.

Groupe 7 : Dans ce groupe des nymphes à jeun infectées ont été utilisées tel quel.

Les nymphes des groupes 1, 2 et 3 ont été broyées 24h après leur nutrition par capillaires. Les nymphes du groupe 4 ainsi que celles faisant partie des groupes 6 et 7 ont été directement broyées, sauf certaines tiques infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) et des tiques infectées par *B. afzelii* (NE2961) faisant partie du groupe 4, qui ont été maintenues encore 24h ou 48h à température ambiante avant d'être broyées. Dans tous les groupes sauf le 5, les tiques ont été broyées dans du milieu de culture BSK-H (30 µl par nymphe) et environ 70 µl de ce broyat ont été injectés dans des souris (5 nymphes/souris) par voie sous-cutanée (cf. 2.4.1.2). En ce qui concerne le groupe 5, 500µl de BSK-H contenant les tiques broyées ont été injectés par voie sous-cutanée à des souris.

Pour contrôler l'infection des souris, des biopsies de peau ont été effectuées sur toutes les souris de l'expérience et les cultures ont ensuite été observées au microscope à fond noir pour détecter les borrelies (cf. 2.2). Les cultures négatives après un mois d'incubation ont été analysées par PCR (cf. 2.5).

3.2.2 Résultats

3.2.2.1 Tiques infectées par *B. burgdorferi* ss

Les spirochètes présents dans les tiques à jeun, broyées et injectées à des souris n'ont provoqué une infection systémique chez les souris que lorsque les tiques avaient subi un traitement bien spécifique (Tableau 3-1).

L'injection de broyat de nymphes nourries par capillaire avec du BSK-H (groupe 1) n'a pas induit d'infection chez les souris (0/2). Par contre l'injection de broyats de nymphes nourries avec du sérum (groupe 2) ou du liquide physiologique (groupe 3), a permis le développement d'une infection systémique chez 1/2 souris (50%) et 1/1 souris (100%) respectivement.

Dans le groupe 4 (souris auxquelles a été injecté du broyat de nymphes à jeun gardées pendant différents temps à des températures d'incubation données), seules les souris ayant reçu un inoculat de tiques gardées 24h à 37°C et broyées immédiatement (5/8, 62.5%) ou de tiques gardées 24h à 37°C et gardées 48h à température ambiante (1/3, 33%) ont développé une infection systémique. L'incubation des tiques à des températures et durant des temps différents, n'a jamais permis aux spirochètes de devenir infectieux.

Dans le groupe 5, les souris ont été inoculées avec des nymphes mises en culture pendant 24h et toutes ces souris ont développé une infection systémique (2/2, 100%).

Les résultats obtenus chez les souris des groupes 6 et 7, confirment les résultats obtenus auparavant (cf. 3.1) soit que les spirochètes dans les tiques à jeun sont non infectieux et le deviennent lorsque la tique se nourrit pendant 24h. La souris ayant servi d'hôte aux tiques nourries pendant 24h n'était pas infectée, montrant qu'aucune transmission naturelle n'était intervenue durant cette période.

Groupe	Injection	Traitement	souris infectées*/total
Groupe 1	broyat	N capillaire BSK/H	0/2
Groupe 2	broyat	N capillaire SERUM	1/2
Groupe 3	broyat	N capillaire TC199	1/1
Groupe 4	broyat	N jeun 12h à 27°C	0/3
		N jeun 24h à 27°C	0/3
		N jeun 12h à 33°C	0/3
		N jeun 6h à 37°C	0/3
		N jeun 12h à 37°C	0/3
		N jeun 24h à 37°C	5/8
		N jeun 24h à 37°C + 24h à TA	0/3
		N jeun 24h à 37°C + 48h à TA	1/3
Groupe 5	culture	24h à 34°C avec broyat N jeun	2/2
Groupe 6	broyat	N 24h sur souris	2/2
Groupe 7	broyat	N jeun	0/4

Tableau 3-1: Différents traitements des tiques infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) broyées et injectées à des souris et nombre de souris infectées par biopsie d'oreille pour chaque groupe.

* : infection détectée par mise en culture de biopsies d'oreille.

En parallèle, nous avons aussi étudié l'expression des protéines de surface OspA et OspC chez les spirochètes se trouvant dans les nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) à jeun gardées à température ambiante et celles gardées 24h à 37°C. Après avoir testé le bon fonctionnement du triple marquage sur une culture de *B. burgdorferi* ss (ZS7) lavée et fixée sur une lame pour l'immunofluorescence (Figures 6-1, 6-2, 6-3 : Annexe 4), nous avons pris 5 nymphes incubées à 37°C et 5 nymphes gardées à température ambiante et nous les avons étalées sur des lames.

Les lames ont ensuite été traitées pour un triple marquage (cf. 2.8.2), et observées au moyen d'un microscope à épifluorescence pour détecter la présence des spirochètes. Dans les deux groupes de nymphes 4/5 tiques étaient infectées. Les tiques infectées ont été observées également au microscope confocal pour déterminer si les protéines OspA et/ou OspC étaient exprimées par les spirochètes. Aucune différence n'a été observée entre les nymphes à température ambiante et celles gardées 24h à 37°C. En effet dans les deux cas, la quasi totalité des spirochètes exprimaient l'OspA, alors qu'aucun n'exprimait l'OspC (Figures 6-4, 6-5, 6-6 : Annexe 5). On a pu observer la présence de quelques spirochètes n'exprimant ni l'une ni l'autre des deux protéines de surface (Figures 6-7, 6-8, 6-9 : Annexe 6).

Donc en résumé, les spirochètes *B. burgdorferi* ss (ZS7), non infectieux dans les nymphes à jeun, le deviennent si la nymphe s'est nourrie pendant 24h et aussi si la nymphe a été nourrie par capillaire avec du sérum de souris ou du liquide physiologique. De plus la simple incubation des tiques à au moins 37°C pendant au moins 24h est un facteur induisant l'infectiosité des spirochètes dans les tiques. L'expression de l'OspA et de l'OspC par les spirochètes n'est pas différente chez les nymphes gardées à température ambiante ou à 37°C.

3.2.2.2 Tiques infectées par *B. afzelii*.

Dans le cas de tiques infectées par *B. afzelii* (NE2961) (Tableau 3-2), comme cela a été le cas pour les tiques infectées par *B. burgdorferi* ss, les spirochètes dans les tiques à jeun (groupe 7) ne sont pas infectieux. Ici aussi il faut que les tiques se nourrissent pendant 24h (groupe 6) pour que les spirochètes deviennent infectieux (2/3 souris, 66.6%).

Dans le cas de tiques infectées par *B. afzelii* l'ingestion de BSK-H, de sérum, de TC199 (groupes 1 à 3) n'a pas induit une infectiosité chez les spirochètes.

Dans le groupe 4 (souris auxquelles a été injecté du broyat de nymphes à jeun gardées pendant différents temps à des températures d'incubation données), seules les souris ayant reçu un inoculat de tiques gardées 24h à 37°C et broyées immédiatement (1/6, 16.6%) ont développé une infection systémique. L'incubation des tiques à des températures et durant des temps différents, n'a jamais permis aux spirochètes de devenir infectieux.

L'analyse par PCR des fluides de culture des 3 souris du groupe 5 (100%) auxquelles a été injecté du milieu de culture contenant des nymphes à jeun broyées et gardé 24h à 34°C, a montré que toutes les souris avaient développé une infection systémique.

Groupe	Injection	Traitement	souris infectées*/total
Groupe 1	broyat	N capillaire BSK/H	0/3
Groupe 2	broyat	N capillaire SERUM	0/3
Groupe 3	broyat	N capillaire TC199	0/3
Groupe 4	broyat	N jeun 12h à 27°C	0/3
		N jeun 12h à 33°C	0/3
		N jeun 6h à 37°C	0/3
		N jeun 12h à 37°C	0/3
		N jeun 24h à 37°C	1**/6
		N jeun 24h à 37°C + 24h à TA	0/3
		N jeun 24h à 37°C + 48h à TA	0/3
Groupe 5	culture	24h à 34°C avec broyat N jeun	3**/3
Groupe 6	broyat	N 24h sur souris	2**/3
Groupe 7	broyat	N jeun	0***/3

Tableau 3-2: Différents traitements des tiques infectées par *B. afzelii* (NE 2961) broyées et injectées à des souris et nombre de souris infectées par biopsie d'oreille pour chaque groupe.

* : infection détectée par mise en culture de biopsies d'oreille

** : détectés par PCR du milieu de culture contenant les biopsies

*** : une forme atypique ressemblant à un spirochète a été observée au microscope au fond noir dans le fluide de culture d'une biopsie effectuée au niveau du dos d'une souris.

En résumé les spirochètes *B. afzelii* (NE2961) dans les nymphes à jeun sont non infectieux et le deviennent si les nymphes se nourrissent pendant 24h. L'administration par capillaire aux nymphes de sérum de souris, de liquide physiologique ou de BSK-H, n'a aucun effet sur l'infectiosité de *B. afzelii*. Par contre l'incubation des nymphes à au moins 37°C pendant au moins 24h est un facteur induisant l'infectiosité des spirochètes se trouvant dans les tiques.

Dans ces deux expériences, nous avons contrôlé l'infectiosité des spirochètes en prélevant une biopsie d'oreille aux souris. La présence de spirochètes dans les oreilles des souris est signe d'une infection systémique chez ces animaux. Nous nous sommes demandé si les spirochètes dans les tiques à jeun étaient effectivement non infectieux ou bien s'ils étaient incapables d'établir une infection systémique, mais capables de produire une infection localisée dans l'hôte au lieu d'injection. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons répété l'expérience des injections de broyats de tiques à jeun infectées par *B. burgdorferi* ss ou *B. afzelii*. Cette fois, pour localiser les spirochètes, nous avons effectué deux biopsies différentes sur chaque animal un mois après l'injection du broyat de nymphes : une au niveau de l'injection du broyat pour voir si l'infection était localisée et une autre au niveau de l'oreille pour voir si l'infection était systémique.

Aucune infection qu'elle soit localisée ou systémique n'a été détectée chez les souris ayant reçu du broyat de nymphes à jeun infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) ou *B. afzelii* (NE2961) (Tableau 3-3),

indiquant que les *Borrelia* dans les tiques à jeun ne sont pas du tout capables d'induire une infection chez la souris.

	Souris infectées/total	
	Biopsie du lieu d'injection	Biopsie d'oreille
N jeun infectées par <i>B. burgdorferi</i> ss	0/3	0/3
N jeun infectées par <i>B. afzelii</i>	0/3	0/3

Tableau 3-3: Infection chez des souris ayant reçu un broyat de nymphes infectées à jeun, détectée par biopsie du lieu d'injection ou d'oreille.

N= nymphes

3.3 Etude sur la dissémination de l'infection chez la souris.

L'agent de la maladie de Lyme ne se disperse pas immédiatement dans la souris après l'inoculation par une tique. En effet, des études ont montré que *B. burgdorferi* ss se multiplie et reste localisé quelques jours (2-3 jours) après le détachement de la tique dans la peau au lieu où la tique *I. scapularis* s'est fixée avant de disséminer dans le corps de la souris [Shih et al 1992, 1993]. Dans un travail sur la transmission par "cofeeding" [Gern and Rais 1996], le site de fixation de nymphes *I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* ss a été stimulé par la fixation de larves. Dans ce travail, l'infection par les spirochètes est restée localisée à l'endroit de la fixation des nymphes et des larves pendant plusieurs jours, ce n'est qu'au 29^{ème} jour de l'expérience qu'une infection systémique a été détectée chez les souris.

Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse que la présence des larves au lieu d'inoculation des borréliés pouvait influencer la dissémination de l'infection chez la souris. Nous avons donc voulu vérifier si une stimulation par piqûre de tiques au lieu d'infection peut retarder le développement de l'infection systémique chez la souris.

3.3.1 Mode opératoire de la première expérience.

Les tiques infectées provenaient de la nature (cf. 2.3.1.1), le taux d'infection de ces tiques était de 50%. Vingt-quatre souris Balb/c ont été réparties en 2 groupes : le groupe 1 a été soumis à une stimulation par larves au site de fixation des nymphes infectées, et le groupe 2 n'a subi aucune stimulation par des larves (schéma1 : Annexe 7).

Groupe 1 : Au jour 0, une capsule a été appliquée sur le dos de chaque souris (cf. 2.4.1.1) et 10 nymphes ont été ajoutées dans chaque capsule. Au jour 5, une stimulation du site d'infection a été effectuée avec **50 larves** déposées directement dans la capsule. Au jour 35, des biopsies du site de fixation des nymphes infectées (dos) et des biopsies d'oreille ont été réalisées (cf. 2.4.2.1). Un mois plus tard, les biopsies de peau du dos et d'oreille ont été répétées.

Groupe 2 : Ce groupe a été manipulé de la même façon que le groupe 1 mais sans stimulation par les larves.

Les cultures des biopsies ont été observées au microscope à fond noir pour détecter la présence de borrelies après 10 jours d'incubation, et pendant un mois.

3.3.2 Résultats de la première expérience.

Lors des premières biopsies (jour 35), parmi les 12 souris du groupe 1, huit souris étaient infectées : sept n'étaient infectées que localement au niveau du dos et une présentait une infection systémique et était infectée au niveau de la tête (Tableau 3-4). Parmi les 12 souris du groupe 2, le nombre de souris infectées était égal au groupe 1, mais parmi ces huit souris 4 étaient infectées seulement localement au niveau du dos et 4 présentaient une infection locale au niveau du dos de même qu'une infection systémique par biopsie d'oreille.

	souris infectées/examinées			
	J35		J65	
	dos	tête	dos	tête
Groupe1	7/12	1/12	0/12	2/12
Groupe2	8/12	4/12	2/12	0/12

Tableau 3-4 : Infection localisée (biopsie du dos) et systémique (biopsie au niveau de la tête) de souris stimulées au lieu d'infection par des larves (groupe 1), et de souris non stimulées (groupe 2). Le détail des résultats se trouve dans le tableau 4A (Annexe 8).

Pour déterminer s'il existe une différence statistique entre les deux groupes au niveau de l'infection systémique, nous avons comparé les nombres de souris présentant une infection systémique au jour 35, dans les 2 groupes (1/12 pour le groupe 1 qui a eu une stimulation par larves et 4/12 pour le groupe 2 qui n'a pas eu d'infestation par larves). La valeur de $p=0.3168$ (Fisher's exact test) ne nous permet pas d'affirmer que l'infection systémique est plus fréquente dans un groupe que dans l'autre.

En ce qui concerne les souris présentant une infection localisée, leur nombre est de 7/12 pour les souris du groupe ayant été stimulé par des larves et de 8/12 pour celles qui n'ont pas été stimulées par des larves au site d'infection, donc là aussi il n'y a aucune différence.

Au jour 65, parmi les souris du groupe 1, 2/12 montraient une infection disséminée au niveau de la tête, alors que plus aucune souris ne montrait d'infection localisée au niveau du dos. Pour le groupe 2 la situation était inverse: 2 souris présentaient une infection localisée et aucune ne présentait une infection systémique. Le peu de résultats positifs pour cette deuxième biopsie nous a amené à croire qu'un problème d'isolement était survenu et ces résultats n'ont pas été pris en considération.

Suite à cette expérience dans laquelle on n'a pas pu observer de différence significative dans l'apparition de l'infection systémique entre les souris qui ont été soumises à une stimulation par larves

au site de fixation des nymphes infectantes et les souris qui n'ont pas subi de stimulation, nous avons entrepris une autre expérience.

3.3.3 Mode opératoire de la deuxième expérience.

Dans ce cas, nous avons utilisé des tiques infectées par une espèce connue : *B. burgdorferi* ss, souche ZS7, et nous avons stimulé le site d'inoculation, soit l'endroit de fixation des nymphes infectées, en y déposant des larves à plusieurs reprises, tous les 3 jours pendant une période prolongée pouvant aller jusqu'à 35 jours selon les groupes. Plusieurs biopsies pour chaque souris ont été faites, déjà à partir du jour 12, et nous nous sommes concentré sur le développement de l'infection systémique en analysant l'infection au niveau de la tête uniquement. De plus, les cultures de biopsie négatives de cette expérience ont été analysées par PCR.

Des souris Balb/c ont été divisées en trois groupes de 7 animaux. Les souris des groupes 1 et 2 ont été soumises à une infestation par larves au site de fixation des nymphes infectantes pendant des laps de temps différents. Les souris du groupe 3 n'ont par contre pas été infestées par des larves (schéma 2 :Annexe 7).

Groupe 1 : 2 capsules (cf. 2.4.1.1) ont été appliquées sur le dos de chaque souris et 7 nymphes ont été déposées à l'intérieur de chaque capsule. Des larves ont été ajoutées dans les capsules quand les nymphes étaient encore fixées et ensuite tous les 3 jours pendant 35 jours.

Groupe 2 : Les souris du groupe 2 ont été traitées comme celles du groupe 1, mais les larves ont été ajoutées dans les capsules tous les 3 jours pendant 21 jours seulement.

Groupe 3 : Les souris du groupe 3, qui nous ont servi de souris contrôle, ont été traitées comme celles du groupe 1, à l'exception du dépôt des larves dans les capsules. En effet ces souris n'ont subi aucune stimulation par larves mais seulement une infection via la piqûre de nymphes.

Pour détecter l'infection systémique chez les souris, une biopsie d'oreille ainsi qu'une xénodiagnose sur la tête ont été effectuées aux jours 12, 21, 36 et 50. Les cultures des biopsies ont été observées au microscope à fond noir pour détecter la présence des spirochètes, les cultures négatives ont été analysées par PCR. La biopsie a été considérée comme infectée par *B. burgdorferi* ss, que le résultat provienne de l'observation au microscope à fond noir ou de la PCR.

3.3.4 Résultats de la deuxième expérience.

Au jour 12 aucune souris n'a montré une infection systémique par *B. burgdorferi* ss (Tableau 3-5). Au jour 21, 2/5 souris du groupe 1 ont montré une infection systémique lors de l'analyse des biopsies d'oreille, 5/5 souris du groupe 2 ont aussi montré que l'infection avait déjà atteint l'oreille, mais aucune des 7 souris du groupe 3 n'a montré d'infection systémique. Ainsi, parmi les 10 souris qui ont eu une infestation par les larves (groupe 1 et 2), 7 souris avaient donc développé une infection systémique alors qu'aucune des 7 souris du groupe 3 n'avait développé d'infection systémique (Tableau 3-5). Cette différence est statistiquement significative (Fisher's exact test, $p=0.0098$). Les souris du groupe

3, qui n'ont pas eu de stimulation par larves, ont développé une infection systémique plus tard, une au jour 36 et une autre au jour 50 donnant 2/7 souris infectées au total. Au jour 36, 1/5 souris du groupe 1 et le même nombre de souris du groupe 2, avaient une biopsie d'oreille positive. Dans le groupe 3 seule 1/7 souris a montré une infection disséminée. Au jour 50, le nombre de souris infectées ayant développé une infection systémique est resté le même, c'est-à-dire 1/5 pour les groupes 1 et 2 et 1/7 pour le groupe 3 (il s'agissait toutefois d'une autre souris que celle infectée au jour 36). Les souris du groupe 2 n'ont plus été stimulées par des larves depuis le jour 21, alors que les souris du groupe 1 ont continué à être stimulées. Malgré cela aucune différence dans le taux d'infection des souris n'a été détectée entre les groupes 1 et 2 après le jour 21, soit aux jours 36 et 50.

Suite au faible nombre de souris infectées observées chez les souris du groupe 3 nous avons vérifié que ces souris avaient été piquées par des tiques infectées. Nous avons analysé par immunofluorescence directe, après la mue en adultes, les nymphes ayant servi à l'infection des 7 souris de ce groupe. Les résultats ont montré que, à l'exception d'une souris (la numéro 20), toutes les souris du groupe 3 ont été infestées par des nymphes infectées (Tableau 3-6). La souris 20 a cependant certainement été en contact avec des tiques infectées, car une infection par biopsie a été détectée au jour 36.

	souris infectées/testés			
	J12	J21	J36	J50
Groupe 1	0/7	2/5	1/5	1/5
Groupe 2	0/7	5/5	1/5	1/5
Groupe 3	0/7	0/7	1/7	1/7

Tableau 3-5 : Infection systémique (biopsie de l'oreille) observée aux jours 12, 21, 36 et 50 pour les souris stimulées par larves au site d'infection pendant 35j (groupe 1), 21j (groupe 2) ou pas infestées par larves (groupe 3). Le détail des résultats se trouve dans le tableau 5A (Annexe 9).

	souris	adultes infectées/ testées
Groupe 3	15	2/7
	16	1/3
	17	2/5
	18	2/4
	19	2/3
	20	0/4
	21	1/3

Tableau 3-6 : Nymphes utilisées pour infecter les souris du groupe 3, observées par IF après la mue en tant qu'adultes.

Si on rassemble les souris qui ont subi une infestation par larves (groupe 1 + groupe 2) on observe que 8/10 souris au total ont développé une infection systémique au cours de l'expérience. Par contre dans le groupe 3 (souris qui n'ont pas eu de stimulation par larves), seules 2/7 souris ont développé une telle infection. La différence dans le taux d'infection entre les souris soumises à une stimulation par larves et les souris non stimulées par des larves n'est pas statistiquement différente (Fisher's exact test, $p = 0.0584$).

Une deuxième approche a été utilisée dans cette expérience pour détecter l'infection systémique chez les souris, il s'agit de la xénodiagnose. Nous avons ainsi testé si les souris avaient transmis des spirochètes aux tiques saines au jour 21 (jour où le plus grand nombre de souris étaient infectées). Toutes les nymphes issues des larves de xénodiagnose nourries sur les souris au jour 21, ont été partiellement étalées sur une lame pour une analyse en immunofluorescence directe et ensuite mises dans un tube contenant du milieu de culture.

Les nymphes de xénodiagnose du jour 21 provenant de 13 souris ont pu être analysées de cette façon : 2 souris du groupe 1 (souris 2 et 3), les 5 souris du groupe 2 et 6 des 7 souris du groupe 3. Parmi ces souris, seules les 5 souris du groupe 2 montraient à ce moment-là une infection au niveau de l'oreille (pour les détails de ces résultats voir le Tableau 5A en annexe). Aucune tique observée en immunofluorescence directe ainsi qu'aucun des 13 tubes de culture correspondants aux 13 souris et qui contenaient un nombre variable entre 2 et 16 nymphes n'a montré de spirochètes, indiquant apparemment une mauvaise transmission des spirochètes *B. burgdorferi* ss (ZS7) des souris aux larves.

En résumé la stimulation par larves du site de fixation des nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) permet une dissémination de l'infection dans la souris plus rapide (jour 21) que quand la stimulation par larves n'a pas lieu. Par contre la stimulation par larves n'a aucun effet à long terme.

3.4 Les spirochètes peuvent-ils traverser la membrane péritrophique de la tique *I. ricinus* ?

Certains organismes pathogènes peuvent traverser la membrane péritrophique produite chez les tiques. Un exemple en est *Babesia microti*, protozoaire parasite des rongeurs sauvages véhiculé par la tique *I. scapularis* et qui peut affecter l'homme. En effet ce parasite arrive à pénétrer la membrane péritrophique de la tique grâce à une organelle spécialisée [Rudzinska et al 1982, 1983]. Zhu [1998a], dans une étude sur la localisation des spirochètes dans des nymphes détachées de leur hôte depuis 15 ou 23 jours, suggère que la membrane péritrophique pourrait être une barrière empêchant les spirochètes de migrer dans d'autres organes de la tique. En effet, cet auteur observe un grand nombre de borrelies à l'intérieur de la lumière intestinale encerclées par la membrane péritrophique.

Nous nous sommes demandé quel rôle cette membrane pouvait jouer sur l'infection des tiques par *B. burgdorferi* si et si les spirochètes étaient capables de traverser la membrane péritrophique. Nous avons essayé de voir si les spirochètes arrivant dans l'intestin d'une nymphe qui a une membrane péritrophique déjà formée, parvenaient à la traverser et à migrer dans d'autres organes de la tique tels que les glandes salivaires.

Deux expériences visant cet objectif ont été exécutées:

3.4.1 Mode opératoire de la première expérience.

Un premier groupe (1A) de nymphes saines ont été nourries sur des souris Balb-C non infectées du jour 0 au jour 2, laps de temps suffisant à la formation de la membrane péritrophique (cf schéma 1A et 1B : Annexe 10). Les souris ont alors été tuées pour provoquer un détachement naturel des nymphes. Les tiques qui ne s'étaient pas détachées d'elles-mêmes ont été retirées à l'aide de brucelles en prenant soin de ne pas leur casser le rostre. Quelques nymphes ont été conservées à cette étape pour confirmer la présence d'une membrane péritrophique au microscope électronique à transmission (TEM) (cf. 2.7). Les autres nymphes détachées au jour 2 ont immédiatement été placées sur 2 souris Balb-C infectées par *B. afzelii* pour terminer leur repas sanguin (drop-off). Pour pouvoir interpréter les résultats obtenus dans le cas des nymphes prenant un repas sanguin avec une membrane péritrophique préformée, il est nécessaire de faire une comparaison avec des nymphes ayant pris un repas sanguin infectieux non interrompu. Pour cette raison un autre groupe (1B) de nymphes saines ont été mises au jour 0 jusqu'à l'engorgement total sur des souris Balb-C infectées par *B. afzelii*.

