

Identification de *Borrelia* sp, agent de la borréliose de Lyme,
et de l'ADN de l'hôte chez la tique *Ixodes ricinus* et
étude de sa phénologie en fonction de l'altitude en Suisse



Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
Pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences

Par

Francisca Morán Cadenas

Acceptée sur proposition du jury:

Dr Lise Gern, directrice de thèse

Prof. Peter-Allan Diehl, rapporteur

Prof. Jean-Claude Piffaretti, rapporteur

Dr Danièle Postic, rapporteur

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Identification de *Borrelia* sp, agent de la borréliose de Lyme et de l'ADN de l'hôte chez la tique *Ixodes ricinus* et étude de sa phénologie en fonction de l'altitude en Suisse

Francisca MORAN CADENAS

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

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)
et D. Postic (Paris),
MM. P.-A. Diehl et J.-C. Piffaretti (Genève)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 7 juin 2007

Le doyen :

T. Ward

UNIVERSITE DE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat-Décanat de la faculté
Rue Emile-Argand 11 - CP 158
CH-2009 Neuchâtel

Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.

Al andar se hace camino
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.

Caminante no hay camino
sino estelas en la mar...

Antonio Machado

1	RÉSUMÉ	3
2	INTRODUCTION	5
2.1	HISTORIQUE DE LA BORRÉLIOSE DE LYME.....	6
2.2	LE VECTEUR.....	7
2.2.1	<i>Systématique</i>	7
2.2.2	<i>Morphologie</i>	8
2.2.3	<i>Cycle de vie et écologie</i>	9
2.2.3.1	Effet de la température et l'humidité dans la biologie des tiques.....	11
2.2.4	<i>Phénologie</i>	13
2.3	L'AGENT PATHOGÈNE.....	14
2.3.1	<i>Systématique</i>	14
2.3.2	<i>Morphologie</i>	15
2.3.3	<i>Cycle de vie et écologie</i>	17
2.3.4	<i>Prévalence d'infection</i>	18
2.4	LES HÔTES RÉSERVOIRS.....	20
2.4.1	<i>Identification des hôtes à partir du repas sanguin</i>	21
2.5	OBJECTIFS.....	23
3	MATÉRIEL ET MÉTHODES	25
3.1	SITES D'ÉTUDE.....	25
3.2	RÉCOLTE DE TIQUES.....	28
3.2.1	<i>Phénologie</i>	29
3.3	DÉTECTION ET IDENTIFICATION DE <i>BORRELIA</i>	29
3.3.1	<i>Mise en culture des tiques et extraction d'ADN</i>	30
3.3.2	<i>Extraction d'ADN au NH₄OH 0,7M</i>	31
3.3.3	<i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	31
3.3.4	<i>RLB (Reverse Line Blot)</i>	33
3.3.4.1	Amorces et sondes spécifiques pour l'identification de <i>Borrelia</i> sp.....	33
3.3.4.2	Activation de la membrane (Couplage covalent des sondes).....	34
3.3.4.3	Hybridation de la membrane.....	35
3.3.4.4	Déshybridation de la membrane.....	36
3.4	DÉTECTION ET IDENTIFICATION DE L'ADN DE L'HÔTE.....	36
3.4.1	<i>PCR pour le repas sanguin</i>	36
3.4.2	<i>RLB</i>	37
3.4.2.1	Amorces et sondes spécifiques pour l'identification de l'ADN de l'hôte.....	37
3.4.2.2	Activation de la membrane (Couplage covalent des sondes).....	37
3.4.2.3	Hybridation de la membrane.....	38
4	RÉSULTATS	39
4.1	PUBLICATION 1.....	41
4.2	PUBLICATION 2.....	43
4.3	PUBLICATION 3.....	45
4.4	PUBLICATION 4.....	47
5	DISCUSSION	49
6	BIBLIOGRAPHIE	63