Dans cette expérience nous avons disséqué les tiques à la fin du repas sanguin et une dizaine de jours après, parce qu'il apparaît qu'une dizaine de jours après la réplétion, il y a un plus grand nombre de spirochètes dans la tique [Piesman et al 1990] [Zhu 1998b].

Les tiques des groupes A et B ont donc été disséquées au drop-off, soit à la fin du repas sanguin et 12 jours après le drop-off (drop-off +12j) pour voir si les spirochètes arrivant dans l'intestin des nymphes ayant une membrane péritrophique déjà formée, parvenaient à la traverser et à migrer dans d'autres organes. Une partie de l'intestin a été utilisée pour une analyse par IFD (cf. 2.3.2.2) pour repérer les nymphes infectées, tandis que tout le reste de la nymphe a été préparé pour une observation *in toto* au TEM (cf. 2.7) dans le but de localiser les spirochètes dans les différents organes des nymphes infectées.

3.4.2 Résultats de la première expérience

Lors de l'analyse des nymphes prélevées de la souris après deux jours de nutrition, nous avons pu confirmer la présence d'une membrane péritrophique (Figure 6-10 : Annexe 11).

Dans le cas des tiques s'étant gorgées en totalité sur une souris infectée (1B), les intestins de 3/10 tiques (30%) observées au stade drop-off et de 3/7 tiques (43%) observées 12 jours après le détachement présentaient des spirochètes dans l'intestin en immunofluorescence directe (Tableau 3-7). Chez les nymphes qui ont pris un repas sanguin infecté alors que la membrane péritrophique

était déjà formée (1A), 2/8 nymphes (25%) au drop-off et 3/5 nymphes (60%) au drop-off + 12j ont montré une infection dans l'intestin par immunofluorescence directe (Tableau 3-7).

Parmi toutes les tiques examinées au TEM quelle que ce soit la manière dont elles ont été infectées ou quel que soit le temps auquel elles ont été examinées aucun spirochète n'a été détecté (Tableau 3-7).

		tiques infectées/analysées	
		Intestin	tique <i>in toto</i>
	groupe	IFD	TEM
DROP-OFF	1A	2/8	0/2
	1B	3/10	0/1
DROP-OFF + 12J	1A	3/5	0/1
	1B	3/7	0/3

Tableau 3-7: Analyse de l'infection chez des tiques ayant une membrane péritrophique préformée et prenant ensuite un repas infectieux (groupe 1A) et de tiques ayant pris un repas infectieux non interrompu (groupe 1B) au drop-off et 12 jours après drop-off. Le détail des résultats se trouve dans le tableau 7A (Annexe 12).

IFD=immunofluorescence directe

TEM= microscope électronique à transmission.

En constatant que le repas sanguin était très mal fixé et mal contrasté, car il était très cassant et apparaissait gris uniforme, nous avons testé d'autres méthodes de fixation et de contrastation, ainsi qu'une autre résine pour le microscope électronique. Ces essais ont été réalisés avec des nymphes gorgées jusqu'au drop-off sur des souris saines.

Deux méthodes de fixations ont été comparées, la fixation Dalton et la fixation uranyl en bloc. La résine Spurr a été changée au profit de la résine LR White, plus hydrophile, mais aucune amélioration substantielle dans la fixation du contenu intestinal n'a été constatée (Figures 6-11 et 6-12 : Annexe 13). Finalement, deux méthodes de contrastation ont été testées: la contrastation à l'acide tannique et la contrastation selon Daddow mais aucune de ces deux techniques n'a donné de résultats concluants.

Au cours de cette première partie de l'expérience, en utilisant la microscopie électronique à transmission, nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence les spirochètes dans les nymphes nourries.

Ceci nous a amené à répéter cette expérience mais nous avons abandonné la technique du microscope électronique pour la détection des spirochètes dans l'intestin des tiques au profit d'autres techniques plus adaptées telles que l'immunofluorescence et la culture.

3.4.3 Mode opératoire de la deuxième expérience.

Les nymphes au drop-off et au drop-off + 10j ont cette fois été disséquées et seuls l'intestin et les glandes salivaires ont été prélevés pour être analysés (schéma 2A et 2B : Annexe 14). Un diverticule de chaque intestin a été utilisé pour une analyse par IFD (cf. 2.3.2.2), mais cette fois, le reste de l'intestin a été mis en culture (cf. 2.3.2.1). Ensuite une glande salivaire a été préparée pour une analyse au microscope confocal (cf. 2.8), pendant que l'autre glande salivaire était préparée pour une observation au microscope électronique (cf. 2.7). L'utilisation du microscope confocal a pour but de détecter la présence des spirochètes au niveau des glandes salivaires et la microscopie électronique est utilisée pour localiser plus précisément les spirochètes dans les cellules des glandes salivaires. On a pris la décision d'observer au microscope électronique les glandes salivaires seulement si l'autre glande salivaire de la tique avait préalablement montré des spirochètes au microscope confocal.

Parmi les nymphes déplacées sur une autre souris après que la membrane péritrophique se soit formée (groupe 2A), 10 ont été disséquées immédiatement après le drop-off et 10 ont été disséquées 10 jours après le drop-off.

3.4.4 Résultats de la deuxième expérience.

L'observation d'un fragment d'intestin des tiques avec une membrane péritrophique préformée (2A) par immunofluorescence directe a permis de détecter qu'aucune nymphe (0/10) au drop-off et 4/10 nymphes (40%) au drop off + 10j étaient infectées (Tableau 3-8). Les résultats de la mise en culture du reste de l'intestin de ces mêmes tiques sont identiques à ceux obtenus par IFD. Par contre l'analyse par PCR de tous les tubes de culture contenant les intestins a permis de trouver de l'ADN de borréliés dans 8/10 échantillons (80%) au drop-off et dans 8/10 échantillons (80%) au drop-off +10 jours.

Parmi les tiques saines ayant pris un repas sanguin complet sur deux souris infectées par *B. afzelii* (2B), 6 nymphes ont été disséquées immédiatement après le drop-off et 6 nymphes ont été disséquées 10 jours après.

L'analyse des intestins par IFD a montré que 4/6 tiques (66%) étaient infectées au stade drop-off et que 2/6 tiques (33%) étaient infectées 10 jours après le détachement.

La mise en culture du reste de l'intestin nous a permis de détecter un nombre plus élevé de tiques infectées. En effet 5/6 nymphes (83%) examinées au drop-off et 5/6 nymphes (83%) examinées au drop-off + 10 jours présentaient des spirochètes.

De plus, l'analyse par PCR de ces tubes de culture, a permis de détecter de l'ADN de *Borrelia* chez une tique négative en IFD et en culture, donnant un résultat pour le stade drop-off + 10j de 6/6 nymphes infectées (100%).

Une glande salivaire de chacune des tiques a été analysée au microscope confocal (groupe 2A et 2B). Chez les nymphes déplacées après formation de la membrane péritrophique (2A) nous avons ainsi analysé 9 tiques au stade drop-off et 9 nymphes au stade drop-off + 10j, aucune des glandes

salivaires n'était infectée. De même, lorsqu'on a observé les glandes salivaires des 6 nymphes au stade drop-off et des 6 nymphes au stade drop-off + 10j chez les tiques nourries entièrement sur une souris infectée, aucun spirochète n'a été mis en évidence dans les glandes salivaires.

		tiques infectées/analysées		
		Intestin		Glandes salivaires
	groupe	IFD	CULTURE (PCR)	CONFOCAL
DROP-OFF	2A	0/10	0/10 (8/10)	0/9
	2B	4/6	5/6 (5/6)	0/9
DROP-OFF + 10J	2A	4/10	4/10 (8/10)	0/6
	2B	2/6	5/6 (6/6)	0/6

Tableau 3-8 : Analyse de l'infection chez des tiques ayant une membrane péritrophique préformée et prenant ensuite un repas infectieux (groupe 2A) et de tiques ayant pris un repas infectieux non interrompu (groupe 2B) au drop-off et 10 jours après drop-off. Le détail des résultats se trouve dans le tableau 8A (Annexe 15)

Ces résultats n'ont pas permis d'observer une différence d'infection dans les glandes salivaires entre les tiques qui ont pris le repas infectieux alors que la membrane péritrophique était déjà formée (2A) et celles qui ont pris le repas infectieux sans préinduction de membrane péritrophique (2B). En effet dans les deux cas aucun spirochète n'a été détecté dans les glandes salivaires.

3.5 Localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin.

L'étude de la dynamique du développement de *B. burgdorferi* si dans la tique, s'inscrit dans le souci de mieux comprendre comment la tique acquiert et transmet les spirochètes, le but à long terme étant de trouver des moyens pour prévenir la transmission des agents de la maladie de Lyme.

Dans les tiques à jeun les spirochètes sont le plus souvent localisés dans l'intestin, pendant le repas sanguin, ces spirochètes migrent jusqu'aux glandes salivaires d'où ils sont transmis à l'hôte via la salive [Ribeiro et al. 1987 ; Zung et al. 1989 ; Gern et al. 1990 ; de Silva and Fikrig 1995 ; Gern et al. 1996 ; Schwan and Piesman 2000]. La dynamique de cette transmission est différente entre les tiques *I. scapularis* [Piesman et al 1987, 1993] et *I. ricinus* [Kahl et al 1998], et nous avons pu observer que même au sein des tiques *I. ricinus* il existe une différence dans la dynamique de transmission si la tique est infectée par *B. burgdorferi* ss ou par *B. afzelii* [Crippa et al 2002] (cf. 3.1). En ce qui concerne les tiques saines qui s'infectent pour la première fois en prenant un repas sur un hôte infecté, aucune étude n'a été entreprise sur la dynamique des spirochètes à l'intérieur de ces tiques en Europe.

Le but de cette partie de notre travail était de déterminer la localisation des spirochètes dans la tique *I. ricinus* au cours du repas sanguin. Cette étude a été poursuivie dans deux cas de figures différents : La localisation des bactéries a été suivie **1)** dans des tiques infectées qui prennent un repas sanguin sain et **2)** dans le cas de tiques saines qui prennent un repas sanguin infectieux.

3.5.1 Mode opératoire.

Dans le cadre de cette expérience nous avons travaillé avec deux espèces de *Borrelia* : *B. afzelii* (NE2961) et *B. burgdorferi* ss (ZS7) et des souris Balb/c.

1) Nymphes infectées prenant un repas sain : Les nymphes analysées sont des nymphes qui se sont infectées par voie naturelle en tant que larves sur une souris infectée par une espèce de *Borrelia* connue et qui prennent un repas sanguin sur une souris Balb/c saine (Annexe 16). Les nymphes infectées ont été mises dans des capsules sur le dos des souris non infectées (cf. 2.4.1.1) et enlevées à différentes heures après le début du repas sanguin pour observer l'emplacement des spirochètes dans les tiques. Les tiques infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) ont été enlevées après 24h, 48h et 72h. Les nymphes infectées par *B. afzelii* (NE2961) ont été enlevées après 8h, 24h, environ 30h et 48h. Les tiques infectées par *B. burgdorferi* ss et celles infectées par *B. afzelii* se sont nourries sur deux groupes de souris différents.

2) Nymphes saines prenant un repas infectieux : Les nymphes analysées sont des nymphes saines qui prennent leur repas infectieux sur une souris Balb/c infectée par une des deux espèces : *B. afzelii* (NE2961) ou *B. burgdorferi* ss (ZS7) (Annexe 17). Ces nymphes ont été mises dans des capsules sur les souris infectées (cf. 2.4.1.1) et enlevées après 24h, 48h et 72h de repas sanguin pour être analysées.

Dans les deux cas les nymphes analysées au cours des expériences ont été analysées par microscopie confocale (cf. 2.8). Les tiques nourries sur les souris jusqu'à 48h ont été analysées avec les organes maintenus *in situ* pour détecter la présence et l'emplacement des spirochètes. Par contre les nymphes nourries pendant 72h sur les souris, ont été préalablement disséquées. L'intestin a été analysé pour la présence des borréliés en culture (cf. 2.3.2.1) et les glandes salivaires ont été observées au microscope confocal (cf. 2.8). Cette différence dans la préparation des tiques nourries pendant 72h est nécessaire car l'épaisseur de la nymphe à ce moment du repas sanguin est trop importante pour une bonne observation au microscope confocal. Pour analyser d'éventuels phénomènes d'autofluorescence, une nymphe infectée par *B. afzelii* enlevée après environ 30h de repas sanguin a été préparée pour une observation au microscope confocal, sans la réaction avec le conjugué fluorescent. L'observation de cette tique nous a permis de voir que seule la cuticule de la tique présentait une autofluorescence (Figure 6-13 : Annexe 18).

Les cultures contenant les intestins des tiques nourries pendant 72h ont été analysées par microscopie à fond noir et si négatives, une PCR sur les fluides de culture a été effectuée.

3.5.2 Résultats

3.5.2.1 Localisation des borréliés dans les nymphes infectées prenant un repas sain

Sur les 7 nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) observées à jeun *in toto* au microscope confocal, une était infectée (14.3%). Cette tique présentait des borréliés au niveau intestinal et aucune dans les glandes salivaires. Chez les nymphes à jeun infectées par *B. afzelii* et observées de la même

manière 4/5 (80%) étaient infectées et ne présentaient des borrelies qu'au niveau de l'intestin. Parmi les nymphes à jeun infectées par *B. burgdorferi* ss ou *B. afzelii*, nous n'avons donc pas détecté d'infection systémique.

Huit heures après le début du repas sanguin, des spirochètes ont été observés chez 3/4 (75%) nymphes infectées par *B. afzelii*, ceci uniquement au niveau intestinal (Tableau 3-9). Aucune tique infectée par *B. burgdorferi* ss n'a été examinée à ce moment du repas sanguin.

Après 24h de repas sanguin, 5 nymphes pour chacun des deux lots correspondants aux deux espèces de *Borrelia* ont été récoltées et observées au microscope confocal. On a pu ainsi observer *B. burgdorferi* ss localisée dans l'intestin de 2/5 nymphes (40%) et *B. afzelii* dans l'intestin de 4/5 nymphes (80%). Aucune nymphe observée à 24h de repas sanguin n'a montré d'infection au niveau des glandes salivaires, que ce soit pour *B. burgdorferi* ss ou *B. afzelii*.

Après environ 30h (min 28h- max 39), les 5 tiques infectées par *B. afzelii* observées (100%) ont toutes montré une infection mais uniquement au niveau intestinal.

Après 48h de repas sanguin, sur les 8 nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss observées, 3 étaient infectées au niveau intestinal (26.5%) (Figure 6-14 : Annexe 19) et chez une de ces trois tiques (33%) l'infection avait atteint les glandes salivaires. En ce qui concerne les nymphes infectées par *B. afzelii*, après 48h de repas sanguin les spirochètes se trouvaient dans l'intestin de 6/12 nymphes (50%), et dans le même nombre de tiques au niveau des glandes salivaires (100%) (Figures 6-15 et 6-16 : Annexe 20). Toutes les tiques infectées au niveau intestinal par *B. afzelii* avaient développé une infection des glandes salivaires, alors que ceci n'a pas été le cas chez les tiques infectées par *B. burgdorferi* ss.

À 72h de repas sanguin, seules des nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss ont été analysées : 6/12 (50%) ont montré la présence de borrelies dans l'intestin par culture de cet organe et 1/6 (16%) avait un spirochète dans les glandes salivaires observées au microscope confocal.

	tiques infectées/observées			
	<i>B. burgdorferi</i> ss		<i>B. afzelii</i>	
	Intestin	Glandes salivaires	Intestin	Glandes salivaires
8h	nd	nd	3/4	0/4
24h	2/5	0/4	4/5	0/5
ca 30h	nd	nd	5/5	0/5
48h	3/8	1/8	6/12	6/12
72h	6/12	1 ^{**} /11 [*]	nd	nd

Tableau 3-9: Localisation de l'infection à l'intérieur de tiques infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) ou *B. afzelii* (NE 2961) au cours d'un repas sanguin sur une souris saine. Le détail des résultats se trouve dans les tableaux 9A et 9B (Annexe 21).

* : pour 2 tiques 1 seule glande salivaire observée.

** : une glande salivaire était infectée par 1 spirochète. Cette glande salivaire étant écrasée on n'a pas pu déterminer si le spirochète se trouvait à l'intérieur d'un acinus.

La localisation des borrélioses dans d'autres organes que l'intestin et les glandes salivaires a également été étudiée : 36 synganglions ainsi que 4 ampoules rectales ont pu être observés au microscope confocal. L'ampoule rectale étant un organe très délicat, il a souvent été endommagé par les manipulations de préparation de l'échantillon pour le microscope confocal. L'observation de cet organe a donc été peu fréquente. Aucuns des 36 synganglions et des 4 ampoules rectales n'ont montré la présence de spirochètes.

En résumé, aucune nymphe à jeun n'était infectée systématiquement. Au cours du repas sanguin, les glandes salivaires ne se sont infectées qu'à partir de 48h de nutrition de la nymphe. Chez toutes les tiques infectées par *B. afzelii* l'infection avait atteint les glandes salivaires, alors que ceci n'était pas le cas chez toutes les tiques infectées par *B. burgdorferi* ss. Aucun synganglion ainsi qu'aucune ampoule rectale observée n'ont montré d'infection.

3.5.2.2 Localisation des borrélioses dans les nymphes saines prenant un repas infectieux

Après 24h de repas sanguin sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss (ZS7), aucune des 4 nymphes analysées n'a montré de spirochètes, que ce soit dans l'intestin ou dans les glandes salivaires (Tableau 3-10). Par contre parmi les 8 nymphes nourries pendant 24h sur une souris infectée par *B. afzelii*, 5 (62.5%) étaient infectées au niveau intestinal (Figure 6-17 :Annexe 22). Dans une des tiques, un spirochète a pu également être observé au niveau de l'ampoule rectale (Figure 6-

18 : Annexe 23). Malheureusement, cet organe n'a pu être observé qu'un nombre restreint de fois, car il a été très souvent perdu lors de la préparation des tiques.

Lorsque les nymphes se sont nourries pendant 48h sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss, elles commencent à ingurgiter des spirochètes. En effet 1/7 nymphes a montré une infection, mais localisée uniquement dans l'intestin (14.3%). Durant cette période, un plus grand nombre de nymphes nourries sur une souris infectée par *B. afzelii* étaient infectées au niveau intestinal (5/8 ; 62.5%), mais là aussi l'infection n'avait pas atteint les glandes salivaires.

Après 72h de repas sanguin sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss, grâce à la mise en culture des intestins, l'infection au niveau intestinal a pu être mise en évidence chez 5/6 nymphes (83.3%). Par contre, les glandes salivaires de ces tiques observées au microscope confocal restent indemne de spirochète. L'étape de 72h de repas pour des nymphes se nourrissant sur une souris infectée par *B. afzelii* n'a malheureusement pas donné de résultats concluants, car aucune des 4 nymphes examinées ne présentait une infection.

Parmi toutes les tiques observées au microscope confocal, nous avons pu observer 36 synganglions toujours négatifs et 2 ampoules rectales dont 1 contenait un spirochète. Comme déjà signalé auparavant, il s'agissait d'une tique nourrie pendant 24h sur une souris infectée par *B. afzelii*.

	tiques infectées/observées			
	<i>B. burgdorferi</i> ss		<i>B. afzelii</i>	
	Intestin	Glandes salivaires	Intestin	Glandes salivaires
24h	0/4	0/4	5/8	0/8
48h	1/7	0/6	5/8	0/8
72h	5/6	0/6°	0/4	0/4

Tableau 3-10: Localisation de l'infection à l'intérieur de tiques saines au cours d'un repas sanguin infectieux sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss (ZS7) ou *B. afzelii* (NE 2961). Le détail des résultats se trouve dans les tableaux 10A et 10B (Annexe 24).

° chez 3 tiques 1 seule glande salivaire observée.

L'infection est détectée dans l'intestin de nymphes saines se nourrissant sur une souris infectée dès 24h en ce qui concerne *B. afzelii* et plus tard (dès 48h) en ce qui concerne *B. burgdorferi* ss. L'infection de ces tiques saines prenant un repas infectieux est toujours restée localisée à l'intestin des tiques, quelque soit la durée du repas sanguin, aucun spirochète n'a jamais été observé dans les glandes salivaires.

3.5.2.3 Nombre de spirochètes observés.

L'évaluation du nombre de spirochètes dans les organes des tiques a été faite par simple observation des différents échantillons. Dans le cas des tiques infectées par *B. burgdorferi* ss, le nombre de spirochètes observé a toujours été très faible : 1 à 2 spirochètes par organe infecté (intestin ou glandes salivaires), ceci à tous les temps de nutrition observés et quel que soit la nature du repas, infectieux ou non.

En ce qui concerne les nymphes infectées par *B. afzelii*, le nombre de spirochètes observé au niveau de l'intestin est très variable d'une nymphe à l'autre, aussi bien dans le cas d'une tique déjà infectée que pour une tique prenant l'infection. Cette grande variation s'observe chez les nymphes aux mêmes périodes de nutrition, mais également entre des nymphes à des périodes de nutrition différentes (Figures 6-19 et 6-20 : Annexe 25). Au niveau des glandes salivaires, le nombre de spirochètes est en général très faible avec un maximum d'environ 5 spirochètes par glande et il est très rare d'avoir plus d'un à deux spirochètes par acinus

3.6 Expression des protéines de surface OspA et OspC par *B. burgdorferi* ss (ZS7) dans la tique *I. ricinus* au cours du repas sanguin.

Au cours du repas sanguin de la tique, pendant leur migration de l'intestin vers les glandes salivaires, les *Borrelia* modifient l'expression de certaines de leurs protéines de surface. Dans les tiques à jeun, les spirochètes se trouvent généralement dans l'intestin et expriment la protéine de surface OspA, et rarement l'OspC [Hodzic et al 2002 ; Fingerle et al 1995]. Plusieurs études sur *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss, montrent que, au cours du repas sanguin, l'OspA est de moins en moins exprimée et que l'OspC est par contre toujours plus exprimée [De Sliva et al 1996 ; Schwan et al 1995 ; Ohnishi et al 2001].

Parallèlement à la localisation des *Borrelia* dans la tique *I. ricinus* pendant le repas sanguin (cf. 3.5), nous avons voulu observer si les protéines de surface OspA et/ou OspC étaient exprimées dans l'intestin et les glandes salivaires.

3.6.1 Mode opératoire.

Des tiques infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) prenant un repas sur une souris saine et des tiques saines prenant un repas infectieux sur des souris infectées par cette même souche, ont été détachées de la souris après 24h ou 48h de nutrition.

Les tiques ont été disséquées et les intestins et les glandes salivaires ont été prélevés séparément et posés sur une lame pour une observation. L'intestin et les glandes salivaires ont été déchiquetés à l'aide de deux aiguilles lancéolées modifiées en guise de fins scalpels.

Les préparations ont ensuite été traitées pour un triple marquage (cf 2.8.2), et observées au moyen d'un microscope à épifluorescence pour détecter la présence des spirochètes. Lorsque les *Borrelia*

étaient présentes, les préparations ont été observées également au microscope confocal pour déterminer si les protéines OspA et/ou OspC étaient exprimées.

3.6.2 Résultats.

Dans le cas des nymphes infectées se nourrissant sur une souris saine, 3/7 tiques (42.8%) ont montré après 24h de repas sanguin une infection localisée uniquement dans l'intestin (Tableau 3-11). Les borrelies *B. burgdorferi* ss observées au microscope confocal ont révélé l'expression de la protéine OspA, la protéine OspC, n'étant pas ou peu exprimée (Figures 6-21, 6-22 et 6-23 : Annexe 26). L'expression des protéines OspA et OspC chez les tiques nourries pendant 48h n'a pu être observée. En effet, un autre lot de tiques infectées a été utilisé pour l'étape de 48h de repas sanguin, et dans ce cas aucune infection n'a été mise en évidence (ni au niveau de l'intestin ni au niveau des glandes salivaires).

Lorsque des nymphes saines nourries sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss (ZS7) pendant 24h ou 48h ont été analysées, aucune infection dans l'intestin ou les glandes salivaires n'a été détectée.

	Nymphes infectées/observées			
	N infectées sur souris saine		N saines sur souris infectée	
	Intestin	Gl. salivaires	Intestin	Gl. salivaires
24h	3/7	0/7	0/4	0/4*
48h	0/6	0/6	0/7	0/7*

Tableau 3-11: Infection au niveau de l'intestin ou des glandes salivaires pour des nymphes infectées sur souris saine ou de nymphes saines se nourrissant sur souris infectée après 24h ou 48h de repas sanguin.

* : chez une tique, une seule glande salivaire observée.

3.7 La protéine de surface OspA de *B. burgdorferi* si permet-t-elle l'adhésion du spirochète à la paroi intestinale de la tique ?

Les borrelies présentes dans l'intestin des tiques à jeun expriment la protéine de surface OspA. Au cours du repas sanguin, lors de la migration des spirochètes vers les glandes salivaires, l'expression de cette protéine est réduite [De Silva et al 1996]. Cette protéine de surface n'est normalement pas exprimée pendant l'infection dans l'hôte vertébré [Schwan et al 1995 ; Golde et al 1994], ceci implique que cette protéine joue un rôle important lorsque les spirochètes se trouvent dans la tique.