7	REMERCIEMENTS	77
8	ANNEXE 1	79
8.1	APPAREILS	79
8.2	PRODUITS PCR	79
8.3	PRODUITS RLB	79
8.4	SOLUTIONS.....	80
8.4.1	EDAC 16%.....	80
8.4.2	EDTA 20 mM pH=8.....	80
8.4.3	NaHCO ₃ 0,5 M pH=8,4.....	80
8.4.4	NaOH 10 M.....	80
8.4.5	SDS 10%.....	80
8.4.6	2x SSPE / SDS 0,1%.....	80
8.4.7	2x SSPE / SDS 0,5%.....	80
8.4.8	2x SSPE.....	80
8.4.9	PBS MgCl ₂ pH=7,2 - 7,3.....	81
9	ANNEXE 2	83
9.1	DONNÉES CLIMATIQUES.....	83
9.2	DENSITÉ ET PHÉNOLOGIE DES TIQUES.....	88
9.3	INFECTION PAR <i>B. BURGDORFERI</i> SL ET DISTRIBUTION DES GÉNOESPÈCES.....	95

1 RÉSUMÉ

La borréliose de Lyme, zoonose transmise à l'homme via la piqûre des tiques infectées par des spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi* s.l., est répandue dans l'hémisphère nord. Son vecteur, la tique *Ixodes ricinus*, est largement distribué en Europe. Nous avons étudié la répartition des tiques et leur infection par *Borrelia* le long de 3 gradients d'altitude en Suisse occidentale. Nous avons aussi investigué le rôle de la faune de nos forêts dans le maintien des populations de tiques et sa contribution dans la transmission du pathogène.

Nous avons observé que la densité des tiques en quête ainsi que leur dynamique saisonnière variaient géographiquement et annuellement. Des variations sont aussi possibles dans la même forêt sur deux versants d'une montagne. À Chaumont (Neuchâtel), la densité de tiques en quête est significativement supérieure sur le versant sud que sur le versant nord. Sur le versant sud, la densité diminue avec l'altitude alors que sur le versant nord, la densité maximale de tiques est observée au-dessus de 1000 m. À Salins (Valais), la densité de tiques en quête augmente avec l'altitude, ce qui s'explique par des conditions climatiques défavorables aux tiques en basse altitude. Neuchâtel se situe parmi les régions en Suisse occidentale avec la plus grande densité de tiques en quête.

Notre étude sur le versant sud de Chaumont en 2003-2005 est la suite du travail réalisé par Jouda *et al* (2004a) en 1999-2001. L'évolution des conditions climatiques montre une augmentation de la température en été et en automne durant 2003-2005. Le déficit de saturation, mesure du pouvoir desséchant de l'air, dépasse le seuil de 10 mmHg pendant de longues périodes en 2003-2005, surtout à basse altitude, tandis qu'il n'est atteint que ponctuellement en 1999-2001. Ainsi, la densité de tiques en quête a augmenté significativement en altitude, notamment à 900 m alors qu'à 620 m, la population d'adultes a diminué durant la dernière période.

La prévalence d'infection par *Borrelia* chez *I. ricinus* varie géographiquement et elle diminue avec l'altitude, sauf sur le versant nord de Chaumont. Le risque maximal de rencontrer une tique infectée est faible en Valais (5.8 nymphes et 3.6 adultes infectés par 100 m²) comparé à Neuchâtel (78.7 nymphes et 16.9 adultes infectés par 100 m²). Concrètement à Neuchâtel nous constatons une augmentation du risque d'infection entre 1999-2001 et 2003-2005. *B. afzelii* est la géoespèce prédominante dans les biotopes considérés.

Nous avons montré que l'identification de *Borrelia* sp chez les tiques peut varier selon la méthode d'extraction de l'ADN, en analysant simultanément deux procédés d'extraction sur la même tique (mise en culture suivi du thermolysat et hydrolyse alcaline). L'extraction directe par hydrolyse alcaline a été privilégiée car elle nous permet une autre voie de recherche, l'identification de l'ADN de l'hôte présent dans l'intestin de la tique à jeun. Nous avons pu établir l'origine du repas sanguin dans environ la moitié des tiques analysées et obtenir des données importantes sur la faune présente dans nos forêts et sur le rôle de réservoirs de *Borrelia* de divers hôtes.