Le but de cette expérience était de voir si la protéine de surface OspA est une adhésine, protéine qui permettrait aux spirochètes qui l'expriment de se fixer à la paroi intestinale de la tique à jeun.

3.7.1 Mode opératoire.

Dans un premier temps, nous avons mis en contact *in vitro* les cellules intestinales avec des borrelies exprimant la protéine de surface OspA (souche B31) ou des spirochètes mutants OspA-less qui ne l'expriment pas, ceci pour observer les différences entre ces deux souches en contact avec les cellules intestinales. Après dissection, l'intestin des tiques a été prélevé pour séparer les cellules. Plusieurs essais ont été accomplis, par broyeur ou seringue tuberculine, mais nous n'avons jamais obtenu des cellules intestinales intactes. Nous avons changé de stratégie et pour déterminer s'il y a adhésion des spirochètes à la paroi intestinale, des tiques ont été nourries par capillaire (cf 2.3.1.3) avec les spirochètes exprimant l'OspA (souche B31) ou les spirochètes mutants B31 OspA-less. Après 3 jours les tiques ainsi traitées ont été disséquées, et l'intestin prélevé a été ouvert à l'aide d'une petite aiguille, lavé 2x environ 10 min sous agitation douce dans du PBS pour enlever les spirochètes qui ne seraient pas attachés et finalement déposé sur une lame dégraissée en essayant de bien l'étaler. Sur la même lame, nous avons ajouté des cultures de ces deux souches lavées comme contrôles positifs pour tester le bon fonctionnement de la réaction. Ces lames ont été observées au microscope à fluorescence après une réaction d'immunofluorescence avec le conjugué anti-*Borrelia* pendant 30 min à 37°C (cf 2.3.2.2).

3.7.2 Résultats.

Parmi les tiques nourries par capillaire, quatre ont été étalées *in toto* pour en contrôler l'infection, et toutes étaient infectées. Ceci nous a permis de confirmer la présence d'une infection dans les tiques nourries par capillaire tant avec une culture de B31 qu'avec une culture B31OspA-less.

L'analyse des intestins des tiques infectées par B31, a montré une infection chez toutes les tiques (3/3). Cependant, l'observation des intestins des tiques infectées par les mutants B31 OspA-less montraient également la présence de spirochètes, ceci malgré les lavages (3/3 tiques infectées), indiquant que dans ce cas également les borrelies avaient colonisé l'intestin.

Quelques-unes des tiques nourries par capillaire ont également été mises en culture dans le but de découvrir si ces spirochètes étaient capables de survivre dans la tique.

Trois tiques infectées par B31 OspA-less ainsi que 4 infectées par B31 ont été mises en culture 3 jours après la nutrition par capillaire. De plus 2 tiques infectées par la souche B31 OspA-less depuis 16 jours ont aussi été mises en culture. Les cultures ont ensuite été observées au microscope à fond noir après incubation à 30°C. Une des deux tiques infectées par B31 OspA-less et mise en culture après 16 jours a donné une culture de spirochètes mobiles, tandis que toutes les autres tiques ont donné des cultures négatives.

4 DISCUSSION

Dans ce chapitre nous allons en premier lieu brièvement discuter les méthodes utilisées dans ce travail. Ensuite nous allons discuter les phénomènes liés à l'infectiosité des spirochètes dans les tiques infectées à jeun et dans les tiques se nourrissant, à la transmission de l'infection du vecteur à l'hôte et à la localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin. Enfin nous allons discuter les aspects de la prise d'infection d'une tique saine se nourrissant sur une souris infectée.

4.1 Discussion sur les méthodes utilisées

La microscopie électronique à transmission (TEM) est un outil qui permet une localisation précise du spirochète à l'intérieur d'un organe de la tique et qui permet d'en définir l'ultrastructure. Cependant la détermination de l'emplacement de quelques borrelies dans une tique qui ne serait pas très infectée en utilisant le TEM est très difficile, il s'agit d'une méthode assez laborieuse et elle n'est pas la plus adaptée pour déterminer quelles tiques sont infectées et quelles tiques ne le sont pas. En utilisant en complément au TEM la recherche des borrelies dans une même tique par immunofluorescence, nous n'avons pas observé de concordance entre les deux méthodes. D'autre part, nous avons eu des problèmes car le contenu intestinal des tiques gorgées était mal fixé et mal contrasté. Nous avons essayé d'autres méthodes de fixation, de contrastation ainsi qu'une autre résine, mais nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants. Nous nous sommes rendu compte qu'un repérage moins fin et plus immédiat était pour nous suffisant pour une première étude sur la localisation des spirochètes dans les différents organes de la tique. Nous avons ainsi utilisé la microscopie confocale, qui permet de repérer les spirochètes fluorescents (après marquage) et d'observer une tique en entier, pourvu qu'elle ne soit pas trop épaisse. Nous pensons que cet outil était mieux adapté aux buts de notre recherche et qu'il sera intéressant dans le futur de coupler les deux techniques de microscopie électronique et confocale pour pouvoir en un premier temps, grâce à la microscopie confocale, déterminer la localisation et éventuellement l'expression de certaines protéines des spirochètes dans les tiques et ensuite, grâce à la microscopie électronique, pouvoir déterminer la localisation exacte des bactéries dans l'organe à plus fort agrandissement.

Au cours de ce travail il nous est apparu que l'association de différentes techniques permettait de mieux détecter les borrelies dans les tiques et les souris. Dans notre cas, l'utilisation de la PCR pour détecter de l'ADN de *Borrelia* dans le milieu de culture nous a été d'un grand secours.

Enfin, nous aimerions considérer que le fait de travailler avec des tiques et des souris infectées, et par conséquent de dépendre de leurs rythmes biologiques, peut parfois influencer le déroulement des expériences. Pour obtenir des souris infectées, il faut leur injecter des souches qui ne doivent pas avoir perdu leur pouvoir infectieux, facteur essentiel à l'établissement de l'infection. Ceci implique que parfois plusieurs essais doivent être effectués avant d'avoir du succès. Ensuite, pour avoir des nymphes infectées, il faut pratiquer une xénodiagnose avec des larves sur des souris infectées et attendre la mue des larves en nymphes (laps de temps qui peut varier selon les saisons). Il est alors nécessaire d'effectuer un test d'immunofluorescence pour en calculer le taux d'infection : mais parfois

très peu de larves muent en nymphes ou un trop faible taux d'infection est détecté pour que ces nymphes puissent être utilisées lors des expériences. Si on veut infecter des tiques par voie naturelle, il faut considérer que toutes les tiques ne se fixent pas ce qui entraîne une baisse du nombre de tiques utilisables. Si on veut infecter ou administrer des liquides par capillaire à ces tiques, il faut utiliser un grand nombre de tiques au départ car les tiques sont souvent blessées par les capillaires et meurent. Par exemple, au cours de l'expérience 3.2, seule la moitié des tiques étaient encore vivantes 24h après la nutrition par capillaire. Ces facteurs biologiques ont parfois perturbé le cours de nos expériences, et nous tenions à le souligner.

4.2 Nymphes infectées

Dans toutes les nymphes *I. ricinus* à jeun observées au cours de ce travail, les spirochètes étaient toujours situés dans l'intestin, tout comme l'a montré la majorité des travaux antérieurs [De Silva and Fikrig 1995][Burgdorfer et al 1982 ; 1989] [Benach et al 1987] [Gern et al 1996] [Leuba-Garcia et al 1998] [Ohnishi et al 2001]. Ces spirochètes à l'intérieur de l'intestin des tiques à jeun se trouvent souvent associés à la surface de l'épithélium intestinal [Burgdorfer et al 1982 ; 1989] [Benach et al 1987] [Burgdorfer et al 1991]. Toutefois, notons que dans d'autres études des spirochètes ont parfois été trouvés ailleurs que dans l'intestin des tiques à jeun et parfois même au sein des glandes salivaires [Burgdorfer et al 1983 ; 1985, 1991] [Zhu 1998b] [Zung et al 1989] [Piesman 1995] [Leuba-Garcia et al 1994] [Lebet and Gern 1994] [Piesman et al 2001].

Piesman [1993] a montré que les *B. burgdorferi* ss étaient non-infectieuses dans les tiques *I. scapularis* à jeun. En effet l'injection de broyats de tiques à jeun infectées ne déclenche pas d'infection chez la souris. Nous avons pu constater le même phénomène avec des tiques *I. ricinus* à jeun, ceci qu'elles soient infectées par *B. burgdorferi* ss ou bien par *B. afzelii* [Crippa et al 2002]. En ce qui concerne *I. scapularis* les spirochètes deviennent infectieux si les tiques se sont préalablement nourries sur une souris pendant 24h [Piesman 1993]. Nous avons observé le même phénomène chez des nymphes *I. ricinus* infectées soit par *B. burgdorferi* ss ou par *B. afzelii*.

Dans notre étude [Crippa et al 2002] et dans celle de Piesman [1993], l'infectiosité des borrelies chez l'hôte a été évaluée par une biopsie d'oreille qui ne permet qu'une détection d'une infection disséminée. Etant donné l'existence de souches invasives et de souches non-invasives [Seinost et al 1999][Baranton et al 2001], nous avons voulu voir si, lors de l'injection des nymphes à jeun, les spirochètes développaient une infection localisée qui n'aurait pas été mise en évidence par biopsie de la peau d'oreille. Au cours de l'expérience dans laquelle nous avons effectué des biopsies de la peau du dos (lieu de l'injection du broyat de nymphes) et de la peau d'oreille, nous avons pu constater que les spirochètes présents dans les tiques infectées à jeun sont réellement non-infectieux. En effet ils ne provoquent pas d'infection disséminée ni d'infection localisée dans la souris.

Lors d'un repas sur un animal à sang chaud la température de la tique change. En effet le sang que la tique prélève pendant la nutrition doit avoisiner les 37°C lorsqu'elle se gorge sur un mammifère, et même davantage lorsqu'il s'agit d'un oiseau (40°C). Dans nos expériences sur les nymphes à jeun incubées à différentes températures pendant différents laps de temps, nous avons montré que la température est un facteur à lui seul suffisant pour déclencher l'infectiosité des borrelies dans les

tiques à jeun, en ce qui concerne *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii*. En effet le broyat de tiques à jeun maintenues 24h à 37°C inoculé dans la souris déclenche une infection. Cependant il semble que *B. afzelii* soit moins influencé par la température que *B. burgdorferi* ss, car le broyat des tiques gardées pendant 24h à 37°C infectées par la souche NE2961 (*B. afzelii*) a infecté un plus faible nombre de souris (n=1/6) que le broyat de tiques infectées par la souche ZS7 (*B. burgdorferi* ss) (n=5/8). Cependant, cette différence n'est pas significative (Fisher's exact test p=0.1375).

Nous avons aussi observé que les spirochètes *B. burgdorferi* ss présents dans les tiques maintenues 24h à 37°C conservaient leur pouvoir infectieux si les tiques étaient ensuite conservées à température ambiante pendant 48h. L'infectiosité des *Borrelia* perdure donc au-delà du maintien des tiques pendant 24h à 37h. Ceci n'a pas pu être montré pour *B. afzelii*.

L'infectiosité des spirochètes n'est pas déclenchée, ni chez *B. burgdorferi* ss, ni chez *B. afzelii*, lorsque les tiques sont incubées à 37°C pendant des temps plus courts que 24h ou à des températures inférieures à 37°C. Piesman [1993] a aussi injecté le broyat de nymphes infectées à jeun, elles ont été maintenues pendant 30h à 37°C, mais les spirochètes de ces nymphes, dans son cas il s'agissait d'*I. scapularis*, n'ont pas pu établir d'infection dans les souris. Nous n'avons pas essayé de garder les tiques à 37°C pendant un période de 30h et on ne sait pas si, dans ce cas, les spirochètes dans *I. ricinus* auraient aussi développé leur pouvoir infectant. Cependant une différence dans l'espèce de tique utilisée (*I. scapularis*), dans la souche de *B. burgdorferi* ss (JD1) ou encore dans la souche de souris pour déterminer si les spirochètes étaient capables d'établir une infection, sont trois facteurs qui pourraient être responsables du résultat obtenu par Piesman [1993], et qui diffère du nôtre.

Dans le but de découvrir quels autres facteurs pouvaient influencer l'infectiosité des spirochètes nous avons administré par capillaire du sérum de souris et du liquide physiologique TC 199 à des nymphes à jeun infectées et nous avons observé que l'ingurgitation de ces substances par la tique stimule le pouvoir infectieux de *B. burgdorferi* ss, par contre ces substances ne semblent pas déclencher l'infectiosité chez *B. afzelii*.

L'absence de déclenchement de l'infectiosité chez *B. afzelii* en réponse à des facteurs qui suffisent pourtant à déclencher l'infectiosité chez *B. burgdorferi* ss, ainsi que la plus faible réaction à la température de *B. afzelii*, devraient être confirmées en effectuant une étude avec un plus grand nombre de souris.

Ni chez *B. burgdorferi* ss, ni chez *B. afzelii*, l'administration par capillaire du milieu de culture des borrelies aux nymphes à jeun infectées n'a déclenché le pouvoir infectieux des spirochètes. Par contre lorsque les tiques à jeun sont écrasées et mises dans du milieu de culture 24h à 34°C et qu'ensuite le milieu est injecté, les souris développent une infection, signifiant que les spirochètes ont acquis leur pouvoir infectieux. Dans les deux cas les spirochètes rentrent en contact avec le milieu de culture BSK-H, mais leur réaction est différente. Il se peut que la différence de quantité de milieu à laquelle

les spirochètes sont confrontés dans les deux cas, et/ou la différence dans le traitement qui en a suivi, c'est-à-dire le fait de garder les tiques ayant ingurgité le BSK-H à température ambiante ou de les garder en incubation dans le milieu de culture pendant 24h à 34°C, soit la raison de cette étonnante différence. Il serait intéressant de nourrir des tiques à jeun infectées par capillaire avec du BSK-H et ensuite de les mettre 24h à 34°C pour vérifier l'infectiosité de ces spirochètes et ainsi déterminer le rôle de la température dans cette différence de comportement des spirochètes. Il ne faut cependant pas oublier que l'environnement de l'intestin de la tique qui est en train de se nourrir par capillaire peut être différent de celui d'une tique au repos. Les spirochètes dans l'intestin d'une tique qui prend du BSK-H peuvent donc réagir différemment de ceux d'une tique à jeun et au repos qui sont mis en contact avec du BSK-H après écrasement de la tique.

Dans les nymphes *I. ricinus* à jeun, presque toutes les borrelies de l'isolat *B. burgdorferi* ss (ZS7) expriment la protéine de surface OspA, ceci est en accord avec les travaux effectués sur *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss et l'analyse par microscopie à fluorescence [Schwan et al 1995][De Silva et al 1996] [Schwan and Piesman 2000]. Le fait que presque toutes les borrelies expriment l'OspA dans l'intestin des tiques à jeun est tout à fait en accord avec le rôle de l'OspA montré par Pal et al [2000], soit de permettre aux spirochètes de se fixer à la paroi intestinale, ce qui explique que les *Borrelia* se trouvent souvent associés à la surface de l'épithélium intestinal dans les tiques à jeun [Burgdorfer et al 1982, 1989 ; Benach et al 1987 ; Burgdorfer et al 1991 ; Michèle Vlimant communication personnelle]. Nous avons aussi essayé de déterminer si cette protéine était une adhésine, mais nos résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence cette fonction. La méthode choisie pour effectuer ce travail n'était donc pas adaptée pour nous permettre d'arriver à de bonnes conclusions.

Dans l'intestin des *I. ricinus* à jeun infectées par *B. burgdorferi* ss nous avons aussi observé un faible nombre de borrelies qui n'exprimaient ni OspA ni OspC parmi les spirochètes exprimant l'OspA, comme observé par Ohnishi et al [2001] chez *I. scapularis*. Chez *I. ricinus*, Fingerle et al [1995 et 1998] ont montré l'existence de tiques à jeun dans lesquelles les spirochètes n'expriment ni l'OspA ni l'OspC. Cependant dans ces deux travaux la technique de marquage utilisée n'a pas permis d'observer si, dans une même tique des spirochètes exprimant les protéines de surface OspA et/ou OspC peuvent coexister avec des spirochètes n'exprimant aucune de ces deux protéines.

Nous n'avons pas observé de spirochètes *B. burgdorferi* ss exprimant l'OspC dans *I. ricinus*, ce qui ressemble aux résultats de *B. burgdorferi* ss chez *I. scapularis* [Schwan et al 1995 ; De Silva et al 1996 ; Schwan and Piesman 2000], mais qui est différent de ce qui a été remarqué dans d'autres études chez *I. ricinus* [Fingerle et al 1995 ; Leuba-Garcia et al 1998]. Dans le travail de Fingerle et al [1995] les tiques observées provenaient de la nature et les spirochètes d'une seule tique adulte exprimaient l'OspC, ces auteurs en ont conclu qu'il s'agissait d'un phénomène rare. Par contre Leuba-Garcia et al [1998] ont travaillé comme nous avec des tiques de laboratoire, mais infectées par *B. afzelii*, et ont observé plusieurs tiques à jeun contenant des spirochètes exprimant l'OspC. La différence avec notre résultat pourrait être due à l'espèce ou à la souche de *Borrelia* utilisée, voire à l'espèce de souris.

Puisque la culture des borrelies à 37°C ou même à 35°C induit des niveaux élevés d'expression de la protéine de surface OspC [Schwan et al 1995] [Stevenson et al 1995] [Obonyo et al 1999] [Schwan and Piesman 2000] [Obonyo et al 2002], et que la culture à 37°C des borrelies accroît leur infectiosité pour les hamsters [Obonyo et al 2002], on pourrait imaginer que dans les nymphes gardées 24h à 37°C les spirochètes commencent à exprimer abondamment l'OspC ce qui expliquerait leur infectiosité. Néanmoins, comme observé par Schwan et al [1995] pour *I. scapularis*, nous n'avons pas observé de spirochètes exprimant l'OspC dans l'intestin des nymphes à jeun d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* ss et gardées 24h à 37°C. En effet, aucune différence dans l'expression de l'OspA ou de l'OspC, ni dans le nombre de spirochètes observés n'a été détectée entre nymphes à température ambiante et nymphes gardée 24h à 37°C. Ceci laisse supposer que dans ce cas, l'OspC n'est pas directement responsable du déclenchement de l'infectiosité.

Les gènes de *B. burgdorferi* si exprimés dans la tique peuvent avoir un rôle dans la facilitation de la transmission en permettant la migration des bactéries depuis l'intestin vers les glandes salivaires, ou bien dans la biosynthèse et la nutrition car la seule source de nutrition pour les *Borrelia* est le repas sanguin qui est pris par la tique et qui peut être riche en certains nutriments et pauvre en d'autres. Cette seule source d'énergie est d'ailleurs également fortement exploitée par la tique elle même qui doit parfois passer des mois sans se nourrir. Les spirochètes doivent survivre dans le vecteur pendant ce temps. Il est donc compréhensible que les borrelies n'expriment pas les gènes d'infectiosité en permanence. En effet, il n'est pas nécessaire de dépenser inutilement de l'énergie dans l'expression de ces gènes qui donnent aux borrelies la capacité d'établir une infection, alors qu'elles se trouvent dans une tique à jeun qui n'est pas encore en contact avec un hôte potentiel. Hurme et Rhen [1998] expliquent que la température est utilisée par plusieurs bactéries comme facteur régulant l'expression de gènes responsables de l'infectiosité. Nous émettons l'hypothèse que cela est le cas aussi pour *B. burgdorferi* sl.

Lorsque les tiques infectées commencent à se nourrir les spirochètes restent localisés dans l'intestin de la tique jusqu'à 48h de repas sanguin. Ce n'est qu'à partir de 48h de repas que des spirochètes sont aussi observés dans les glandes salivaires, ce qui montre qu'à ce moment certaines borrelies ont migré depuis l'intestin jusqu'aux glandes salivaires. Ce résultat est le même pour *B. burgdorferi* ss (ZS7) et *B. afzelii* (NE 2961). Le fait de trouver les spirochètes dans les glandes salivaires dès 48h, correspond à ce qui a été décrit dans la littérature pour *I. ricinus*. En effet chez des tiques infectées par capillaire et nourries sur des souris des bactéries sont trouvées dans l'hémolymphe dès 48h et dans les glandes salivaires dès 72h [Monin et al 1989]. Dans les tiques de la nature les spirochètes sont observés dans les glandes salivaires dès 48h de repas [Gern et al 1996] [Zhu 1998b]. Chez *I. scapularis* les spirochètes sont aussi trouvés dans les glandes salivaires de la tique dès 48h [Zung et al 1989] ou même dès 36h [De Silva and Fikrig 1995] [Ohnishi et al 2001].

Lorsque on étudie la transmission des borrelies à une souris via la tique, on constate qu'il faut plus de temps à une tique pour transmettre *B. burgdorferi* ss que *B. afzelii* [Crippa et al 2002]. Dans l'étude

sur la transmission effectuée avec 2 souches de *B. burgdorferi* ss et de *B. afzelii* nous avons en effet observé que *B. burgdorferi* ss n'avait pas été transmis par les tiques pendant les premières 48h du repas sanguin alors que *B. afzelii* l'avait été.

La transmission par voie naturelle de *B. burgdorferi* ss par *I. ricinus* se fait dans un délai semblable à celui décrit pour *B. burgdorferi* ss par la tique *I. scapularis* [Piesman 1993][Des Vignes et al 2001][Ohnishi et al 2001]. En effet la transmission par voie naturelle des spirochètes *B. burgdorferi* ss se fait seulement après 53h de repas d'*I. scapularis* et pas avant et dans notre cas, avec *I. ricinus*, elle a été remarquée seulement après 72h de repas sanguin.

Pourtant nous avons observé *B. burgdorferi* ss dans les glandes salivaires d'*I. ricinus* dès 48h de repas, et Ohnishi et al [2001] dans les glandes salivaires de *I. scapularis* dès 36h de repas, cela nous amène à penser que quand les tiques commencent à avoir les glandes salivaires infectées elles n'arrivent pas encore à transmettre une infection par *B. burgdorferi* ss qui puisse s'établir et devenir systémique.

En ce qui concerne *B. afzelii* par contre, l'infection de la souris via la piqûre de la tique se fait déjà après 24h de repas. Cela semble en contradiction avec le fait que les glandes salivaires ne sont infectées qu'après 48h seulement. Cependant seule une souris a développé une infection après avoir été piquée par des tiques pendant 24h, et ces tiques étaient infectées par la souche NE 496 de *B. afzelii*, l'autre souche de *B. afzelii* utilisée (NE 2963) se transmet dès 48h de repas, ce qui correspond bien au temps nécessaire à l'infection des glandes salivaires. Probablement aussi qu'il existe une différence dans la vitesse de migration des borrelies dans la tique en fonction des souches. Fingerle et al [2002] ont observé une différence de comportement entre souches au sein d'une même espèce, la vitesse de dissémination vers les glandes salivaires chez des tiques infectées par capillaire par *B. afzelii* ou *B. garinii* variant selon les souches utilisées.

Il semble donc que même si les glandes salivaires sont colonisées par *B. burgdorferi* ss dès 48h, ce n'est pas à ce moment qu'*I. ricinus* transmet une infection à la souris, alors que pour *B. afzelii*, l'établissement d'une infection est plus immédiat, car il correspond au moment où les glandes salivaires sont colonisées par les spirochètes.

Lorsque nous avons suivi l'infection des tiques au cours du repas sanguin, nous avons observé une différence dans le taux d'infection des glandes salivaires des tiques à 48h de repas entre les deux espèces de *Borrelia*. En effet, *B. afzelii* avaient migré de l'intestin vers les glandes salivaires de toutes les tiques infectées alors que ce n'était pas les cas des *B. burgdorferi* ss.

B. afzelii aurait donc une plus grande facilité à parvenir au niveau des glandes salivaires d'*I. ricinus* que *B. burgdorferi* ss. Il est par conséquent imaginable que davantage de spirochètes pourraient être injectés par les nymphes infectées par *B. afzelii* que par *B. burgdorferi* ss. Ceci pourrait être une explication au fait que *B. burgdorferi* ss est transmise plus tardivement que *B. afzelii*. Comme on l'a signalé auparavant, Ohnishi et al [2001] ont montré que quand, au cours du repas sanguin, *I. scapularis* commence à avoir les glandes salivaires infectées par *B. burgdorferi* ss elle n'arrive pas encore à transmettre une infection qui puisse s'établir et devenir systémique. Suite à l'observation de borrelies dans la peau des souris se trouvant autour du rostre de tiques arrachées des souris, ces auteurs ont observé que les spirochètes sont effectivement transmis par la tique dès que les glandes

salivaires sont infectées, mais qu'ils n'établissent pas d'infection systémique. Nous suggérons qu'il peut y avoir une différence entre les deux espèces de *Borrelia* non seulement dans le nombre de spirochètes injectés, mais aussi dans le comportement de ces bactéries une fois qu'elles se trouvent dans la peau. En effet plusieurs études montrent que les spirochètes transmis par les tiques restent localisés au lieu d'injection pendant un certain temps avant de disséminer dans la souris [Shih et al 1992 et 1993][Gern and Rais 1996]. Il se peut que les spirochètes de l'espèce *B. burgdorferi* ss aient un comportement plus statique dans la peau et soient arrachés avec la peau qui se trouve autour du rostre quand on enlève la tique, alors que les spirochètes de l'espèce *B. afzelii*, souvent en association avec des formes dermatologiques de la maladie de Lyme [Canica et al 1993], pourraient être plus adaptés aux conditions de la peau et donc disséminer du lieu d'injection plus vite et ne pas être enlevées avec la peau arrachée lorsque l'on retire la tique.

Cependant Piesman [1995] a remarqué que les *B. burgdorferi* ss présents dans les glandes salivaires d'*I. scapularis* nourries pendant moins de 60h ne produisent pas d'infection, alors qu'ils le font si la tique se nourrit pendant plus que 60h. Dans ce cas on ne peut pas attribuer le manque d'infection systémique dans les souris à l'arrachement de la peau contenant les spirochètes. Ce fait ajouté aux observations faites par Piesman [1993] et nous-même, montrant que le broyat de nymphes infectées nourries pendant 24h est infectieux pour les souris (alors que celui de nymphes infectées à jeun ne l'était pas), et que, à ce moment-là, les glandes salivaires des nymphes ne sont pas encore atteintes, montrent que la situation est compliquée. Nous proposons alors une autre explication. Nous suggérons que, à l'intérieur de la tique, se définissent deux populations de borrelies : une qui n'est pas encore présente dans la tique à jeun mais qui se développe dans l'intestin au début du repas sanguin avant d'atteindre les glandes salivaires et qui possède un pouvoir infectieux, et une autre, déjà présente dès le début dans l'intestin de la tique mais qui est incapable d'établir une infection systémique chez la souris. Les deux populations seraient capables de migrer vers les glandes salivaires de la tique et seraient ainsi injectées dans la souris. Mais chez *B. burgdorferi* ss la population capable d'établir une infection systémique chez la souris arriverait au niveau des glandes salivaires plus tardivement que chez *B. afzelii* et serait donc injectée plus tardivement dans la souris que *B. afzelii*.

Lorsque nous avons étudié l'expression des protéines de surface OspA et OspC dans les nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) nourries pendant 24h sur une souris saine, nous avons vu que les spirochètes expriment la protéine OspA, mais pas ou très peu l'OspC. La situation est très semblable à celle observée dans les nymphes à jeun ainsi qu'à celle observée dans les nymphes à jeun incubées pendant 24h à 37°C. Ce profil d'expression des protéines OspA et OspC chez les spirochètes, correspond à ce qui a été trouvé chez des *I. scapularis* infectées par *B. burgdorferi* ss et nourries pendant le même laps de temps [Schwan et al 1995] [De Silva et al 1996] [Schwan and Piesman 2000] [Ohnishi et al 2001]. Malheureusement nous n'avons pas pu étudier ce qui se passe plus tard car aucune des nymphes *I. ricinus* observées à 48h n'était infectée par *B. burgdorferi* ss et nous n'avons pas effectué ces observations chez des nymphes infectées par *B. afzelii*.

Pendant le repas sanguin de la tique infectée, nous avons observé les spirochètes dans l'intestin et dans les glandes salivaires, par contre nous n'avons jamais observé de spirochètes dans le synganglion, ce qui diffère de ce qui a été décrit dans d'autres travaux [Burgdorfer et al 1985] [Gern et al 1996] [Benach et al 1987] [Zhu 1998b] on ne sait pas si cela est dû à un problème technique.

Au cours de toutes ces expériences, nous avons toujours observé un nombre de spirochètes assez faible dans les tiques infectées par *B. burgdorferi* ss. En ce qui concerne les tiques infectées avec *B. afzelii*, les observations nous ont montré une très grande variabilité entre les différentes nymphes, que ce soit des nymphes à jeun ou prenant un repas sanguin. Nous n'avons pas assisté à une très forte multiplication des borrelies dans la tique au cours du repas. Les travaux sur *I. scapularis* infectée par *B. burgdorferi* ss, montrent pourtant une forte augmentation du nombre des spirochètes pendant le repas par des techniques de marquage histologique classique [Benach et al 1987] et par des marquages fluorescents [de Silva and Fikrig 1995] et aussi par des analyses moléculaires de la quantité de flagelline [Piesman et al 2001] [Hodzic et al 2002]. Nous pensons qu'il serait très intéressant de réaliser des études semblables à celles de Piesman et al [2001] et Hodzic et al [2002] sur la dynamique de populations de différentes génoespèces de *B. burgdorferi* si dans *I. ricinus* au cours du repas sanguin. Cela permettrait de déterminer si effectivement la quantité de spirochètes dans les tiques et leur multiplication sont d'autres différences existant entre *I. ricinus* et *I. scapularis* et leur relation avec les spirochètes.

En ce qui concerne la transmission de l'infection en fin de repas, c'est-à-dire à 72h et à 96h, nous avons observé un phénomène intéressant. Les nymphes *I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* ss transmettent l'infection à un plus faible nombre de souris par voie naturelle que si les mêmes tiques sont broyées et injectées. Cela signifie que les *B. burgdorferi* ss dans la tique sont très infectieuses, mais que la tique n'arrive pas à les transmettre avec une bonne efficacité. Ceci n'est pas le cas pour les nymphes *I. ricinus* infectées par *B. afzelii*, qui produisent une infection avec le même succès par voie naturelle que via injection du broyat [Crippa et al 2002]. Le fait que, comme on l'a vu auparavant, *I. ricinus* transmette *B. burgdorferi* ss plus tardivement que *B. afzelii* et que, à la fin du repas sanguin (72h et 96h), quand le taux de transmission de l'infection est le plus élevé [Piesman 1993] [Kahl et al 1998] [Des Vignes et al 2001] [Ohnishi et al 2001], *B. burgdorferi* ss soit transmise moins efficacement par piqûre de nymphes que par injection de broyat des mêmes tiques (ce qui n'est pas le cas pour *B. afzelii*), nous fait conclure que la tique *I. ricinus* est un meilleur vecteur pour *B. afzelii* que pour *B. burgdorferi* ss.

Dans l'étude sur l'établissement et la dissémination de l'infection par *B. burgdorferi* ss (ZS7) chez la souris nous avons observé une différence si la transmission était assurée seulement par des nymphes infectées ou si le lieu de fixation des nymphes était également stimulé par la présence de larves. Nous pensons que, à cause de la stimulation du site d'infection par la piqûre de larves, les souris soumises à ce traitement développeraient une infection systémique plus tardivement que celles qui n'avaient pas été stimulées par des larves. En fait nous avons observé l'inverse, c'est-à-dire que l'infection

systemique se presente avant chez les souris stimulees par la piqure des larves au lieu d'inoculation que chez celles qui ne sont pas stimulees par larves. En effet, 21j apres la fixation des nymphes infectantes, 7/10 souris qui avaient subi la stimulation par larves ont developpe une infection systemique, alors qu'aucune des 7 souris non soumises a la stimulation des larves n'a developpe d'infection systemique. Cette difference est statistiquement significative (Fisher's exact test $p=0.0098$). Dans une etude sur le cofeeding, Gern et Rais [1996] ont aussi observe que c'est a partir du 21^{eme} jour qu'une infection systemique se developpe chez les souris stimulees par larves. En ce qui concerne le temps de developpement de l'infection systemique chez la souris quand elle est piquee seulement par des nymphes infectees, nos resultats sont differents de ceux obtenus avec *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss. En effet, plusieurs travaux montrent que l'infection reste localisee au site d'inoculation pendant un temps variant de quelques jours a une semaine avant de devenir systemique [Shih et al 1992, 1993] [Hodzic et al 2002]. Par contre nous avons observe une infection systemique par *B. burgdorferi* ss (ZS7) chez les souris infectees par les nymphes, seulement a partir du 36^{eme} jour. Cette difference pourrait etre due aux differentes souches de souris utilisees dans les travaux (nous avons travaille avec des Balb/c et des AKR/N, Shih et al [1992 et 1993] avec des CD-1 et C3H/HeJ et Hodzic et al [2002] avec des C3H7HeN). En effet, Shih et al [1992 et 1993] ont montre que la vitesse de dissimulation de l'infection peut varier selon la souche de souris utilisee. Cependant il est possible que l'espece de tique utilisee, *I. ricinus* versus *I. scapularis*, puisse avoir influence le resultat. Peut-etre ceci constitue-t-il un autre facteur signalant qu'*I. ricinus* n'est pas un vecteur tres performant pour *B. burgdorferi* ss.

Nous avons observe que le succs de transmission de l'infection des nymphes aux souris n'est pas influence par la presence ou non des larves au site de fixation des nymphes. Par contre on sait que le succs de transmission de l'infection de la souris vers les tiques est augmente si non seulement des nymphes mais aussi des larves sont fixees sur la souris [Ogden et al 1998].

Dans le but de savoir s'il existe un risque d'infection pour une personne ecrasant une tique lorsqu'elle la detache d'un autre individu ou d'un animal a main nues, nous avons voulu voir si *B. burgdorferi* si est capable de traverser activement la peau intacte. Nous avons vu que l'application de nymphes infectees broyees sur la peau de souris rasee n'a jamais produit d'infection. Nous en concluons que *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* ne sont pas capables de traverser la peau intacte, comme cela est le cas de *B. duttoni* et *B. recurrentis* les agents de la fièvre récurrente à tiques et de la fièvre récurrente à poux respectivement [Burgdorfer 1951, 1976]. Toutefois il convient de rappeler que la peau de la souris etant intacte, on ne peut pas s'exprimer sur le risque encouru si les spirochetes venaient en contact avec une peau blessée, comme par exemple c'est le cas a l'endroit meme de la piqure de la tique. D'autant plus que l'on sait maintenant que les spirochetes dans les tiques sont infectieux avant d'etre transmis par voie naturelle.

4.3 Nymphes saines prenant un repas sanguin infectieux

Dans ce travail nous avons également étudié l'évolution de l'infection par *Borrelia* dans une nymphe saine se nourrissant sur une souris infectée. Nous avons observé qu'à 48h de repas sanguin sur la souris, les nymphes *I. ricinus* avaient une membrane péritrophique déjà formée. Cela confirme les résultats de Zhu et al [1991] sur des nymphes nourries sur lapin et ayant une membrane péritrophique dès 18h de repas. Nous n'avons cependant pas trouvé de spirochètes *B. burgdorferi* ss (ZS7) dans les nymphes *I. ricinus* qui s'étaient nourries sur une souris infectée pendant 24h (n=0/8), il nous a fallu attendre 48h de repas sanguin pour pouvoir observer *B. burgdorferi* ss dans *I. ricinus*. Les études effectuées à ce sujet concernent *I. scapularis*. Chez les larves, les spirochètes sont généralement détectés déjà à 24h de nutrition [De Silva et al 1997 ; Hodzic et al 2002] ou, comme montré par Piesman [1991] même avant, c'est-à-dire dès 8h de nutrition. Seul le travail de Nakayama et Spielman [1989] décrit une infection plus tardivement, soit après 48h de repas sanguin. Chez les nymphes *I. scapularis*, l'infection dans les tiques saines se nourrissant sur une souris infectée est aussi détectée déjà à partir de 16h de fixation [Shih et Spielman 1993] ou 24h [Schwan and Piesman 2000 ; Hodzic et al 2002]. L'ingurgitation de *B. burgdorferi* ss a donc lieu plus tardivement pour *I. ricinus* que pour *I. scapularis*. En ce qui concerne l'expression des protéines de surface OspA et OspC par *B. burgdorferi* ss dans *I. ricinus* après 24h de repas, nous n'avons pas pu l'étudier car aucune tique n'était infectée. Chez *I. scapularis* après 24h de repas les spirochètes expriment la protéine de surface OspA [Schwan and Piesman 2000 ; Hodzic et al 2002]. Comme dans la peau de l'hôte au site de fixation il n'y a pas de transcription de l'OspA, il en résulte que l'OspA est une protéine régulée à l'intérieur de la tique [Hodzic et al 2002].

Lorsque *I. ricinus* prend un repas infectieux sur une souris infectée par *B. afzelii*, les borrelies sont détectées plus tôt dans l'intestin de la tique que si *I. ricinus* prend un repas infectieux sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss. En effet, nous avons trouvé qu'après 24h déjà de nutrition sur une souris infectée par *B. afzelii*, les nymphes étaient infectées (n=5/8). De plus une tique a montré une infection au niveau de l'ampoule rectale. La différence pour les tiques infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7) ou par *B. afzelii* (NE 2961) après 24h de nutrition est statistiquement significative (0/8 versus 5/8 : Fisher's exact test p=0.0256). Il faudrait déterminer si cette différence est due réellement à l'espèce de *Borrelia* ou si elle est due aux souches utilisées pendant cette étude.

Après 48h de nutrition les nymphes se nourrissant sur la souris infectée par *B. burgdorferi* ss commencent à être infectées. Etonnamment les glandes salivaires des nymphes nourries pendant 48h sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss ou *B. afzelii* ne sont toujours pas infectées (0/22 tiques). Ceci contraste avec le résultat obtenu pour les nymphes infectées prenant un repas sanguin non infectieux pendant 48h (7/24 tiques). Cette différence est statistiquement significative (Fisher's exact test p=0.0097).

Nous n'avons pas trouvé de spirochètes dans l'intestin des tiques utilisées pour observer l'expression des protéines de surface par *B. burgdorferi* ss (ZS7), ce qui nous a empêché de savoir quelles protéines étaient exprimées par les borrelies à ce moment-là dans la tique *I. ricinus*. Chez les

nymphes *I. scapularis*, Hodzic et al [2002] ont observé que c'est à partir de 48h qu'une transcription de l'OspC commence à être observée.

Après 72h de nutrition nous avons continué à voir des spirochètes logés dans l'intestin des tiques se nourrissant sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss, mais encore une fois aucun spirochète n'était localisé dans les glandes salivaires. Nous n'avons pas pu avoir de données comparables pour des nymphes *I. ricinus* se nourrissant sur une souris infectée par *B. afzelii* (NE 2961) pendant le même laps de temps. Néanmoins, nous avons analysé l'emplacement des spirochètes dans des tiques nourries sur des souris infectées par d'autres isolats de *B. afzelii* (NE 3932 ou NE 3933) jusqu'à engorgement (drop-off) ou une dizaine de jours après drop-off. Ici aussi l'infection a été détectée dans l'intestin mais pas dans les glandes salivaires. Nous en concluons que, dans le cas de nymphes prenant l'infection pour la première fois en se nourrissant sur une souris infectée, jamais les spirochètes ne migrent dans les glandes salivaires ce qui est totalement différent du cas où les nymphes déjà infectées se nourrissent sur une souris saine [Zung et al. 1989, Gern et al. 1990, Gern et al. 1996] [Zhu 1998b] [De Silva and Fikrig 1995] [Ohnishi et al 2001]. Ce fait minimise l'expérience entreprise pour voir si les spirochètes pouvaient traverser la membrane péritrophique, car pour voir cela, nous avons regardé si l'infection s'étendait aux glandes salivaires chez des nymphes ayant une membrane péritrophique formée dans leur intestin lors du repas infectieux. En effet, le fait qu'aucune glande salivaire n'ait montré d'infection chez les nymphes gorgées, n'a pas pu être attribué à la présence d'une membrane péritrophique préinduite puisque l'infection des glandes salivaires n'a pas non plus été détectée chez les nymphes nourries sans préinduction de la membrane.

Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux des travaux faits sur *I. scapularis* car dans ces travaux les glandes salivaires des tiques n'ont pas été analysées pour rechercher la présence de spirochètes [Nakayama et Spielman 1989 ; Piesman 1991 ; Shih and Spielman 1993 ; De Silva et al 1997 ; Schwan and Piesman 2000 ; Hodzic et al 2002]. Dans nos travaux nous n'avons jamais trouvé de *Borrelia* dans les glandes salivaires. Il est logique de penser que les borrelies n'ont aucun intérêt à entreprendre une migration jusqu'aux glandes salivaires pour se retrouver ensuite dans l'hôte d'où elles proviennent. De plus les glandes salivaires ne sont pas un bon organe cible pour éventuellement survivre dans la tique lors de la mue, car elles dégénèrent à la fin du repas sanguin [Sonenshine et al 1991].

Piesman [1991] dans l'étude sur l'acquisition de l'infection par les larves *I. scapularis* a vu que les larves détachées d'un premier hamster sur lequel elles s'étaient infectées et ensuite replacées sur un autre hamster après 5 semaines n'ont pas pu transmettre l'infection. Par contre, cela semble différent pour les nymphes d'*I. scapularis* qui après un premier repas infectieux et partiel sur une souris se fixent sur une autre souris, car ces nymphes, malgré un intervalle de plusieurs jours entre un repas et l'autre arrivent à transmettre l'infection [Shih and Spielman 1993]. Si on ajoute à ça le fait que nous n'avons pas trouvé de borrelies au niveau des glandes salivaires chez les nymphes prenant un repas infectieux, nous en concluons que les borrelies qui viennent de rentrer dans une tique attendent un nouveau repas sanguin pour migrer jusqu'aux glandes salivaires. Zhu [1998a] a suggéré que les

spirochètes ne peuvent pas passer à travers la membrane péritrophique, car chez des tiques infectées prenant un repas, les borrelies se trouvaient des deux côtés de la membrane péritrophique [Zung et al 1989] et que 15j après le repas les spirochètes qui se trouvaient à l'extérieur de la membrane péritrophique étaient devenus systémiques et que ceux qui étaient à l'intérieur de cette membrane y étaient restés confinés. Comme cette membrane se forme en structure continue chez *I. ricinus* pas plus tard que 18h après le début du repas [Zhu et al 1991], il est théoriquement possible que les borrelies qui pénètrent pour la première fois dans une tique saine se trouvent confrontées à cette membrane qui les empêche de disséminer dans les glandes salivaires et même ailleurs. En effet les spirochètes dans les nymphes s'infectant au cours d'un premier repas infectieux restent confinés dans le système digestif.

Le confinement des spirochètes dans le système digestif pourrait également avoir une autre explication. Il est possible que les borrelies entrant dans la tique ne soient pas adaptées à la migration et que, pour que cela arrive, il leur faille un stimulus comme, par exemple, un nouveau repas qui pourrait induire une modification physiologique chez les borrelies. En effet, lorsqu'on travaille avec des borrelies qui ne proviennent pas de l'hôte, comme des *Borrelia* en culture, l'infection dans la tique peut se développer différemment. Fingerle et al [2002] ont récemment étudié la dissémination de *B. afzelii* et *B. garinii* dans des nymphes *I. ricinus* nourries par capillaire. Dans cette étude, les bactéries ont migré dans les glandes salivaires, mais à condition que la protéine OspC soit exprimée par la souche utilisée. Il faut rappeler que l'infection par capillaire des tiques permet d'administrer aux tiques des souches connues et ayant un profil protéinique défini. Toutefois, il s'agit d'une technique qui ne peut être assimilée à la voie naturelle d'infection. En effet, les conditions physiologiques auxquelles les spirochètes sont soumis dans le milieu de culture diffèrent de celles observées dans la peau de l'hôte. C'est peut-être ce qui explique pourquoi ces spirochètes administrés par capillaire aux nymphes ont migré dans les glandes salivaires alors que dans notre étude les nymphes prenant l'infection sur une souris infectée n'ont pas montré d'infection dans cet organe. On pourrait en déduire que la protéine de surface OspC joue un rôle important dans la migration des spirochètes vers les glandes salivaires d'où ils sont ensuite transmis à l'hôte. De plus, Schwan et Piesman [2000] ont montré que dans l'intestin des tiques prenant pour la première fois l'infection, aucun spirochète n'exprimait l'OspC à la fin du repas sanguin, ce qui diffère de ce qui est observé chez les tiques déjà infectées et se nourrissant sur un hôte sain. En effet, si on regarde les études sur les tiques infectées se nourrissant sur une souris saine, et que l'on compare l'expression de l'OspC pendant la nutrition de la tique et la dissémination de l'infection dans la tique, on constate une corrélation entre la présence de cette protéine et la migration vers les glandes salivaires [Schwan et al 1995 ; De Silva and Fikrig 1995, 1996, 1999 ; Gilmore and Piesman 2000 ; Schwan and Piesman 2000].

Cependant dans un travail récent Hodzic et al [2002] ont détecté dans les tiques saines se nourrissant sur un hôte infecté la transcription de la protéine OspC. De plus, dans des travaux sur les tiques infectées prenant un repas sain, Fingerle et al [1998, 2002] et Ohnishi et al [2001], ont montré que plusieurs populations de spirochètes présentant des profils protéiniques différents sont présentes dans les tiques (seulement OspA+, seulement OspC+ ou OspA+ et OspC+ ou encore OspA- et OspC-). Lors des observations, des borrelies n'exprimant pas d'OspC ont été mises en évidence dans

les glandes salivaires de ces tiques. Tout cela suggère que d'autres facteurs doivent certainement être impliqués dans la migration des borréliés à l'intérieur de la tique, comme par exemple le « plasminogen » qui est apparemment nécessaire pour une dissémination efficace des spirochètes dans la tique [Coleman et al 1997].

En résumé, nous avons observé que la température à elle seule est un facteur capable de déclencher l'infectiosité des borréliés dans *I. ricinus* à jeun.

Comme montré par Kahl et al [1998], nous avons aussi remarqué que la transmission de *Borrelia* par *I. ricinus* à l'hôte peut se produire relativement vite par rapport aux différentes études effectuées aux Etats-Unis avec *I. scapularis*. Nous avons pu mettre en évidence que cette différence est en relation avec la génoespèce transmise. Nous avons observé que *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* établissent une relation différente avec la tique *I. ricinus* et que cela influence le développement de l'infection dans la tique et la vitesse de la prise d'infection par la tique suivant qu'elle se nourrit sur un hôte infecté par l'une ou l'autre de ces génoespèces. Il semble donc que la dynamique de transmission est variable d'une génoespèce à l'autre. On peut se demander si le fait d'avoir travaillé avec des micromammifères a pu influencer la meilleure relation que *B. afzelii* semble avoir établi avec *I. ricinus* par rapport à *B. burgdorferi* ss. En effet sur le continent européen il a été mis en évidence que dans la nature *B. afzelii* est associée avec les petits mammifères [Humair et al 1995,1999] [Hu et al 1997]. Mais d'un autre côté une étude américaine a montré qu'il est difficile d'infecter *I. ricinus* avec *B. burgdorferi* ss alors que cela ne l'était pas pour *I. scapularis* [Dolan et al 1998].

Nous pensons qu'il serait utile d'effectuer plusieurs études sur la tique *I. ricinus* et les différentes génoespèces circulants en Europe pour améliorer les connaissances dans ce domaine. Ceci permettrait de développer ensuite des stratégies de prévention.

Plusieurs questions restent ouvertes et méritent d'être étudiées dans le futur. Une étude d'ordre moléculaire sur les borréliés qui se trouvent dans l'intestin de tiques à jeun par rapport à celles présentes dans les tiques à jeun incubées 24h à 37°C, permettrait d'identifier le ou les changements moléculaires nécessaires aux spirochètes pour l'établissement d'une infection dans la souris. De plus on estime qu'il serait intéressant d'approfondir notre étude sur l'expression des protéines de surface des borréliés dans les tiques lors du repas sanguin. Dans ce but l'utilisation d'un microscope confocal de nouvelle génération permettrait une meilleure visualisation de plusieurs fluorophores.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Alekseev, A. N. and H. V. Dubinina.** 1996. Exchange of *Borrelia burgdorferi* between *Ixodes persulcatus* (Ixodidae: Acarina) sexual partners. J.Med.Entomol. **33**:351-354.
- Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, S. G. T. Rijpkema, and L. M. Schouls.** 1999. Sexual transmission of *Borrelia garinii* by male *Ixodes persulcatus* ticks (Acari, Ixodidae). Exp.Appl.Acarol. **23**:165-169.
- Balashov, Y. S.** 1983. Salivary glands, p. 98-128. In An atlas of Ixodid tick ultrastructure. Entomological Society of America.
- Baranton, G. and I. G. Old.** 1995. The spirochetes: a different way of life. Bull.Inst.Pasteur **93**:63-95.
- Baranton, G., D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J. C. Piffaretti, M. Assous, and P. A. D. Grimont.** 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov.; and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int.J.Syst.Bacteriol. **42**:378-383.
- Baranton, G., G. Seinost, G. Theodore, D. Postic, and D. Dykhuizen.** 2001. Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. Res.Microbiol. **152**:149-156.
- Barbour, A. G.** 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Lyme Disease 1rst Int.Symp.Ed.Steere et al. 71-75.
- Barbour, A. G., W. Burgdorfer, S. F. Hayes, O. Peter, and A. Aeschlimann.** 1983. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. Curr.Microbiol. **8**:123-126.
- Barbour, A. G. and S. F. Hayes.** 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol.Rev. **50**:381-400.
- Barbour, A. G., S. F. Hayes, R. A. Heiland, M. E. Schrumpf, and S. L. Tessier.** 1986. A *Borrelia* genus-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. Infect.Immun. **52**:549-554.
- Barbour, A. G., R. A. Heiland, and T. R. Howe.** 1985. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease Borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. J.Infect.Dis. **152**:478-484.
- Barbour, A. G., S. L. Tessier, and S. F. Hayes.** 1984. Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. Infect.Immun. **45**:94-100.
- Benach, J. L., J. L. Coleman, R. A. Skinner, and E. M. Bosler.** 1987. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. J.Infect.Dis. **155**:1300-1306.
- Bergman, D. K., R. N. Ramachandra, and Wikel S.K.** 1998. Characterization of an immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary glands. J. Med. Entomol. **35**:505-509.
- Bergström S., Noppa L., Gylfe Å., and Östberg Y.** 2002. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato., p. 47-90. In Lyme borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Brandt, M. E., B. S. Riley, J. D. Radolf, and M. V. Norgard.** 1990. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. Infect.Immun. **58** :983-991.