2 INTRODUCTION

Les sujets principaux abordés dans cette étude sont au nombre de trois: la tique européenne *Ixodes ricinus*; un des pathogènes qu'elle véhicule, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), responsable de la borréliose de Lyme; et les hôtes sur lesquels la tique se fixe pour prendre son repas sanguin. La complexité des interactions entre ces trois acteurs "vecteur – pathogène – hôte" constitue un terrain d'étude très vaste autant du point de vue écologique qu'épidémiologique.

Nous nous sommes intéressée à l'écologie et à la dynamique de populations de tiques récoltées dans trois biotopes différents dans les cantons de Neuchâtel et du Valais. La phénologie de ces tiques – évolution de la densité des tiques en quête, début et fin de l'activité saisonnière, pic(s) d'activité au cours d'une année (Jouda *et al* 2004a) – a été suivie en fonction de l'altitude dans chaque site de récolte. Des tiques en quête ont été récoltées à un rythme mensuel dans les sites d'étude et certaines données climatiques ont été prélevées à chaque station de récolte.

Notre deuxième centre d'intérêt comprend la détection et l'identification des spirochètes du complexe *B. burgdorferi* sl dans les tiques. Cela nous permet d'évaluer les taux d'infection dans les différentes régions d'étude et d'analyser la situation en fonction de l'altitude. Nous avons employé pour cette identification des méthodes d'observation directe: mise en culture, microscope à fond noir, immunofluorescence (IF) et différentes techniques de biologie moléculaire: Polymerase Chain Reaction (PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) et Reverse Line Blot (RLB).

Le dernier volet de notre recherche est dédié à la détection et l'identification de l'origine du repas sanguin chez les tiques à jeun à partir de l'analyse de l'ADN présent dans leur intestin après la mue. Cette approche pour établir la relation entre les tiques et leurs hôtes dans la nature nous permet d'obtenir des informations sur les hôtes réservoirs possibles des génoespèces de *Borrelia* sans avoir à les capturer; cette manière de procéder est très intéressante pour des vertébrés de grande taille difficiles à manipuler et à maintenir en captivité. Les données obtenues nous permettent d'établir les différences entre la faune présente dans chaque région d'étude et sa contribution dans le cycle de vie des tiques.

2.1 HISTORIQUE DE LA BORRÉLIOSE DE LYME

La borréliose de Lyme est une maladie multisystémique largement répandue dans l'hémisphère nord (Eurasie et Amérique du Nord) causée par la bactérie *Borrelia burgdorferi* s.l et transmise à l'homme via la piqûre des tiques du genre *Ixodes*.

Certaines manifestations cutanées de la maladie ont été déjà décrites en Europe à la fin du XIX^e siècle par Buchwald (1883), connues sous le nom d'acrodermatite chronique atrophiante (ACA). Au début du XX^e siècle, le médecin suédois Afzelius (1910) et le dermatologue autrichien Lipschütz (1913) décrivent des cas similaires de lésions cutanées: l'érythème chronique migrant (EM). Ils ont observé que ces lésions cutanées survenaient après une piqûre de tique et c'est ainsi qu'*Ixodes ricinus* a été suspecté pour la première fois comme vecteur de la maladie en Europe. D'autres formes neurologiques de la maladie ont été aussi décrites à partir des années 20 (Garin et Bujadoux 1922; Bannwarth 1941). Cependant, ce n'est qu'au milieu des années 1970 que de vastes études épidémiologiques ont été entreprises dans la ville de Lyme (Connecticut, États-Unis) comme conséquence du nombre élevé de cas d'arthrite inflammatoire chez des enfants. En croyant à une nouvelle maladie, elle a été nommée "arthrite de Lyme" (Steere *et al* 1977), considérée d'origine probablement virale et transmise par des tiques, concrètement *Ixodes scapularis* (Steere *et al* 1978a,b).

Finalement, au début des années 80, l'agent étiologique de la maladie de Lyme, un spirochète, a été isolé à partir des tiques adultes d'*I. scapularis* aux États-Unis (Burgdorfer *et al* 1982). Peu de temps après, des spirochètes similaires ont été isolés à partir d'*I. ricinus* récoltées en Suisse dans une région endémique pour l'EM (Barbour *et al* 1983; Burgdorfer *et al* 1983). Cette bactérie a été identifiée comme une nouvelle espèce de borrelie et les taxonomistes ont proposé le nom de *Borrelia burgdorferi* en honneur à son découvreur, Willy Burgdorfer. L'ensemble des syndromes occasionnés par ce spirochète des deux côtés de l'Atlantique ont été associés à la maladie de Lyme.

Les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme diffèrent en Amérique du Nord et en Eurasie (Steere 1989) en raison, probablement, de la variabilité génétique observée chez *Borrelia* sp (cf. 2.3.1). L'infection peut être localisée à la peau (érythème migrant) ou disséminée dans divers organes (atteintes musculaires, articulaires, nerveuses, cardiaques). L'infection avancée se manifeste en général des mois ou des années après la piqûre de tique par des atteintes plus sévères comprenant l'arthrite chronique, les troubles neurologiques chroniques et l'ACA. Un traitement efficace de la borréliose de Lyme passe en général par une thérapie antibiotique orale sur une période variable selon la localisation de l'infection. Pour les atteintes neurologiques une thérapie intraveineuse s'avère nécessaire.

La prévention de la maladie de Lyme dans le but de réduire les risques d'infection réside principalement sur des mesures de protection personnelle vu la difficulté des mesures de contrôle du vecteur responsable de sa transmission.

2.2 LE VECTEUR

La tique est considérée comme le vecteur de *B. burgdorferi* si car elle remplit les critères de définition du vecteur selon Kahl *et al* (2002) qui sont les suivants:

- Se gorger sur un hôte infecté.
- Acquérir le pathogène pendant son repas sanguin.
- Conserver ce pathogène dans son organisme après la mue (transmission transstadiale).
- Le transmettre à un autre hôte au cours du prochain repas.

2.2.1 SYSTÉMATIQUE

Les tiques sont des acariens hématophages proches des araignées appartenant au sous-ordre *Ixodida* (Metastigmata). Celui-ci est composé de trois familles: *Ixodidae*, *Argasidae* et *Nuttalliellidae* (Tableau 1), dont celle des *Ixodidae* est la plus vaste, avec 13 genres et plus de 700 espèces différentes répandues dans le monde entier. L'arbre phylogénétique des tiques a été publié par Hoogstraal et Aeschlimann (1982) à partir des observations morphologiques, de leur cycle de vie et des caractéristiques des hôtes. À partir des années 90 différentes classifications taxonomiques des tiques ont été proposées grâce à l'essor des techniques moléculaires.

Phylum	<i>Arthropoda</i>		
Classe	<i>Chelicerata</i>		
Sous-classe	<i>Arachnida</i>		
Ordre	<i>Acari</i>		
Sous-ordre	<i>Ixodida (Metastigmata)</i>		
Famille	<i>Ixodidae</i> (tiques dures)	<i>Argasidae</i> (tiques molles)	<i>Nuttalliellidae</i>
Genre	<i>Ixodes</i> (249 sp)	<i>Argas</i>	<i>Nuttalliella</i>
	<i>Amblyomma</i>	<i>Carios</i>	
	<i>Anomalohimalaya</i>	<i>Ornithodoros</i>	
	<i>Bothriocroton</i>	<i>Otobius</i>	
	<i>Cosmiomma</i>		
	<i>Cornupalpatum</i>		
	<i>Dermacentor</i>		
	<i>Haemaphysalis</i>		
	<i>Hyalomma</i>		
	<i>Margaropus</i>		
	<i>Nosomma</i>		
	<i>Rhipicentor</i>		
	<i>Rhipicephalus</i>		

Tableau 1 Systématique des tiques selon Hoogstraal et Aeschlimann (1982), modifiée d'après Barker et Murrell (2004). [Compilation selon Keirans (1992), Camicas *et al* (1998), Keirans et Robbins (1999), Walker *et al* (2000) et Horak *et al* (2002)].