- Bellet-Edimo O.R.** 1997. Importance de la transmission transstadiale 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. Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse, 123 p.
- Burgdorfer, W.** 1951. Analyse des Infektionsverlaufes bei *Ornithodoros moubata* (Murray) und der natürlichen Uebertragung von *Spirochaeta duttoni*. Acta Tropica. **8**:193-262.
- Burgdorfer, W.** 1976. The epidemiology of the relapsing fevers, p. 191-234. In The biology of parasitic spirochetes. Academic press, New York.
- Burgdorfer, W., J. F. Anderson, L. Gern, R. S. Lane, L. Piesman, and A. Spielman.** 1991. Workshop summary. Relationship of *Borrelia burgdorferi* to its arthropod vectors. Scand.J.Infect.Dis. **23**:35-40.
- Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, and J. P. Davis.** 1982. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? Science **216**:1317-1319.
- Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, O. Peter, and A. Aeschlimann.** 1983. Erythema chronicum migrans - a tickborne spirochetosis. Acta Trop. **40**:79-83.
- Burgdorfer, W. and S. F. Hayes .** 1989. Vector-spirochete relationships in louse-borne and tick-borne borrelioses with emphasis on Lyme disease. Adv.Dis.Vector Res. **6** :127-150.
- Burgdorfer, W., S. F. Hayes, and J. L. Benach.** 1988. Development of *Borrelia burgdorferi* in ixodid tick vectors. Ann.N.Y.Acad.Sci. **539**:172-179.
- Burgdorfer, W., S. F. Hayes, and D. Corwin.** 1989. Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Ixodid ticks. Rev.Infect.Dis. **11**:S1442-1450.
- Burgdorfer, W., R. S. Lane, A. G. Barbour, R. A. Gresbrink, and J. R. Anderson.** 1985. The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. Am.J.Trop.Med.Hyg. **34**:925-930.
- Burkot, T. R., G. O. Maupin, B. S. Schneider, C. Denatale, C. M. Happ, J. S. Rutherford, and N. S. Zeidner.** 2001. Use of a sentinel host system to study the questing behavior of *Ixodes spinipalpis* and its role in the transmission of *Borrelia bissettii*, human granulocytic ehrlichiosis, and *Babesia microti*. Am.J.Trop.Med.Hyg. **65**:293-299.
- Canica, M. M., F. Nato, L. Du Merle, J. C. Mazie, G. Baranton, and D. Postic.** 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand.J.Infect.Dis. **25**:441-448.
- Casjens, S., N. Palmer, R. Van Vugt, W. M. Huang, B. Stevenson, P. Rosa, R. Lathigra, G. Sutton, J. Peterson, R. J. Dodson, D. Haft, E. Hickey, M. Gwinn, O. White, and C. M. Fraser.** 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Mol.Microbiol. **35**:490-516.
- Coleman, J. L., J. L. Benach, G. Beck, and G. S. Habicht.** 1986. Isolation of the outer envelope from *Borrelia burgdorferi*. Zentbl.Bakt.Hyg.A. **263**:123-126.
- Coleman, J. L., J. A. Gebbia, J. Piesman, J. L. Degen, T. H. Bugge, and J. L. Benach.** 1997. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. Cell **89**:1111-1119.
- Coons L.B. and Alberti G.** 1999. Microscopic anatomy of invertebrates. Volume 8B. Wiley-Liss publication, New York.

- Crippa, M., O. Rais, and L. Gern.** 2002. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* **2**:3-9.
- De Silva, A. M. and E. Fikrig.** 1995. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **53**:397-404.
- De Silva, A. M., D. Fish, T. R. Burkot, Y. Zhang, and E. Fikrig.** 1997. OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks. *Infect.Immun.* **65**:3146-3150.
- De Silva, A. M., S. R. Telford III, L. R. Brunet, S. W. Barthold, and E. Fikrig.** 1996. *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J.Exp.Med.* **183**:271-275.
- De Silva, A. M., N. S. Zeidner, Y. Zhang, M. C. Dolan, J. Piesman, and E. Fikrig.** 1999. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect.Immun.* **67**:30-35.
- Des Vignes, F., J. Piesman, R. Heffernan, T. L. Schulze, K. C. Stafford III, and D. Fish.** 2001. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J.Infect.Dis.* **183**:773-778.
- Dolan, M. C., J. Piesman, M. L. Mbow, G. O. Maupin, O. Peter, M. Brossard, and W. T. Golde.** 1998. Vector competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for three genospecies of *Borrelia burgdorferi*. *J.Med.Entomol.* **35**:465-470.
- Eisemann, C. H. and K. C. Binnington.** 1994. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int.J.Parasitol.* **24**:15-26.
- Farlow, J., D. Postic, K. L. Smith, Z. Lay, G. Baranton, and P. Keim.** 2002. Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J.Clin.Microbiol.* **40**:4612-4618.
- Felsenfeld, O.** 1971. Human borreliosis, p. 3-98. In *Borrelia*. Strains, vectors, human and animal borreliosis. Warren H. Green, St. Louis.
- Fikrig, E., S. R. Telford III, R. Wallich, M. Chen, Y. Lobet, F. R. Matuschka, R. B. Kimsey, F. S. Kantor, S. W. Barthold, A. Spielman, and R. A. Flavell.** 1995. Vaccination against Lyme disease caused by diverse *Borrelia burgdorferi*. *J.Exp.Med.* **181**:215-221.
- Fingerle, V., U. Hauser, G. Liegl, B. Petko, V. Preac-Mursic, and B. Wilske.** 1995. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J.Clin.Microbiol.* **33**:1867-1869.
- Fingerle, V., G. Liegl, U. Munderloh, and B. Wilske.** 1998. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. *Med.Microbiol.Immunol.* **187**:121-126.
- Fingerle, V., S. Rauser, B. Hammer, O. Kahl, C. Heimerl, U. Schulte-Spechtel, L. Gern, and B. Wilske.** 2002. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J.Clin.Microbiol.* **40**:1456-1463.
- Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbusch, S. Salzberg, M. Hanson, R. Van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, and Et Al.** 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390** :580-586.

- Fuchs, R., S. Jauris, F. Lottspeich, V. Preac-Mursic, B. Wilske, and E. Soutschek.** 1992. Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **6**:503-509.
- Fukunaga, M., A. Hamase, K. Okada, and M. Nakao.** 1996. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol.Immunol.* **40**:877-881.
- Gern L., Diehl P.A., Humair P.F., Vlimant M., Barton T.R., Nuttall P.A. & Randolph S.E.** 1995. Examination of Eurasian *Ixodes* species for evidence of a peritrophic membrane. *In* Proceedings of the Second International Conference on Tick-borne Pathogens at the Host Vector Interface : A global perspective, Kruger National Park, South Africa. L. Coons and M. Rotschild (eds.), p.359-360.
- Gern, L., C. M. Hu, P. Voet, P. Hauser, and Y. Lobet.** 1997a. Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against *Ixodes ricinus* tick bites infected by *Borrelia burgdorferi* ss, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*. *Vaccine* **15**:1551-1557.
- Gern, L. and P. F. Humair.** 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe, p. 149-174. *In* Lyme borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Gern, L., N. Lebet, and J. Moret.** 1996. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. *Exp.Appl.Acarol.* **20**:649-658.
- Gern, L. and O. Rais.** 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J.Med.Entomol.* **33**:189-192.
- Gern, L., E. Rouvinez, L. N. Toutoungi, and E. Godfroid.** 1997b. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol.* **44**:309-314.
- Gern, L., L. N. Toutoungi, C. M. Hu, and A. Aeschlimann.** 1991. *Ixodes* (*Pholeoixodes*) *hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med.Vet.Entomol.* **5**:431-435.
- Gern, L., Z. Zhu, and A. Aeschlimann.** 1990. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Annls.Parasitol.Hum.Comp.* **65**:89-93.
- Gigon F.** 1985. Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le Plateau Suisse - Une contribution à l'écologie de ce vecteur. Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse, 238 p.
- Gilmore, R. D. and J. Piesman.** 2000. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. *Infect.Immun.* **68**:411-414.
- Gilmore, R. D. Jr., M. L. Mbow, and B. Stevenson.** 2001. Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Microbes Infect.* **3**:799-808.
- Girardin, P.** 1986. Immunité du lapin contre la tique (*Ixodes ricinus* L.) (Ixodoidea, Ixodidae) : mécanismes effecteurs et leus effets sur la biologie de l'ectoparasite. Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse, 418 p.
- Golde, W. T., K. J. Kappel, G. Dequesne, C. Feron, D. Plainchamp, C. Capiiau, and Y. Lobet.** 1994. Tick transmission of *Borrelia burgdorferi* to inbred strains of mice induces an antibody response to P39 but not to outer surface protein A. *Infect.Immun.* **62**:2625-2627.
- Graf, J. F.** 1978. Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae) 1ère partie. *Bull.Soc.Entomol.Suisse* **51**:89-93.

- Hodzic, E., S. Feng, K. J. Freet, D. L. Borjesson, and S. W. Barthold.** 2002. *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. *Infect.Immun.* 3382-3388.
- Hoogstraal, H. and A. Aeschlimann.** 1982. Tick-host specificity. *Bulletin de la société entomologique suisse* 55:5-32.
- Hovind-Hougen, K.** 1984. Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *Lyme Disease 1rst Int.Symp.*Ed.Steere et al. 93-98.
- Hu, C. M., P. F. Humair, R. Wallich, and L. Gern.** 1997. *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zentbl.Bakt.* 285:558-564.
- Hu, C. M., B. Wilske, V. Fingerle, Y. Lobet, and L. Gern.** 2001. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J.Clin.Microbiol.* 39:1169-1171.
- Humair, P. F., O. Peter, R. Wallich, and L. Gern.** 1995. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *J.Med.Entomol.* 32:433-438.
- Humair, P. F., O. Rais, and L. Gern.** 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* 118:33-42.
- Hurme, R. and M. Rhen.** 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation-what it all boils down to. *Mol.Microbiol.* 30:1-6.
- Johnson R.C. and Norton Hughes C.A.** 1992. The genus *Borrelia*., p. 3560-3567. *In The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York, USA.
- Johnson, R. C., G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 34:496-497.
- Kahl, O., C. Janetzki-mittmann, J. S. Gray, R. Jonas, J. Stein, and R. De Boer.** 1998. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentbl.Bakt.* 287:41-52.
- Kawabata, H., T. Masuzawa, and Y. Yanagihara.** 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol.Immunol.* 37:1-6.
- Keirans J.E., King D.S., and Sharrad R.D.** 1994. *Aponomma* (*Bothriocroton*) *glebopalma*, n. subgen., n. sp., and *Amblyomma glauerti* n. sp. (Acari: Ixodida: Ixodidae), parasites of monitor lizards (Varanidae) in Australia. *J.Med.Entomol.* 31:132-147.
- Klompfen H., Dobson S.J., and Barker S.C.** 2002. A new subfamily, Bothriocrotoninae n. subfam., for the genus *Bothriocroton* Keirans, King & Sharrad, 1994 status amend. (Ixodida: Ixodidae), and the synonymy of *Aponomma* Neumann, 1899 with *Amblyomma* Koch, 1944. *Syst.Parasitol.* 53:101-107.
- Kurtenbach, K., A. Dizij, H. M. Seitz, G. Margos, S. E. Moter, M. D. Kramer, R. Wallich, U. E. Schaible, and M. M. Simon.** 1994. Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Infect.Immun.* 62:5344-5352.
- Lam, T. T., T. P. K. Nguyen, R. R. Montgomery, F. S. Kantor, E. Fikrig, and R. A. Flavell.** 1994. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect.Immun.* 62:290-298.

- Lane, R. S. and W. Burgdorfer.** 1987. Transovarial and transstadial passage of *Borrelia burgdorferi* in the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari:Ixodidae). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **37**:188-192.
- Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Peter, and G. Baranton.** 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **47**:921-925.
- Lebet, N. and L. Gern.** 1994. Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp.Appl.Acarol.* **18**:177-183.
- Leboulle, G., M. Crippa, Y. Decrem, N. Mejri, M. Brossard, A. Bollen, and E. Godfroid.** 2002. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* **277**:10083-10089.
- Leuba-Garcia, S., M. D. Kramer, R. Wallich, and L. Gern.** 1994. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. *Int.J.Med.Microbiol.Virol.Parasitol.Infect.Dis.* **280**:468-475.
- Leuba-Garcia, S., R. Martinez, and L. Gern.** 1998. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and the skin of mice. *Zentbl.Bakt.* **287**:475-484.
- Magnarelli, L. A., J. F. Anderson, and D. Fish.** 1987. Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J.Infect.Dis.* **156**:234-236.
- Marconi, R. T., D. Liveris, and I. Schwartz.** 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism pattern, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analysis of rRNA genes and their intergenetic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J.Clin.Microbiol.* **33**:2427-2434.
- Masuzawa, T. T. N., M. Kudeken, T. Fukui, Y. Yano, F. Ishiguro, Y. Kawamura, Y. Imai, and T. Ezaki.** 2001. *Borrelia sinica* sp nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**:1817-1824.
- Matsuo T., Sato M., Inoue N., Yokoyama N., Taylor D., and Fujisaki K.** 2003. Morphological studies on the extracellular structure of the midgut of a tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *Parasitol.Res.* Online publication.
- Mbow, ML., M. Christe, B. Rutti, and M. Brossard.** 1994. Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in Balb/c mice developing cutaneous reactions. *J.Parasitol.* **80**:80-87.
- Monin, R., L. Gern, and A. Aeschlimann.** 1989. A study of the different modes of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*. Lyme Borreliosis II, *Zentbl.Bakt.* **suppl.18**:14-20.
- Nakayama, Y. and A. Spielman.** 1989. Ingestion of Lyme disease spirochetes by ticks feeding on infected hosts (letter). *J.Infect.Dis.* **160**:166-167.
- Norris, S. J., C. J. Carter, J. K. Howell, and A. G. Barbour.** 1992. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect.Immun.* **60**:4662-4672.
- Obonyo, M., U. G. Munderloh, V. Fingerle, B. Wilske, and T. J. Kurtti.** 1999. *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *J.Clin.Microbiol.* **37**:2137-2141.
- Obonyo, M., U. G. Munderloh, T. N. Sam, and T. J. Kurtti.** 2002. Cultivation at 37 degreeC enhances *Borrelia burgdorferi* sensu stricto infectivity for hamsters. *Med.Microbiol.Immunol.* **191**:33-39.

- Ogden, N. H., K. Kurtenbach, and P. A. Nuttall.** 1998. Interstadial and infestation level-dependent variation in the transmission efficiency of *Borrelia burgdorferi* from mice to *Ixodes ricinus* ticks. *Exp.Appl.Acarol.* **22**:367-372.
- Ohnishi, J., J. Piesman, and A. M. de Silva.** 2001. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**:670-675.
- Pal, U., A. M. De Silva, R. R. Montgomery, D. Fish, J. Anguita, J. F. Anderson, Y. Lobet, and E. Fikrig.** 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J.Clin.Invest.* **106**:561-569.
- Peacock, M., W. Burgdorfer, and R. A. Ormsbee.** 1971. Rapid fluorescent-antibody conjugation procedure. *Infect.Immun.* **3**:355-357.
- Peters, W.** 1992. Peritrophic membranes. Springer-Verlag, Berlin.
- Picken, R. N., Y. Cheng, F. Strle, and M. M. Picken.** 1996. Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *J.Infect.Dis.* **174**:1112-1115.
- Piesman, J.** 1995. Dispersal of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to salivary glands of feeding nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J.Med.Entomol.* **32**:519-521.
- Piesman, J.** 1993. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J.Infect.Dis.* **167**:1082-1085.
- Piesman, J.** 1991. Experimental acquisition of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) during partial blood meals. *J.Med.Entomol.* **28**:259-262.
- Piesman, J., T. N. Mather, R. J. Sinsky, and A. Spielman.** 1987. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J.Clin.Microbiol.* **25**:557-558.
- Piesman, J., J. R. Oliver, and R. J. Sinsky.** 1990. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **42**:352-357.
- Piesman, J., B. Schneider, and N. S. Zeidner.** 2001. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J.Clin.Microbiol.* **39**:4145-4148.
- Pollack, R. J., S. R. Telford III, and A. Spielman.** 1993. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J.Clin.Microbiol.* **31**:1251-1255.
- Postic, D., M. V. Assous, P. A. D. Grimont, and G. Baranton.** 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **44**:743-752.
- Postic, D., J. Belfaiza, E. Isogai, I. Saint Girons, P. A. D. Grimont, and G. Baranton.** 1993. A new genomic species in *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from Japanese ticks. *Res.Microbiol.* **144**:467-473.
- Postic, D., C. Edlinger, C. Richaud, F. Grimont, Y. Dufresne, P. Perolat, G. Baranton, and P. A. Grimont.** 1990. Two genomic species in *Borrelia burgdorferi*. *Res.Microbiol.* **141**:465-475.
- Postic, D., N. Marti Ras, R. S. Lane, M. Henderson, and G. Baranton.** 1998. Expanded diversity among californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J.Clin.Microbiol.* **36**:3497-3504.
- Randolph, S. E., L. Gern, and P. A. Nuttall.** 1996. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol.Today* **12**:472-479.

- Ribeiro, J. M. C., T. N. Mather, J. Piesman, and A. Spielman.** 1987. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *J.Med.Entomol.* **24**:201-205.
- Rudzinska, M. A., S. Lewengrub, A. Spielman, and Piesman J.** 1983. Invasion of *Babesia microti* into epithelial cells of the tick gut. *J.Protozool.* **30**:338-346.
- Rudzinska, M. A., A. Spielman, S. Lewengrub, Piesman J., and Karakashian S.** 1982. Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*. *Cell Tissue Res.* **221**:471-481.
- Schaible, U. E., M. D. Kramer, C. Museteanu, G. Zimmer, H. Mossmann, and M. M. Simon.** 1989. The severe combined immunodeficiency (scid) mouse: a laboratory model for the analysis of Lyme arthritis and carditis. *J.Exp.Med.* **170**:1427-1432.
- Schmid, G. P., A. G. Steigerwalt, S. E. Johnson, A. G. Barbour, A. C. Steere, I. M. Robinson, and D. J. Brenner.** 1984. DNA characterization of the spirochete that causes Lyme disease. *J.Clin.Microbiol.* **20**:155-158.
- Schmidt, G. D. and L. S. Roberts.** 1985. Foundation of parasitology. Times Mirror/Mosby college Publishing.
- Schneider, B. S., N. S. Zeidner, T. R. Burkot, G. O. Maupin, and J. Piesman.** 2000. *Borrelia* isolates in northern Colorado identified as *Borrelia bissettii*. *J.Clin.Microbiol.* **38**:3103-3105.
- Schwan, T. G. and J. Piesman.** 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J.Clin.Microbiol.* **38**:382-388.
- Schwan, T. G., J. Piesman, W. T. Golde, M. C. Dolan, and P. A. Rosa.** 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **92**:2909-2913.
- Schwartz, J. J., A. Gazumyan, and I. Schwartz.** 1992. rRNA Gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J.Bacteriol.* **174**:3757-3765.
- Scoles G.A, Papero M., Beati L., and Fish D.** 2001. A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. *Vector borne and zoonotic diseases.* **1**: 21-34.
- Seinost, G., D. E. Dykhuizen, R. J. Dattwyler, W. T. Golde, J. J. Dunn, I. N. Wang, G. P. Wormser, M. E. Schrieffer, and B. J. Luft.** 1999. Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. *Infect.Immun.* **67**:3518-3524.
- Shih, C. M., R. J. Pollack, S. R. Telford III, and A. Spielman.** 1992. Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice. *J.Infect.Dis.* **166**:827-831.
- Shih, C. M. and A. Spielman.** 1993. Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. *J.Clin.Microbiol.* **31**:2878-2881.
- Shih, C. M., S. R. Telford III, R. J. Pollack, and A. Spielman.** 1993. Rapid dissemination by the agent of Lyme disease in hosts that permit fulminating infection. *Infect.Immun.* **61**:2396-2399.
- Simon, M. M., U. E. Schaible, R. Wallich, and M. D. Kramer.** 1991. A mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection: approach to a vaccine against Lyme disease. *Immunol.Today* **12**:11-16.
- Sinsky, R. J. and J. Piesman.** 1989. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J.Clin.Microbiol.* **27**:1723-1727.
- Sonenshine, D. E.** 1991. Biology of ticks. Oxford University Press, Oxford.

- Stanek, G., F. Strle, J. Gray, and G. P. Wormser.** 2002. History and characteristics of Lyme borreliosis, p. 1-28. *In* Lyme borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Steere, A. C.** 1989. Lyme disease. *New Engl.J.Med.* **321**:586-596.
- Steere, A. C., T. F. Broderick, and S. E. Malawista.** 1978. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am.J.Epidemiol.* **108**:312-321.
- Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, and F. M. Steele.** 1977. Lyme arthritis : an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arth.Rheum.* **20**:7-17.
- Stevenson, B., T. G. Schwan, and P. A. Rosa.** 1995. Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect.Immun.* **63**:4535-4539.
- Strle, F., R. N. Picken, Y. Cheng, J. Cimperman, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, E. Ruzic-Sabljic, and M. M. Picken.** 1997. Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clin.Infect.Dis.* **25**:273-280.
- Taxonomic outline of the procariotic genera**, p. 155-166. *In* Bergey's manual of systematic bacteriology.2001. Spriger-Verlag, New York.
- Valenzuela, J. G., R. Charlab, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro.** 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* **275**:18717-18723.
- Valenzuela, J. G., I. M. B. Francischetti, V. M. Pham, M. K. Garfield, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro.** 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J.Exp.Biol.* **205**:2843-2864.
- Van Dam, A. P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. De Jongh, L. Spanjaard, A. C. P. Ramselaar, M. D. Kramer, and J. Dankert.** 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin.Infect.Dis.* **17**:708-717.
- Wang, G., A. P. Van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. De Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert.** 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int.J.Syst.Bacteriol.* **47**:926-932.
- Wang, G. Q., Van Dam, A. P., Schwartz, I., and Dankert, J.** 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin.Microbiol.Rev.* **12**(4), 633-653.
- Wilske, B., U. Busch, V. Fingerle, S. Jauris-Heipke, V. Preac-Mursic, D. Rössler, and G. Will.** 1996. Immunological and molecular variability of OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* **24**:208-212.
- Wilske, B., S. Jauris-heipke, R. Lobentanzer, I. Pradel, V. Preac-Mursic, D. Rössler, E. Soutschek, and R. C. Johnson.** 1995. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J.Clin.Microbiol.* **33**:103-109.
- Wilske, B., V. Preac-Mursic, U. B. Göbel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab, and G. Zumstein.** 1993a. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J.Clin.Microbiol.* **31**:340-350.
- Wilske, B., V. Preac-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner.** 1993b. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect.Immun.* **61**:2182-2191.

- Wilske, B., V. Preac-Mursic, and G. Schierz.** 1985. Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients and ticks. *Lancet* **1**:1099.
- Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, and K. V. Busch.** 1986. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zentbl.Bakt.Hyg.A.* **263**:92-102.
- Yang, X. F., M. S. Goldberg, T. G. Popova, G. B. Schoeler, S. K. Wikel, K. E. Hagman, and M. V. Norgard.** 2000. Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Mol.Microbiol.* **37**:1470-1479.
- Zhioua E., Aeschlimann A., and Gern L.** 1994. Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J.Med.Entomol.* **31**:763-766.
- Zhu, Z.** 1998a. *Borrelia burgdorferi* in replete nymphal *Ixodes ricinus*: a localization study using light and electron microscopy. *Acarologia* **34**:123-133.
- Zhu, Z.** 1998b. Histological observations on *Borrelia burgdorferi* growth in naturally infected female *Ixodes ricinus*. *Acarologia* **39**:11-22.
- Zhu Z., Gern L., and Aeschlimann A.** 1991. The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*. *Parasitol.Res.* **77**:635-641.
- Zung, J. L., S. Lewengrub, M. A. Rudzinska, A. Spielman, S. R. Telford III, and J. Piesman.** 1989. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. *Can.J.Zool.* **67**:1737-1748.

6 ANNEXES

Annexe 1 : Préparation du conjugué anti-*Borrelia* (selon le mode opératoire décrit par Peacock et al [1971]).

Préparation de la colonne de Sephadex :

- 40 g de Sephadex G 25C (Pharmacia, Suisse) dans 1 litre de PBS M/15 pH 7.35
- Enlever toutes les 12 heures le PBS surnageant
- Laisser reposer 3 jours (au moins)
- Enlever l'air dans le gel (pompe à eau)
- Couler la colonne en versant délicatement le Sephadex le long de la paroi en verre de la colonne (2x21 cm) afin qu'il se dépose de façon uniforme et sans formation de bulles d'air
- Enlever l'air dans du PBS M/15 (pompe à eau) et en faire passer au moins 2 litres.

Le gel doit rester toujours hydraté.