Quatre espèces étroitement rapprochées d'*Ixodes* sont les vectrices principales de *B. burgdorferi* si chez l'homme (Eisen et Lane 2002): *I. ricinus* et *I. persulcatus* en Eurasie (Gern et Humair 2002) et *I. scapularis* et *I. pacificus* aux Etats-Unis (Piesman 2002).

2.2.2 MORPHOLOGIE

Les membres de la famille *Ixodidae*, les tiques dures, se caractérisent par la présence d'une pièce dorsale sclérifiée, le scutum. Ce dernier recouvre la quasi-totalité du corps chez les mâles mais il est réduit à la partie antérieure chez les larves, nymphes et femelles. Les larves sont hexapodes tandis que nymphes et adultes possèdent 4 paires de pattes. Chez les adultes le dimorphisme sexuel est évident (Fig. 1 et 2). Le corps de la tique est constitué de deux parties: l'antérieure, le gnathosome ou capitulum, formée par les pièces buccales, et la postérieure, l'idiosome, composée du scutum et d'une région où le tégument est souple et qui augmente de volume pendant la réplétion. L'anus et le gonopore sont ventraux.



Fig. 1 Morphologie externe d'*I. ricinus* à différents stades. Photo: Olivier Rais et Francisca Morán. Laboratoire d'Éco-épidémiologie des parasites. Université de Neuchâtel.

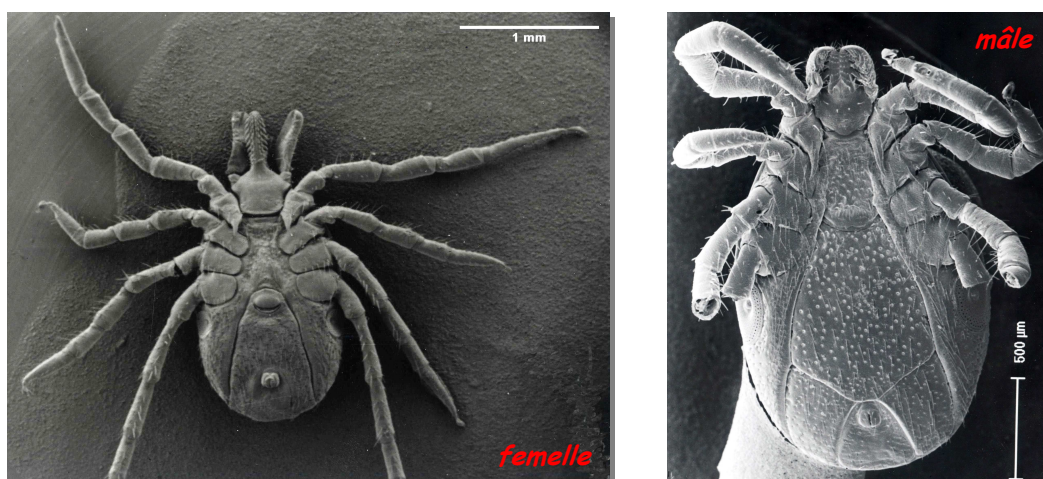


Fig. 2 Vue ventrale d'une femelle et d'un mâle d'*I. ricinus* (microscope électronique à balayage Philips XL 20). Photos: Michèle Vlimant. Laboratoire de Physiologie Animale. Université de Neuchâtel.

Les pièces buccales ou rostre comprennent une partie centrale dentée, l'hypostome, qui permet l'ancrage de la tique sur l'hôte, une paire de chélicères (pour percer la peau) et une paire de pédipalpes (sensoriels) (Fig. 3).