Séparation des immunoglobulines :

- 1 g de DEAE Sephadex A50 (Pharmacia, Suisse) + 150 ml d'eau distillée. Laisser reposer 30 minutes
- 5 minutes sur l'agitateur magnétique, laisser décanter 5 minutes puis enlever le surnageant (pompe à eau)
- Répéter encore une fois cette opération
- Ajouter 100 ml d'eau distillée et passer sur un filtre Büchner (diamètre 10 cm) tapissé d'un filtre humidifié
- Passer 100 ml de NaOH 0.5 N
- Laver avec eau distillée jusqu'à un pH presque neutre (au moins 3 litres)
- Passer 100 ml de HCl 0.5 N
- Laver avec eau distillée jusqu'à un pH presque neutre (au moins 3 litres)
- Mettre le gel dans un bécher + 100 ml d'eau distillée
- Mélanger et ajuster le pH à 6.5 avec du NaOH 1 N (quelques gouttes)
- Laisser reposer 5 min et décanter en enlevant soigneusement avec la pompe à eau les fines particules juste à la surface
- Ajouter 80 ml de tampon phosphate 0.01 M à pH 6.5
- Laisser reposer 15 min en agitant de temps à autre
- Passer sur un Büchner recouvert d'un papier filtre et laver délicatement avec 100 ml de tampon phosphate 0.01 M à pH 6.5
- Prélever à la spatule la moitié du DEAE préparé et le mélanger dans un bécher (30 ml) à 10 ml de serum hyperimmun
- Mélanger pendant une heure à 4°C (chambre froide)

- Centrifuger 10 min à 450 G
- Prélever le surnageant et laver le culot avec du PBS 0.01 M pH 6.5 (2.5 ml au total)
- Recentrifuger 10 min à 450 G et prélever le surnageant
- Mélanger tous les éluats (surnageants) avec l'autre moitié du DEAE
- Refaire toutes les opérations
mélanger 1 heure à 4°C
centrifuger 10 min à 450 G
prélever le surnageant
laver le culot (2.5 ml) et recentrifuger
- Mélanger tous les éluats

Conjugaison des immunoglobulines :

- 1 mg d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (BioMérieux, Suisse) + 0.1 ml d'acétone froid + 5 ml de tampon carbonate pH 9 fraîchement préparé puis mélangé avec les éluants pendant 5 min à 4°C

Laisser reposer 45 min dans une étuve à 37°C en agitant de temps en temps

- Filtrer la solution (filtre 0.45 micron)
- Passer sur la colonne et récolter le premier passage teinté
- Concentrer le conjugué (amicon)
- Tester le conjugué pour définir sa dilution d'utilisation
- Conserver le conjugué fluorescent à 4°C à l'abri de la lumière

Tampons utilisés

PBS M/15 pH 7.35

KH ₂ PO ₄	2.14 g/l
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	11.46 g/l
NaCl	4.5 g/l

Tampon phosphate 0.01 M pH6.5

a	KH ₂ PO ₄	1.36 g/l
b	K ₂ HPO ₄	1.74 g/l
ajouter (b) dans (a) jusqu'à un pH de 6.5		

Tampon carbonate-bicarbonate pH 9.0

a	Na ₂ CO ₃	2.65 g dans 50 ml H ₂ O
b	NaHCO ₃	2.10 g dans 50 ml H ₂ O
rapport a/b = ¼		

Annexe 2 :Fixation Dalton

La fixation Dalton : consiste à faire réagir les échantillons avec un mélange osmium tétr oxyde-bichromate de potassium comme fixateur II, le bichromate augmentant la contrastation.

Tampon phosphate Sørensen (0,2M)

KH ₂ PO ₄ (0,2M)	1,36g/50ml	→	28 ml
Na ₂ HPO ₄ (0,2M)	2,8g/100 ml	→	72 ml
			100ml

Ajuster à pH 7,2 avec un des deux composants

Fixateur I :

GA 2,5% dans tampon phosphate Sørensen 0.1M (pH 7,2) + sucrose 3,5%

...2h TA

ou 4h à 4°C

pour 10 ml	GA 25%	1 ml
	Sø 0,2 M	5 ml
	Eau nanopure	4 ml
	Sucrose	0,35 g

Lavage 1 :

Sucrose 9,5% dans Sø 0,2M

...3 x 10mn+ nuit (4°C)

pour 20 ml : 20 ml sø + 1,9 g sucrose

Dalton : (gants ! !)

OsO₄ 1% + K₂Cr₂O₇ 4% + sucrose 13%

... 24h

pour 4 ml

OsO ₄ 4%	1 ml	
K ₂ Cr ₂ O ₇ 4%	1 ml	(le pH du bichromate est à ajuster au moment de l'utilisation à pH=7,2 avec KOH 2,5 N ne prendre qu'une petite partie des 10 ml pour ajuster le pH)
eau nanopure		1 ml
sucrose 52%	1 ml	(pour 10 ml 5,2 g sucrose dans 10ml d'eau distillée)

Lavage 2 :

Dans du sucrose 13% ...3x 10mn

Déshydratation :

EtOH 30%, 50%, 70%, 90% ...15 mn chacun
 EtOH 100% ...30 mn

Inclusion :

EtOH/ LRW (½ / ½) ...2 x 30 mn
 LRW ...1 h, nuit, 1 h

Polymérisation :

dans capsule de gélatine (Balzers) 0,5ml ...24 h 60°C

GA= Glutaraldéhyde

Sø= tampon phosphate Sørensen

LRW= résine LR White

Annexe 3 : Fixation Uranyl acétate en bloc

L'uranyl acétate contraste les structures contenant des acides nucléiques. Cette méthode consiste à contraster la tique avant l'étape de déshydratation. La méthode est identique à la fixation Dalton jusqu'au lavage avec tampon cacodylate 0,1 M + sucrose 4% suivant la réaction avec le fixateur II. La tique est alors placée 10-50 mn dans l'acétate d'uranyl aqueux 2% (pH 3,9) à l'obscurité. Lavage 3 fois 5 mn à l'eau distillée puis poursuivre la déshydratation, inclusion et polymérisation comme pour la fixation Dalton.

Fixateur I :

GA 2,5 % + PFA 2% dans du tampon cacodylate 0,1M + sucrose 0,8%

...3-4h TA
ou nuit (4°C)

Pour 10 ml	GA 25%	1ml
	PFA 20%	1ml
	Cacod. 0,2M	5ml
	Eau nanopure	3ml
	Sucrose	0,08g

Lavage 1:

Tampon cacodylate 0,1M + sucrose 4% ...3 x 10 mn + nuit (4°C)

POUR 20 ML		CACOD. 0,2M	10ML
EAU NANOPURE	10 ML	SUCROSE	0,8G

Fixateur II !! utiliser des gants !!

OsO₄ 1% dans du tampon cacodylate 0,1M + sucrose 4%

...4h TA

Pour 4 ml	OsO ₄ 4%	1ml	} à mettre en 1 ^{er} bien dissoudre le sucrose
	Cacod. 0,2M	2ml	
	Eau nanopure	1ml	
	Sucrose	0,16g	

Lavage 2:

Tampon cacodylate 0,1 M + sucrose 4%

...3x 10 mn

Contrastation en bloc : !!! à l'obscurité !! emballer les tubes dans du papier d'aluminium

UR ACETATE AQUEUX 2% (PH 3,9)

...10-50 MN (30 MN)*

(1h)**

* /** temps testés

Lavage 3:

Eau nanopure

...3 x 5 mn

Déshydratation :

EtOH 30%, 50%, 70%, 90%

...15 MN CHAQUE BAIN

EtOH 100%

...30 MN

Inclusion :

EtOH/ LRW (½ / ½)

...2 x 30 mn

LRW

...1 h, nuit, 1 h

Polymérisation :

dans capsule de gélatine (Balzers) 0,5ml

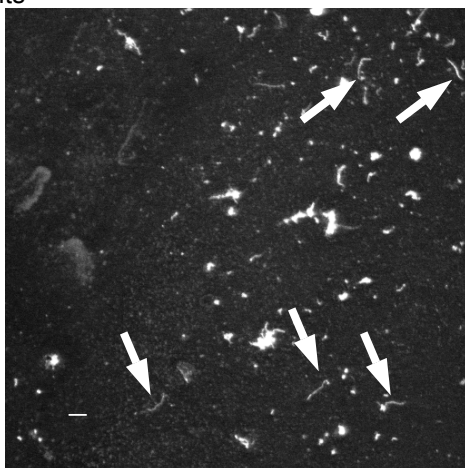
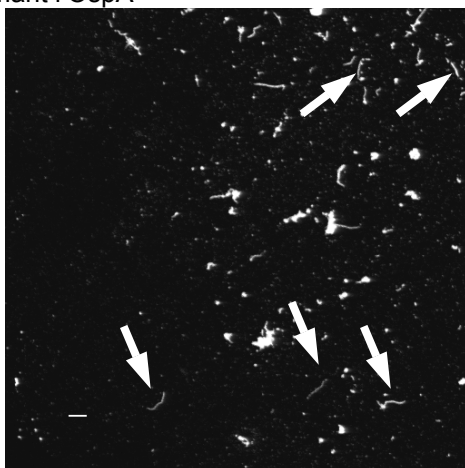
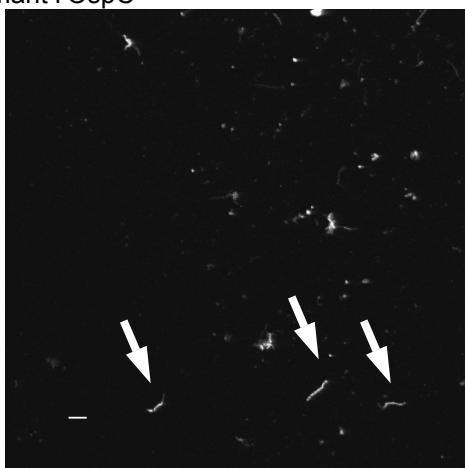
...24 h 60°C

GA= Glutaraldehyde

PFA=Paraformaldehyde

LRW=résine LR White

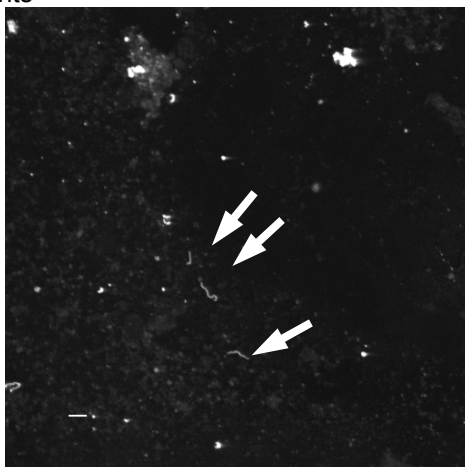
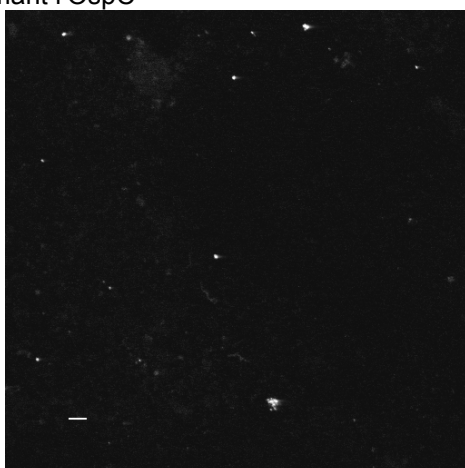
Annexe 4

Figure 6-1 : Spirochètes présents**Figure 6-2** : Spirochètes exprimant l'OspA**Figure 6-3** : Spirochètes exprimant l'OspC

B. burgdorferi ss (flèches) en culture, lavées et préparées pour un triple marquage. Observation au microscope confocal. Même image avec filtre FITC (qui met en évidence toutes les *Borrelia*), AF647.2 (qui permet de voir les spirochètes exprimant l'OspA) et AF568.1 (qui permet la visualisation des spirochètes exprimant l'OspC). Seulement certains spirochètes expriment l'OspC.

Barre = 10µm

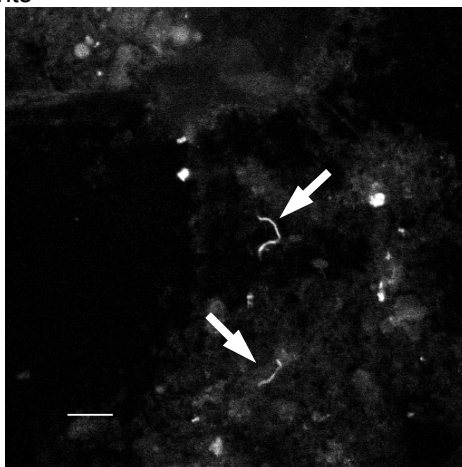
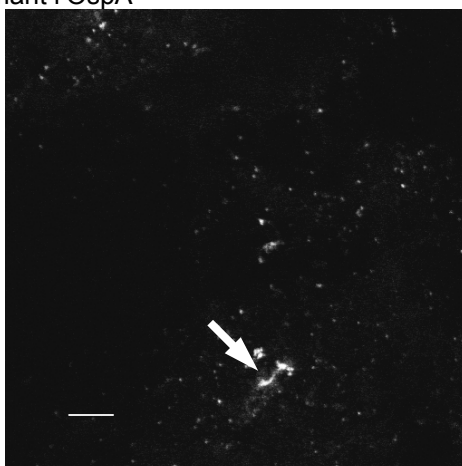
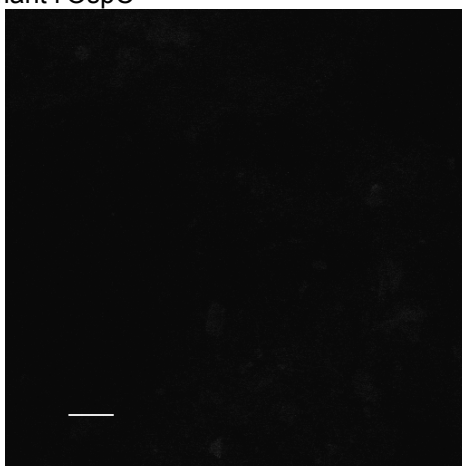
Annexe 5

Figure 6-4 : Spirochètes présents**Figure 6-5** : Spirochètes exprimant l'OspA**Figure 6-6** : Spirochètes exprimant l'OspC

Nymphe infectée par *B. burgdorferi* ss à jeun gardée 24h à 37°C, préparée pour un triple marquage. L'observation au microscope confocal de la même image avec des filtres différents met en évidence la présence de spirochètes exprimant l'OspA mais n'exprimant pas l'OspC.

Barre = 10µm

Annexe 6

Figure 6-7 : Spirochètes présents**Figure 6-8** : Spirochètes exprimant l'OspA**Figure 6-9** : Spirochètes exprimant l'OspC

Nymphe infectée par *B. burgdorferi* ss à jeun gardée 24h à 37°C, préparée pour un triple marquage. L'observation avec le microscope confocal avec des filtres différents de la même image de deux borrelies (flèches), met en évidence la présence d'un spirochète n'exprimant ni l'OspA ni l'OspC et d'un spirochète exprimant seulement l'OspA. Barre = 10µm

Annexe 7 Etude sur la dissémination de l'infection chez la souris.

Schéma 1)

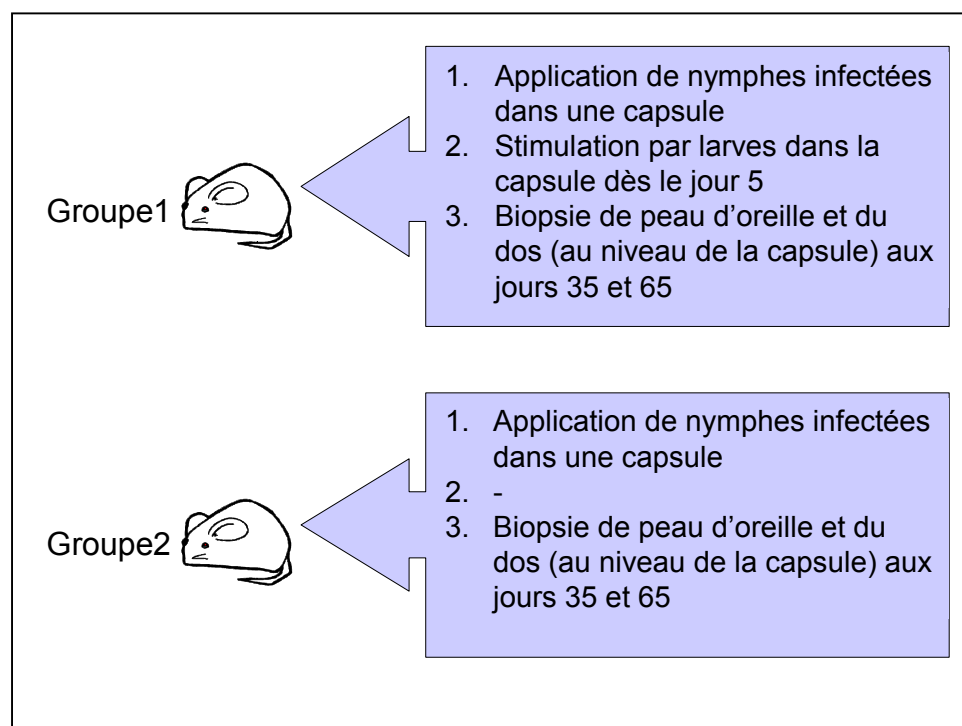
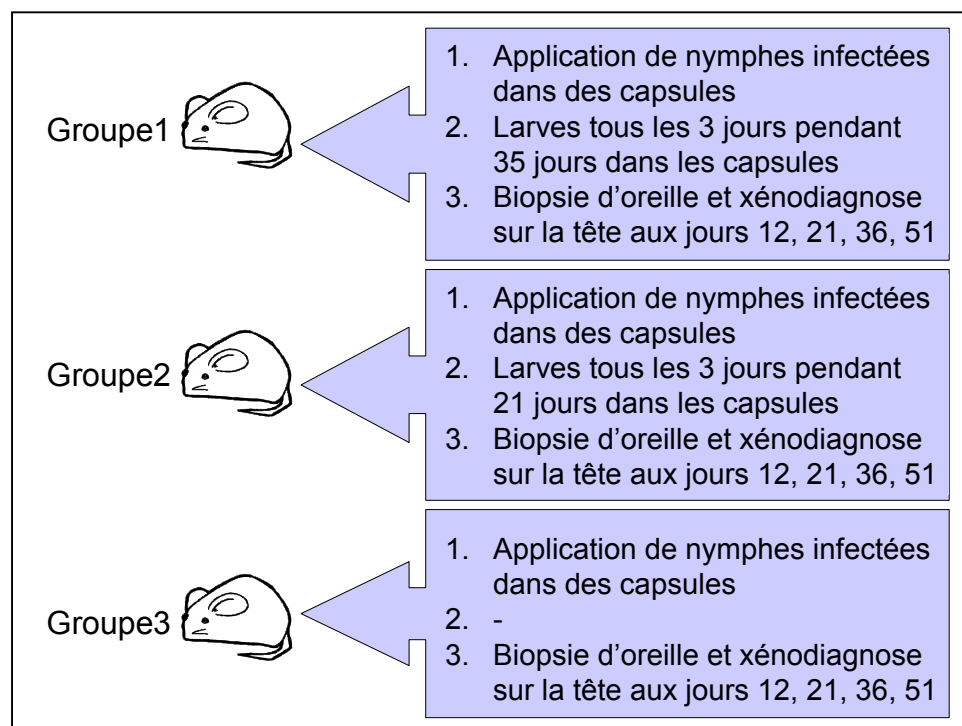


Schéma 2)



Annexe 8 Etude sur la dissémination de l'infection chez la souris.

	SOURIS	Biopsies J35		Biopsies J65	
		Dos	Tête	Dos	Tête
GROUPE 1	1	+	-	-	-
	2	+	-	-	+
	3	+	-	-	-
	4	+	-	-	-
	5	+	-	-	-
	6	-	-	-	+
	7	-	+	-	-
	8	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
	10	+	-	-	-
	11	-	-	-	-
	12	+	-	-	-
GROUPE 2	13	+	-	-	-
	14	+	+	-	-
	15	+	+	-	-
	16	+	-	-	-
	17	+	-	-	-
	18	-	-	-	-
	19	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
	21	+	-	+	-
	22	+	+	-	-
	23	+	+	-	-
	24	-	-	+	-

Tableau 4A : Infection systémique détectée par biopsie d'oreille chez les souris stimulées par des larves au site d'infection (groupe 1) ou pas stimulées par des larves (groupe 2).

Annexe 9 Etude sur la dissémination de l'infection chez la souris.

		J12	J21	J36	J50
GROUPE1	1	-	nd	nd	nd
	2	-	- (Xe -)	+	+
	3	-	- (Xe -)	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	nd	nd	nd
	6	-	+	-	-
	7	-	+	-	-
GROUPE2	8	-	+	-	-
	9	-	nd	nd	nd
	10	-	+	-	-
	11	-	+	-	+
	12	-	nd	nd	nd
	13	-	+	-	-
	14	-	+	+	-
GROUPE3	15	-	- (Xe -)	-	-
	16	-	- (Xe -)	-	-
	17	-	- (Xe -)	-	-
	18	-	-	-	-
	19	-	- (Xe -)	-	+
	20	-	- (Xe -)	+	-
	21	-	- (Xe -)	-	-

Tableau 5A : Infection systémique détectée par biopsies d'oreille chez les souris stimulées par les larves au site d'infection pendant 35 jours (groupe 1), pendant 21 jours (groupe 2) ou pas stimulées par les larves (groupe 3) et par xénodiagnose au jour 21.

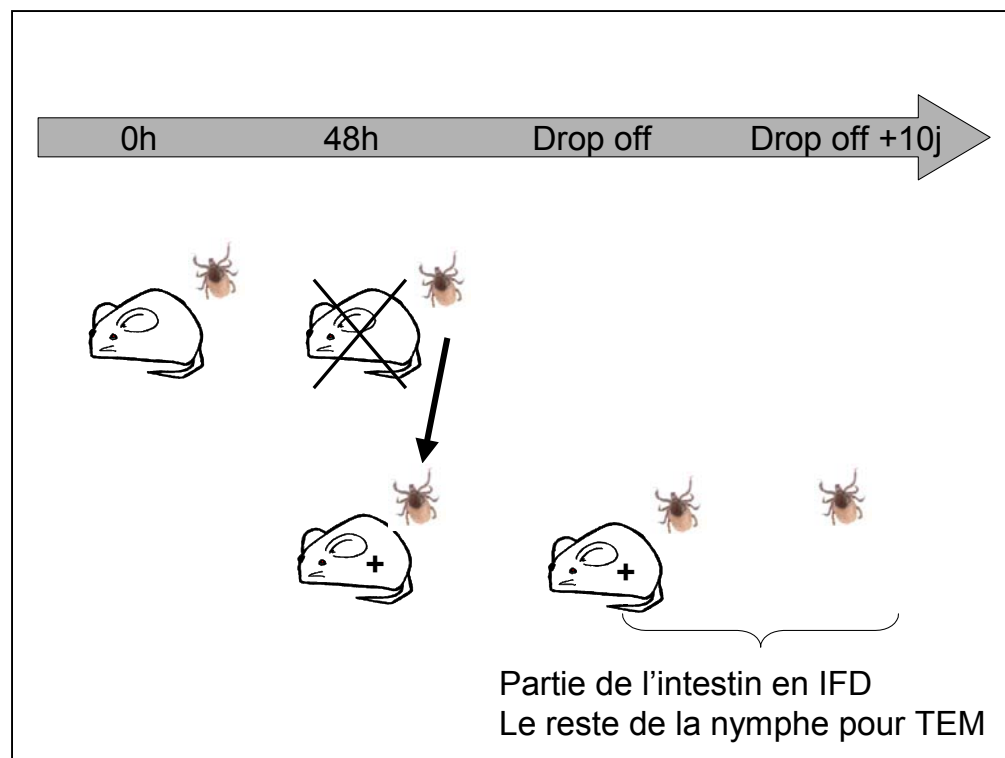
+= Tubes de culture qui ont montré des spirochètes au fond noir ou qui ont donné un résultat positif par PCR.

Nd= non effectué

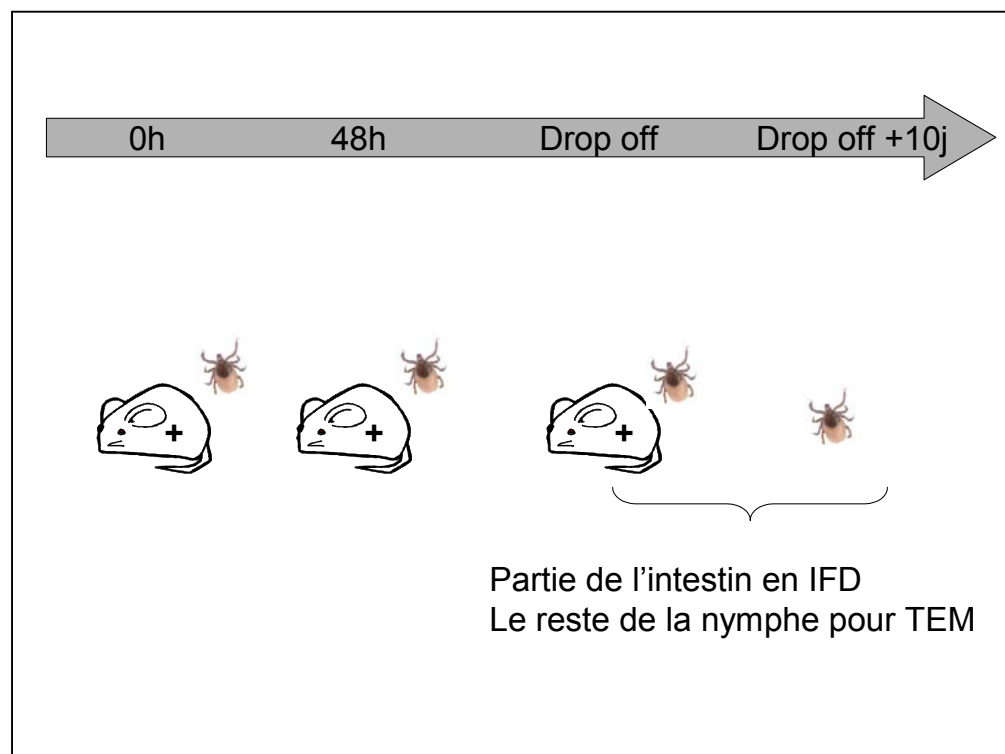
Xe= xénodiagnose

Annexe 10 Les spirochètes peuvent-ils traverser la membrane péritrophique de la tique *I. ricinus* ?

1A)



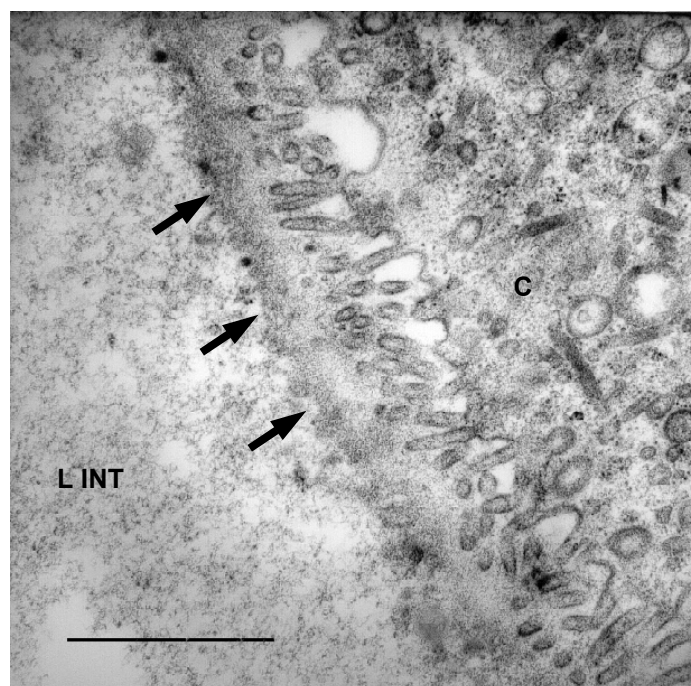
1B)



IFD : immunofluorescence directe

TEM : microscope électronique à transmission

Annexe 11

**Figure 6-10**

Agrandissement de l'intestin d'une nymphe *I. ricinus* nourrie pendant 2 jours indiquant la présence d'une membrane péritrophique (flèches). Observation avec le microscope électronique à transmission.

L INT: Lumière intestinale

C: cellule intestinale

Barre: 1 μ m

Annexe 12 Peuvent les spirochètes traverser la membrane péritrophique de la tique *I. ricinus* ?

	TIQUE	IFD	TEM
DROP-OFF	1B	+	nd
	1B	+	nd
	1B	-	nd
	1B	-	nd
	1B	-	nd
	1B	-	nd
	1B	-	nd
	1B	+	X
	1B	-	nd
	1B	-	nd
	1A	-	nd
	1A	+	nd
	1A	-	nd
	1A	-	nd
	1A	-	nd
	1A	+	nd
	1A	-	nd
	1A	-	nd
DROP-OFF +12J	1B	-	nd
	1B	+	X
	1B	+	X
	1B	-	nd
	1B	-	nd
	1B	+	X
	1B	-	nd
	1A	+	X
	1A	nd**	nd
	1A	nd**	nd
	1A	+	nd
	1A	+	nd

Tableau 7A : Résultats des analyses à drop-off et à drop-off + 12 jours par IFD et au TEM des nymphes ayant pris un repas infectieux avec une membrane péritrophique pré formée (groupe 1A) et des nymphes ayant pris un repas infectieux non interrompu (groupe 1B)

nd= non effectué

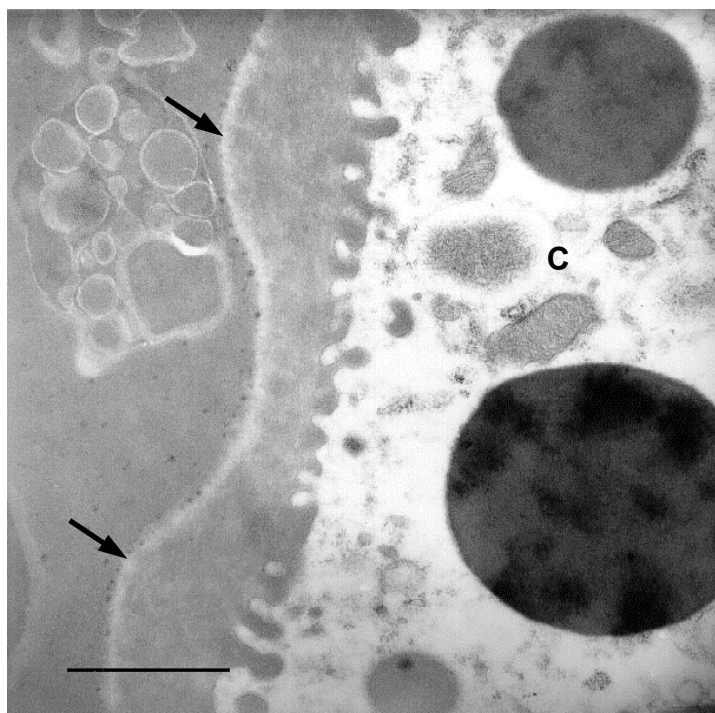
IFD= immunofluorescence directe

nd**= non observable

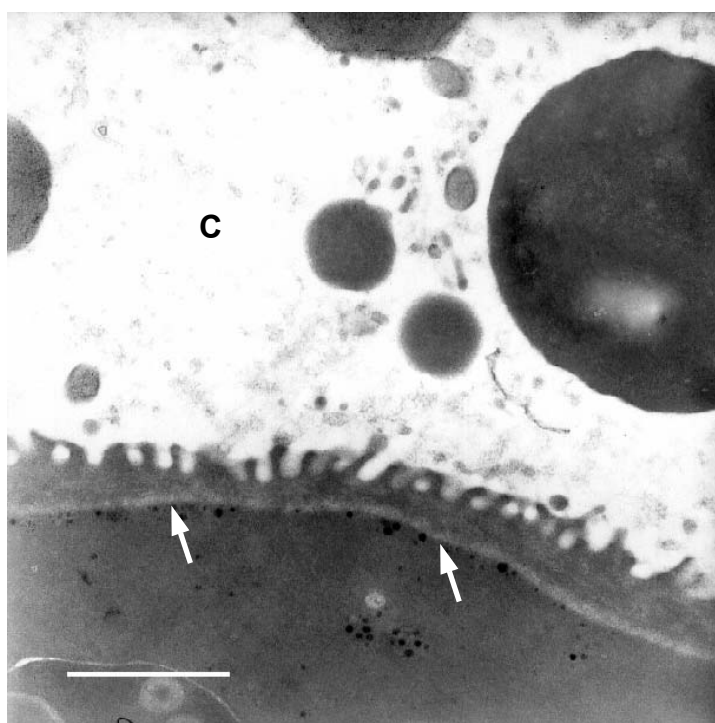
TEM= microscopie électronique

X= tiques observées au TEM

Annexe 13

**Figure 6-11**

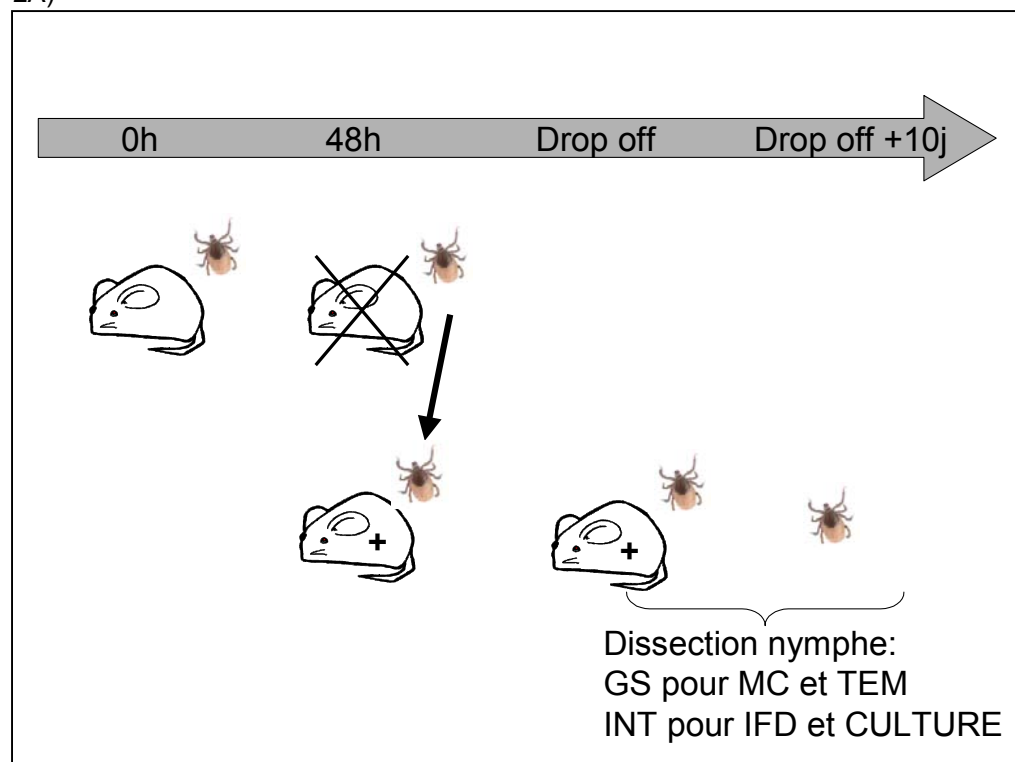
Méthode uranyl en bloc dans résine LR White: intestin de nymphe *I. ricinus* au drop off gorgée sur une souris. Image prise avec le microscope électronique à transmission. Cellule intestinale (C); membrane péritrophique (flèches). Barre: 1µm

**Figure 6-12**

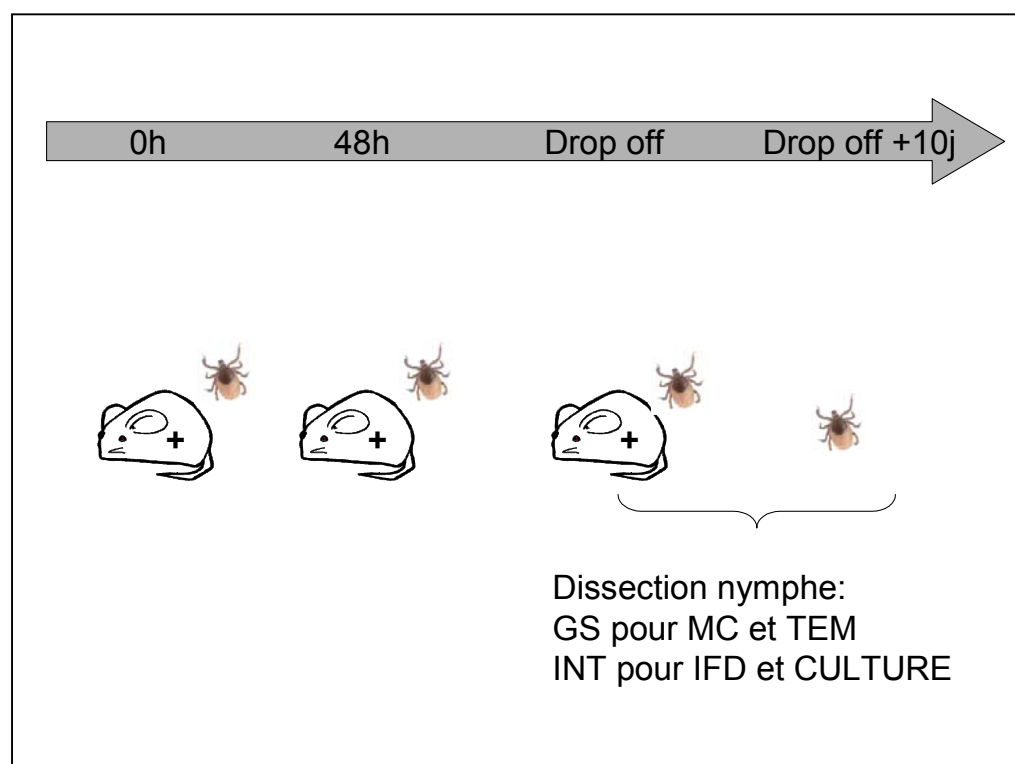
Méthode Dalton dans résine LR White: intestin de nymphe *I. ricinus* au drop off gorgée sur une souris. Image prise avec le microscope électronique à transmission. Cellule intestinale (C); membrane péritrophique (flèches). Barre: 1µm

Annexe 14 Les spirochètes peuvent-ils traverser la membrane péritrophique de la tique *I. ricinus* ?

2A)



2B)



INT : intestin
 GS : glandes salivaires
 IFD : immunofluorescence directe

MC :microscopie confocale
 TEM : microscope électronique à transmission

Annexe 15 Peuvent les spirochètes traverser la membrane péritrophique de la tique *I. ricinus* ?

	TIQUE		CULTURE	IFD	MC
DROP-OFF	5	2B	+	+	-
	6	2B	+	-	-
	7	2B	+	+	-
	8	2B	+	+	-
	9	2B	+	+	-
	10	2B	-	-	-
	11	2A	+	-	nd**
	12	2A	+	-	-
	13	2A	+	-	-
	14	2A	-	-	-
	15	2A	+	-	-
	16	2A	+	-	-
	17	2A	-	-	-
	18	2A	+	-	-
	19	2A	+	-	-
	20	2A	+	-	-
DROP-OFF + 10J	21	2B	+	+	-
	22	2B	+	-	-
	23	2B	+	-	-
	24	2B	+	-	-
	25	2B	+	+	-
	26	2B	+	-	-
	27	2A	+	+	-
	28	2A	+	-	nd**
	29	2A	+	+	-
	30	2A	+	-	abimée
	31	2A	+	-	-
	32	2A	nd**	+	-
	33	2A	+	-	-
	34	2A	-	+	-
	35	2A	+	-	-
	36	2A	+	-	-

Tableau 8A : Résultats des analyses à drop-off et à drop-off + 10 jours par culture et IFD des intestins par MC et TEM des glandes salivaires des tiques ayant pris un repas infectieux avec une membrane péritrophique pré formée (groupe 2A) et des nymphes ayant pris un repas infectieux non interrompu (groupe 2B).

nd= non effectué

MC=microscopie confocale

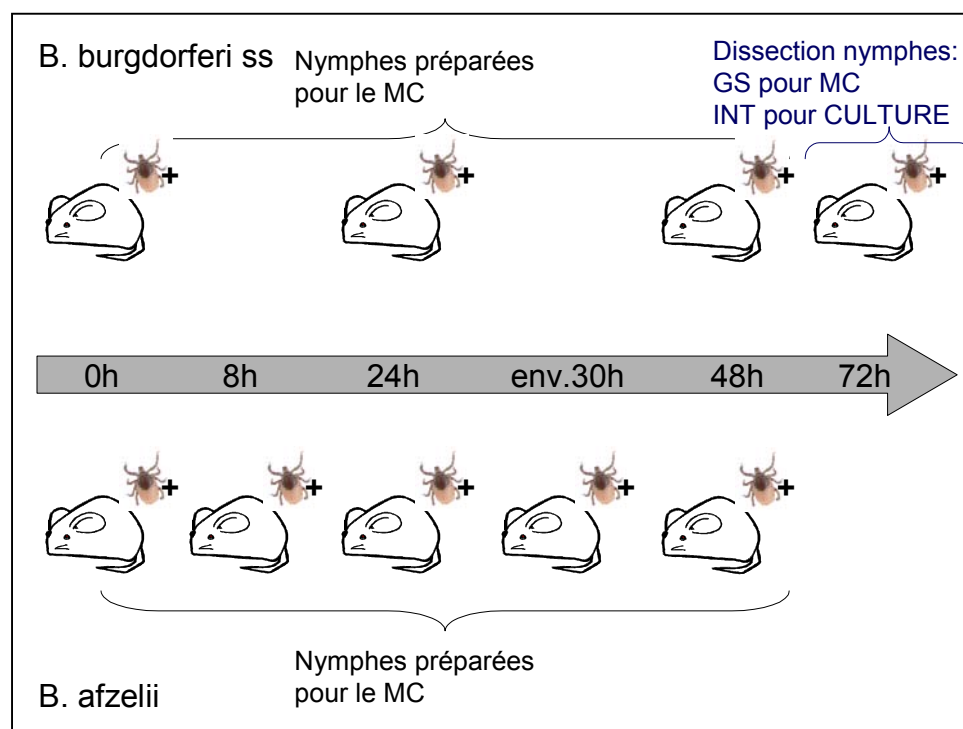
nd**= non observable

IFD=immunofluorescence directe

+*= positif par PCR

Annexe 16 Localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin.

1) Nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss ou par *B. afzelii* prenant un repas sanguin sur une souris saine.



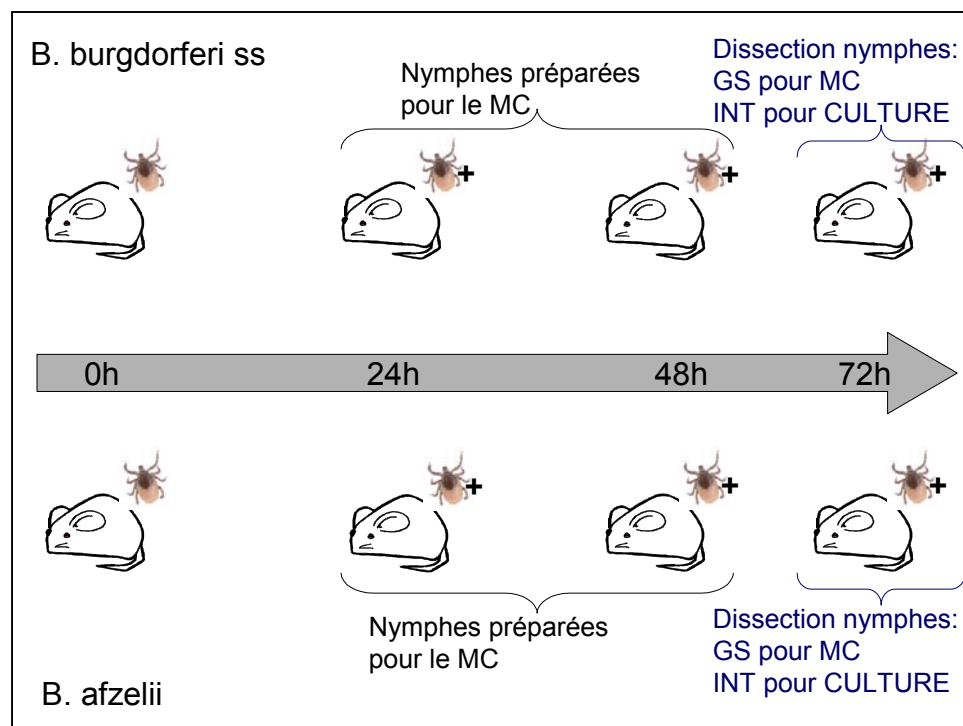
MC : microscope confocal

GS : glandes salivaires

INT : intestin

Annexe 17 Localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin.

2) Nymphes saines prenant un repas infectieux sur une souris infectée par *B. afzelii* ou *B. burgdorferi* ss.



MC : microscope confocal

GS : glandes salivaires

INT : intestin

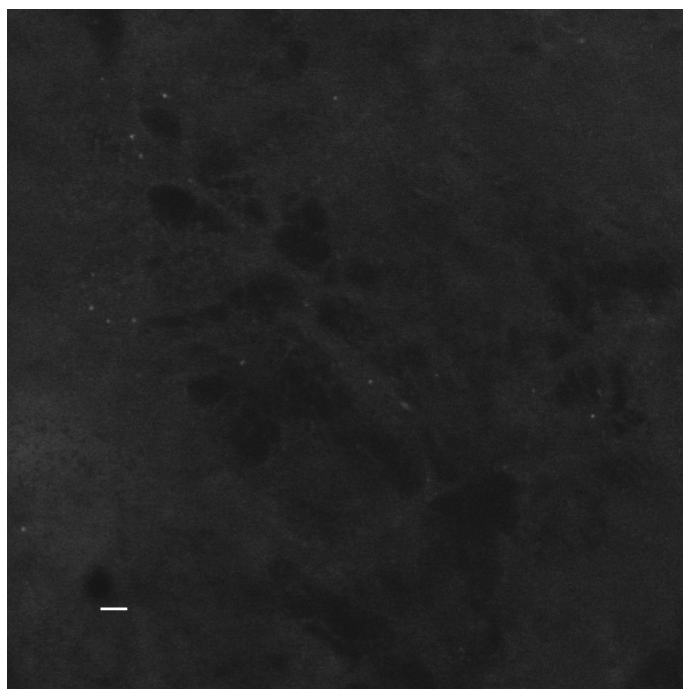
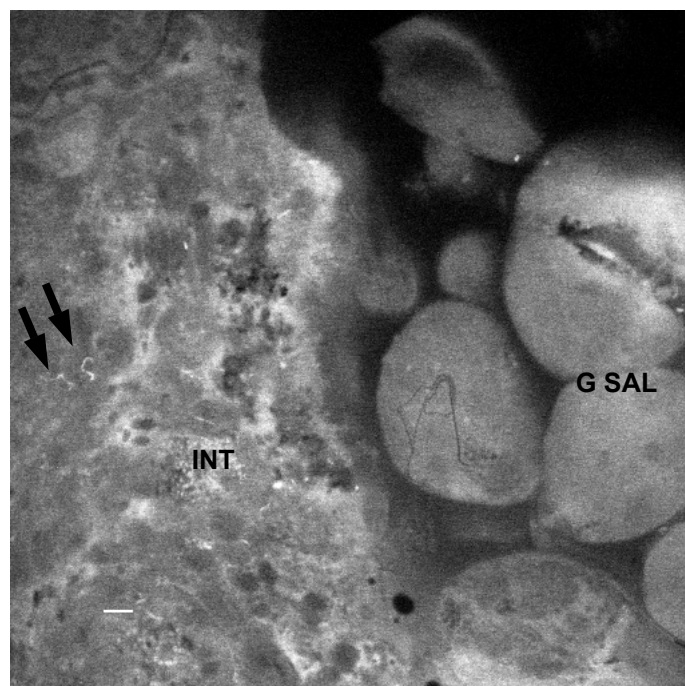


Figure 6-13

Nymphe infectée, préparée sans marquage avec le conjugué fluorescent. Observation effectuée avec le microscope confocal.

Annexe 19

**Figure 6-14**

Nymphe infectée par *B. burgdorferi* ss nourrie pendant 48h sur souris saine. Observation effectuée avec le microscope confocal. Spirochètes (flèches) dans l'intestin (INT) de la tique. On observe aussi une glande salivaire (G SAL) non infectée

Barre = 10µm

Annexe 20

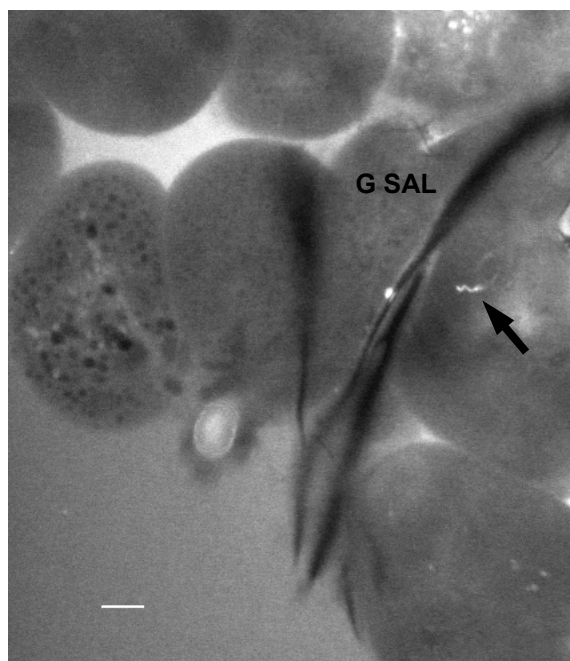


Figure 6-15

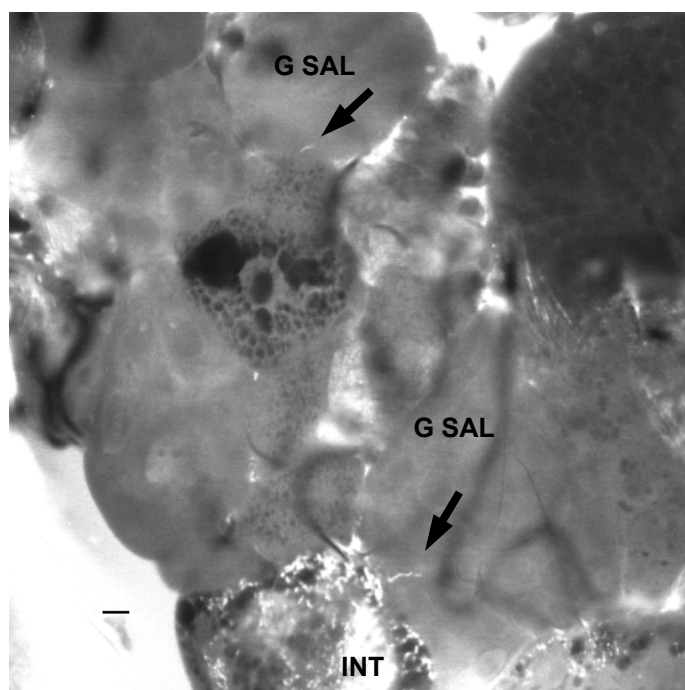


Figure 6-16

Nymphes infectées par *B. afzelii*, nourries pendant 48h sur une souris saine. Observation effectuée avec le microscope confocal. Spirochètes (flèches) dans les glandes salivaires (G SAL)

INT : Intestin

Barre= 10µm

Annexe 21 Localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin.

	NYMPHE	INTESTIN	G.SALIVAIRES
JEUN	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	-	-
	5	+	-
8h	6	-	-
	7	+	-
	8	+	-
	9	+	-
24h	10	-	-
	11	+	-
	12	+	-
	13	+	-
	14	+	-
ca 30h	15	+	-
	16	+	-
	17	+	-
	18	+	-
	19	+	-
48h	20	-	-
	21	-	-
	22	-	-
	23	+	+
48h	24	+	+
	25	+	+
	26	-	-
	27	+	+
	28	+	+
	29	-	-
	30	+	+
	31	-	-

Tableau 9A : Détermination de l'emplacement des spirochètes dans des nymphes infectées par *B. afzelii* (NE 2961), au cours du repas sanguin sur une souris saine.

Localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin.

	NYPHE	INTESTIN	G.SALIVAIRES
JEUN	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	+	-
	7	-	nd
24h	8	+	nd
	9	-	-
	10	-	-
	11	+	-
	12	-	-
48h	13	+	-
	14	-	-
	15	-	-
	16	-	-
	17	+	+
	18	+	-
	19	-	-
	20	-	-
72h	21	-	-
	22	+	nd
	23	+	-*
	24	-	-
	25	-	-
	26	-	-*
	27	+	-
	28	-	-*
	29	+	-
	30	-	-
	31	+	+**
	32	+	-

Tableau 9B : Détermination de l'emplacement des spirochètes dans des nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss (ZS7), au cours du repas sanguin sur une souris saine.

*: 1 seule glande salivaire observée.

** : une glande salivaire était infectée par 1 spirochète. Cette glande salivaire étant écrasée on n'a pas pu déterminer si le spirochète se trouvait à l'intérieur d'un acinus.

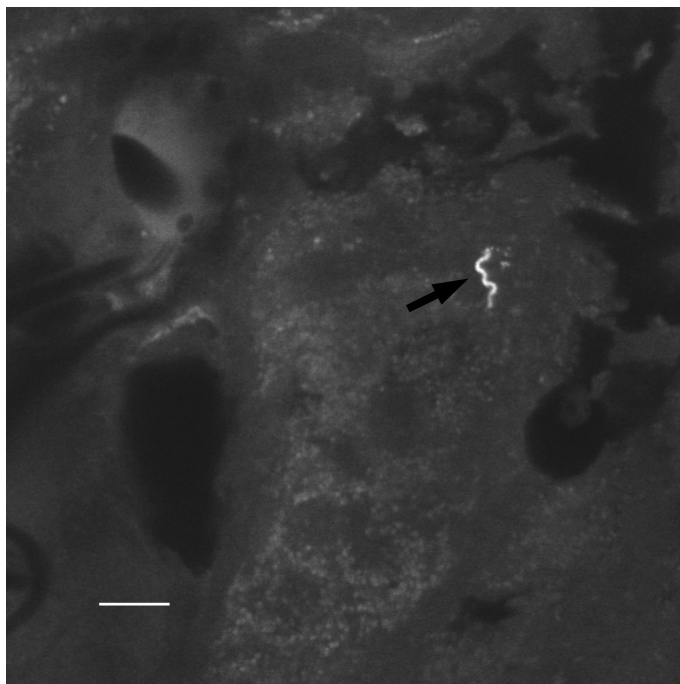
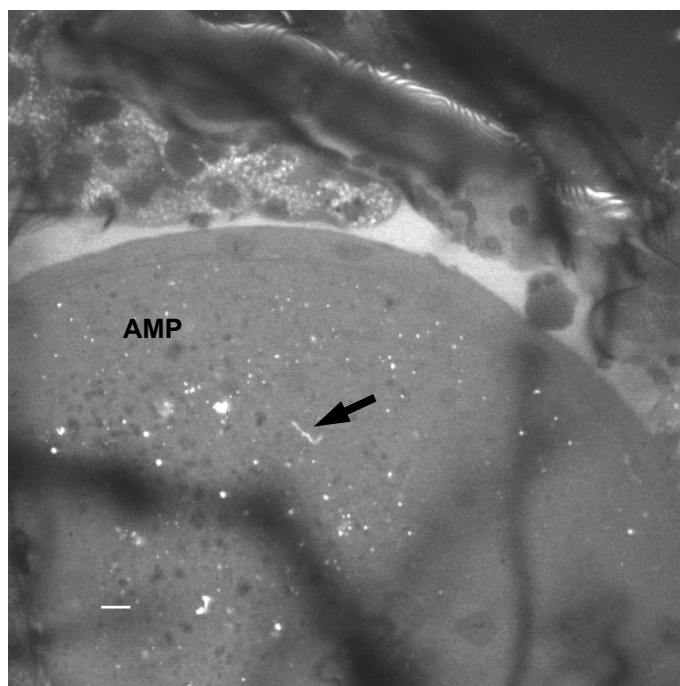


Figure 6-17

Nymphe saine prenant un repas infectieux sur une souris infectée par *B. afzelii*. Observation faite avec le microscope confocal. Un spirochète (flèche) localisé dans l'intestin.

Barre = 10 μ m

Annexe 23

**Figure 6-18**

Nymphe saine nourrie pendant 24h sur une souris infectée par *B. afzelii*. Observation effectuée avec le microscope confocal. Un spirochète (flèche) se trouve dans l'ampoule rectale (AMP) de la tique.
Barre= 10µm

Annexe 24 Localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin.

	NYPHE	INTESTIN	G.SALIVAIRES
24h	1	+	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	+	-
	5	+	-
	6	-	-
	7	+	-
	8	+	-
48h	9	+	-
	10	+	-
	11	-	-
	12	-	-
	13	+	-
	14	+	-
	15	+	-
	16	-	-
72h	17	-	-
	18	-	-
	19	-	-
	20	-	-

Tableau 10A : Détermination de l'emplacement des spirochètes dans des nymphes saines, au cours du repas sanguin infectieux sur une souris infectée par *B. afzelii* (NE2961).

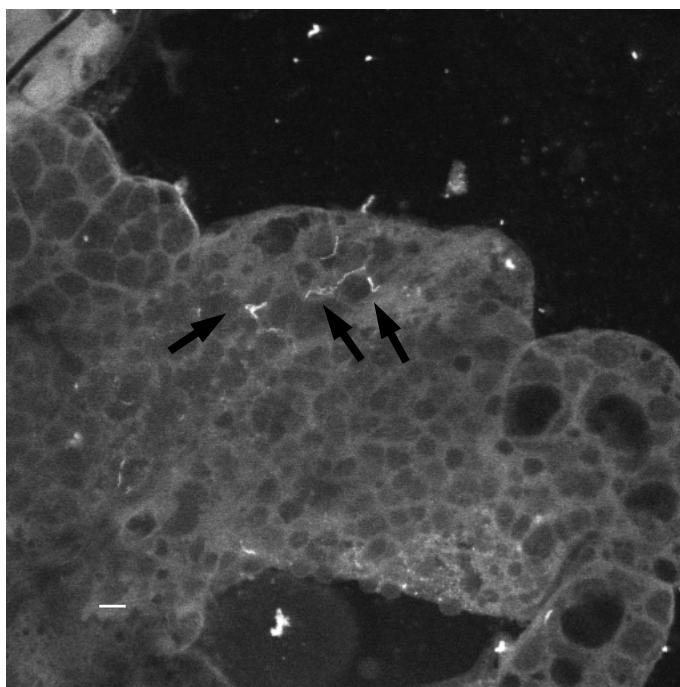
Localisation des spirochètes dans la tique au cours du repas sanguin.

	NYPHE	INTESTIN	G.SALIVAIRES
24h	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
48h	5	-	nd
	6	+	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
	10	-	-
	11	-	-
72h	12	-	-
	13	+	-*
	14	+	-
	15	+	-*
	16	+	-*
	17	+	-

Tableau 10B : Détermination de l'emplacement des spirochètes dans des nymphes saines, au cours du repas sanguin infectieux sur une souris infectée par *B. burgdorferi* ss (ZS7).

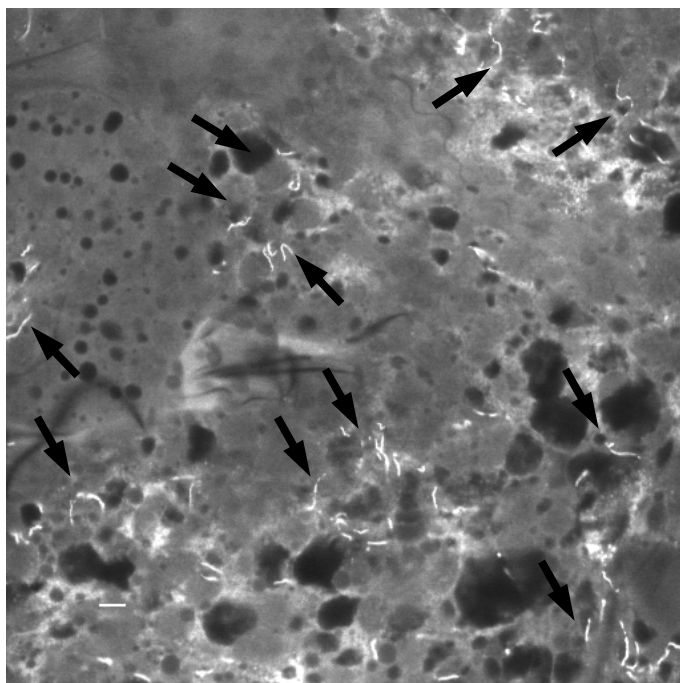
*:1 seule glande salivaire observée

Annexe 25

**Figure 6-19**

Intestin d'une nymphe à jeun infectée par *B. afzelii*. Observation effectuée avec le microscope confocal. Quelques spirochètes (flèches) localisés dans l'intestin.

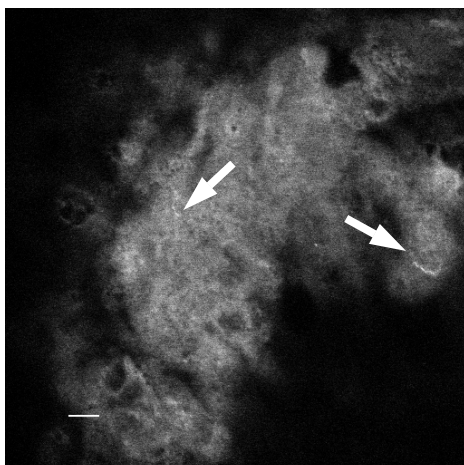
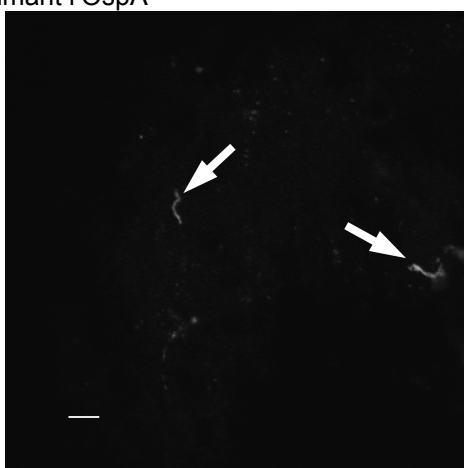
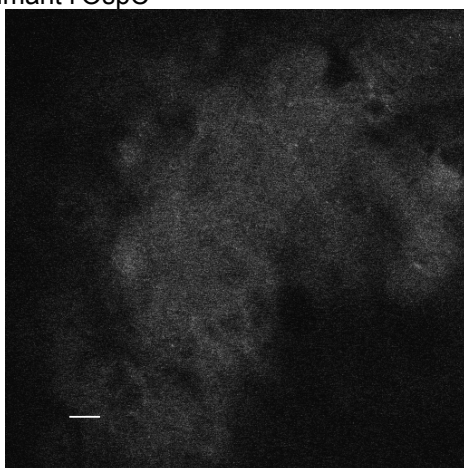
Barre : 10 μ m

**Figure 6-20**

Intestin d'une nymphe infectée par *B. afzelii* nourrie pendant 8h sur une souris saine. Infection massive par les spirochètes (flèches).

Barre : 10 μ m

Annexe 26

Figure 6-21 : Spirochètes présents**Figure 6-22** : Spirochètes exprimant l'OspA**Figure 6-23** : Spirochètes exprimant l'OspC

Nymphe infectée par *B. burgdorferi* ss nourrie pendant 24h sur une souris saine et préparée pour un triple marquage. L'observation avec le microscope confocal avec des filtres différents de la même image de deux borrelies (flèches), met en évidence l'expression de l'OspA et la non expression de l'OspC.

Barre = 10µm

7 RESUME

La maladie de Lyme est une zoonose causée par la bactérie *Borrelia burgdorferi* sensu lato et transmise à l'homme via la piqure de plusieurs espèces de tiques du genre *Ixodes*. Le cycle de l'agent pathogène responsable est maintenu dans la nature par une transmission entre tiques et hôtes vertébrés et vice versa. La borréliose de Lyme est répandue seulement dans l'hémisphère Nord : on la trouve en Amérique du Nord, en Eurasie et en Afrique du Nord.

En Europe il existe cinq espèces de borrélias, dont trois sont pathogènes pour l'homme, *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* et *B. garinii*. Le principal vecteur de ces bactéries est *Ixodes ricinus* et plusieurs hôtes réservoirs interviennent dans le cycle.

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié plusieurs aspects de la relation *I. ricinus*, *Borrelia* et hôte. Nous avons montré, comme déjà établi pour la tique vectrice en Amérique du Nord, *I. scapularis*, que les spirochètes dans les tiques à jeun ne sont pas capables d'établir une infection dans la souris. Nous avons observé que la température est un facteur à lui seul capable de déclencher l'infectiosité des spirochètes préalablement non infectieux se trouvant dans la tique à jeun.

Lorsque la tique commence à se nourrir, la transmission des spirochètes n'a pas lieu au tout début du repas sanguin. Nous avons pu établir qu'il existe une relation différente entre *B. burgdorferi* ss et *I. ricinus* ou *B. afzelii* et la même tique. En effet, nous avons observé des différences dans le temps de transmission de l'infection entre le vecteur et l'hôte pendant le repas sanguin de la tique : nous avons observé que *B. afzelii* est transmise plus tôt que *B. burgdorferi* ss. De plus, la tique *I. ricinus* a transmis avec une meilleure efficacité *B. afzelii* que *B. burgdorferi* ss. Nous avons montré que le développement de l'infection à l'intérieur de la tique pendant son repas sanguin est différent selon les espèces, *B. burgdorferi* ss versus *B. afzelii*, ceci qu'il s'agisse d'un premier repas infectieux pris par une tique saine ou bien d'un repas non infectieux pris par une tique déjà infectée.

Nous avons aussi montré que, contrairement à d'autres espèces de *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes, les spirochètes de la maladie de Lyme, *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii*, sont incapables de traverser la peau intacte.

Enfin, nous avons observé que la stimulation du site de fixation de tiques infectantes par des larves, permet une dissémination plus rapide des borrélias dans la souris.

8 REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je voudrais remercier Lise Gern, qui m'a permis d'effectuer ce travail de thèse sous sa direction. J'aimerais la remercier pour tous les enseignements précieux, pour toute l'aide qu'elle m'a donnée pendant ce travail ainsi que pour son soutien lors des moments difficiles.

Je remercie Lorenza Beati (Yale University, New Haven), Guy Baranton (Institut Pasteur, Paris) et Peter Allan Diehl (Université de Neuchâtel) pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie aussi Bruno Betschart, chef du laboratoire de Parasitologie, pour son accueil et pour son aide dans l'organisation des travaux pratiques de biologie animale.

Je remercie ensuite Markus Simon (Max-Planck-Institut for Immunobiology, Freiburg), Reinhardt Wallich (Université de Heidelberg) et Guy Baranton (Institut Pasteur, Paris) pour nous avoir fourni du matériel et des idées pour ce travail.

Ensuite je remercie Christel Gremion et Florence Munarini, qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Merci pour leur bonne humeur et pour l'amitié qu'elles m'ont démontrée.

Je remercie aussi Pitou, qui m'a appris d'innombrables manipulations, pour son calme et son esprit taquin. Un grand merci à Michèle Vlimant qui m'a appris l'utilisation de la microscopie électronique, pour sa gentillesse et son sourire.

Merci à Nadine qui m'a dévoilé les secrets du microscope confocal de notre institut.

Je remercie ensuite Steve pour sa sincère amitié pendant toutes ces années et pour les bons moments passés en tant que collègues dans l'enseignement aux étudiants de première année.

Je remercie aussi Valérie pour toutes les discussions et les moments de détente. Ainsi que Véronique pour les bons moments passés ensemble. Je remercie Jean-Luc, qui m'a tant aidé à résoudre les problèmes avec les ordinateurs et pour les enrichissantes discussions. Je remercie Fatima qui m'a aussi témoigné de l'amitié.

Je remercie aussi Francisca, Chang Min, Yves, Fayçal, Renaud, Stéphanie, Fanny et toutes les autres personnes qui travaillent ou qui ont travaillé à l'étage !

Un grand merci à Brigitte et Natacha ainsi qu'à Josiane et à Mme Knutti pour leur sympathie et leur disponibilité.

Merci à tous mes amis au Tessin, dont Simona, Mirella e Erika e Valeria, qui ont parfois écouté avec grand étonnement différents aspects du travail avec les tiques.

Je remercie Pierre-François, pour son aide tant sur le plan scientifique qu'humain. Pour l'amour qu'il me porte et qui m'a permis de bien finir cette thèse.

Pour finir je tiens vraiment à remercier mes parents qui m'ont guidée jusqu'à cet aboutissement, je les remercie infiniment. Je n'oublie pas tout le reste de ma famille, ainsi que tout le monde qui m'a toujours soutenue.

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION	1
1.1	LA TIQUE : LE VECTEUR	1
1.1.1	CYCLE DE VIE	2
1.1.2	MORPHOLOGIE EXTERNE	3
1.1.3	MORPHOLOGIE INTERNE	5
1.2	L'AGENT PATHOGENE	7
1.2.1	MORPHOLOGIE ET NUTRITION	9
1.2.2	GENOME ET GENOESPECES	10
1.2.3	OSPA ET OSPC	11
1.3	RELATION VECTEUR-HOTE-AGENT PATHOGENE	12
1.3.1	DEVELOPPEMENT DE <i>B. BURGDORFERI</i> DANS LA TIQUE ET TRANSMISSION DE L'AGENT PATHOGENE DU VECTEUR A L'HOTE	14
1.3.2	TRANSMISSION DE L'AGENT PATHOGENE DE L'HOTE A LA TIQUE	16
1.4	BUTS GENERAUX	18
2	MATERIEL ET METHODES	19
2.1	SPIROCHETES	19
2.2	CULTURE	19
2.3	TIQUES	20
2.3.1	TIQUES INFECTEES	20
2.3.1.1	Récolte des tiques dans la nature	20
2.3.1.2	Infection des tiques par voie naturelle	20
2.3.1.3	Nutrition des tiques par voie artificielle	20
2.3.2	MISE EN EVIDENCE DE L'INFECTION CHEZ LA TIQUE	21
2.3.2.1	Mise en culture de la tique	21
2.3.2.2	Immunofluorescence directe	21
2.4	SOURIS	22
2.4.1	SOURIS INFECTEES	22
2.4.1.1	Infection des souris par voie naturelle	22
2.4.1.2	Infection des souris par injection	22
2.4.1.3	Infection des souris par dépôt	23
2.4.2	MISE EN EVIDENCE DE L'INFECTION CHEZ LA SOURIS	23
2.4.2.1	Biopsie de peau et mise en culture	23
2.4.2.2	Xénodiagnose	23
2.5	POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	23
2.6	RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)	25
2.7	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	26
2.7.1	PREPARATION DES ECHANTILLONS	26
2.7.1.1	Fixation	26
2.7.1.2	Déshydratation	28
2.7.1.3	Inclusion	28
2.7.1.4	Polymérisation	28
2.7.2	COUPES SEMI-FINES ET ULTRA-FINES	28

2.7.3	CONTRASTATION DES COUPES	29
2.8	MICROSCOPIE CONFOCALE	29
2.8.1	IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE (IFD) POUR DETECTER LES BORRELIES	30
2.8.2	IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI) POUR DETECTER LES PROTEINES DE SURFACE EXPRIMEES	31
2.9	TEST STATISTIQUE	32
3	RESULTATS	33
3.1	INVESTIGATIONS ON THE MODE AND DYNAMICS OF TRANSMISSION AND INFECTIVITY OF <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> SENSU STRICTO AND <i>BORRELIA AFZELII</i> IN <i>IXODES RICINUS</i> TICKS.	33
3.1.1	ABSTRACT:	33
3.1.2	INTRODUCTION:	34
3.1.3	MATERIALS AND METHODS:	35
3.1.4	RESULTS:	36
3.1.5	DISCUSSION:	37
3.1.6	ACKNOWLEDGEMENTS:	39
3.1.7	REFERENCES:	39
3.2	ETUDE SUR LES FACTEURS POUVANT STIMULER L'INFECTIOSITE DES SPIROCHETES	41
3.2.1	MODE OPERATOIRE.	42
3.2.2	RESULTATS	43
3.2.2.1	Tiques infectées par <i>B. burgdorferi</i> ss	43
3.2.2.2	Tiques infectées par <i>B. afzelii</i> .	44
3.3	ETUDE SUR LA DISSEMINATION DE L'INFECTION CHEZ LA SOURIS.	46
3.3.1	MODE OPERATOIRE DE LA PREMIERE EXPERIENCE.	46
3.3.2	RESULTATS DE LA PREMIERE EXPERIENCE.	47
3.3.3	MODE OPERATOIRE DE LA DEUXIEME EXPERIENCE.	48
3.3.4	RESULTATS DE LA DEUXIEME EXPERIENCE.	48
3.4	LES SPIROCHETES PEUVENT-ILS TRAVERSER LA MEMBRANE PERITROPHIQUE DE LA TIQUE <i>I. RICINUS</i> ?	50
3.4.1	MODE OPERATOIRE DE LA PREMIERE EXPERIENCE.	51
3.4.2	RESULTATS DE LA PREMIERE EXPERIENCE	51
3.4.3	MODE OPERATOIRE DE LA DEUXIEME EXPERIENCE.	53
3.4.4	RESULTATS DE LA DEUXIEME EXPERIENCE.	53
3.5	LOCALISATION DES SPIROCHETES DANS LA TIQUE AU COURS DU REPAS SANGUIN.	54
3.5.1	MODE OPERATOIRE.	55
3.5.2	RESULTATS	55
3.5.2.1	Localisation des borrelies dans les nymphes infectées prenant un repas sain	55
3.5.2.2	Localisation des borrelies dans les nymphes saines prenant un repas infectieux	57
3.5.2.3	Nombre de spirochètes observés.	59
3.6	EXPRESSION DES PROTEINES DE SURFACE OSPA ET OSPC PAR <i>B. BURGDORFERI</i> SS (ZS7) DANS LA TIQUE <i>I. RICINUS</i> AU COURS DU REPAS SANGUIN.	59
3.6.1	MODE OPERATOIRE.	59
3.6.2	RESULTATS.	60
3.7	LA PROTEINE DE SURFACE OSPA DE <i>B. BURGDORFERI</i> SL PERMET-T-ELLE L'ADHESION DU SPIROCHETE A LA PAROI INTESTINALE DE LA TIQUE ?	60
3.7.1	MODE OPERATOIRE.	61
3.7.2	RESULTATS.	61

<u>4</u>	<u>DISCUSSION</u>	<u>62</u>
4.1	DISCUSSION SUR LES METHODES UTILISEES	62
4.2	NYMPHES INFECTEES	63
4.3	NYMPHES SAINES PRENANT UN REPAS SANGUIN INFECTIEUX	71
<u>5</u>	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>75</u>
<u>6</u>	<u>ANNEXES</u>	<u>85</u>
<u>7</u>	<u>RESUME</u>	<u>116</u>
<u>8</u>	<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>117</u>