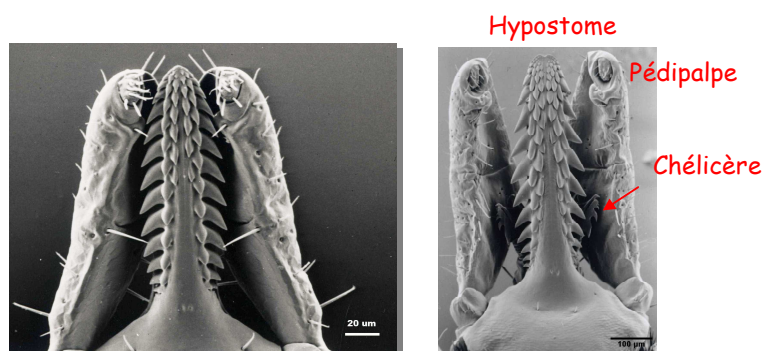


Fig. 3 Pièces buccales d'*I. ricinus* observées au microscope électronique à balayage Philips XL 20. Photos: Michèle Vlimant. Laboratoire de Physiologie Animale. Université de Neuchâtel.

Quant à sa morphologie interne, le système digestif occupe la grande majorité du corps de la tique. Il est divisé en 3 parties: l'antérieure, qui regroupe le pharynx et l'œsophage, la médiane, composée de caeca gastriques, et la postérieure, où se trouvent l'ampoule rectale et l'anus. Les tubes de Malpighi (système excréteur) se vident dans l'ampoule rectale. Une paire de glandes salivaires est placée en position antérolatérale. En forme de grappe, elles sont constituées d'acini granulaires et agranulaires. Les sécrétions salivaires de certains *Ixodidae* comprennent notamment un ciment qui favorise l'ancrage des pièces buccales de la tique dans la peau de l'hôte (Nuttall *et al* 2001; Parola et Raoult 2001). La salive est composée entre autres d'anticoagulants, des substances vasodilatatrices et des protéines immunosuppressives qui interviennent sur le système immunitaire de l'hôte. Pendant le repas, succions et régurgitations salivaires se succèdent. Le système respiratoire est trachéal et le système nerveux, le synganglion, est traversé par l'œsophage. Tous les organes et tissus baignent dans l'hémolymphe (système circulatoire). Les tiques possèdent divers organes sensoriels, dont celui de Haller, situé dans une dépression du tarse de la première patte, lequel est important pour la communication avec d'autres tiques et pour la localisation de l'hôte, grâce à sa sensibilité à l'humidité, aux vibrations, aux variations de température, aux phéromones et au CO₂, entre autres.

2.2.3 CYCLE DE VIE ET ÉCOLOGIE

I. ricinus est la tique la plus répandue en Europe et le principal vecteur des agents de la borréliose de Lyme. Elle transmet de nombreux agents pathogènes: le virus de l'encéphalite à tiques (TBE); des bactéries, telles des rickettsies et des borrelies; des protozoaires, comme des babésies et des trypanosomes; et même des microfilaires (métazoaires) (Aeschlimann *et al* 1979).

Cette espèce triphasique à 3 hôtes présente une vaste distribution géographique: des montagnes de l'Atlas en Afrique du Nord jusqu'en Islande et des côtes atlantiques portugaises au centre de la Russie (Lindgren *et al* 2000; Gern et Humair 2002). Ectoparasite hématophage obligatoire, la tique nécessite un hôte vertébré à chaque stade de son développement. Son cycle de vie passe par quatre stades et montre une succession des phases de vie libre à l'affût sur la végétation, attachée sur un hôte et de nouveau libre pour poursuivre son développement (Fig. 4). *I. ricinus* passe plus de 90% de sa vie détachée de l'hôte. Après l'éclosion des œufs, les larves cherchent un hôte pour prendre leur premier repas sanguin. Une fois gorgée, la larve tombe au sol où ont lieu la digestion et la mue au stade suivant. La nymphe va chercher un nouvel hôte sur lequel se gorger et, après son repas, elle va muer

au sol en adulte. La femelle se gorge une dernière fois sur un hôte approprié tandis que le mâle ne se nourrit pas ou très peu. La copulation a lieu dans la végétation ou sur l'hôte lors du repas sanguin de la femelle. Huit à 30 jours après la copulation aura lieu l'oviposition de milliers d'œufs.

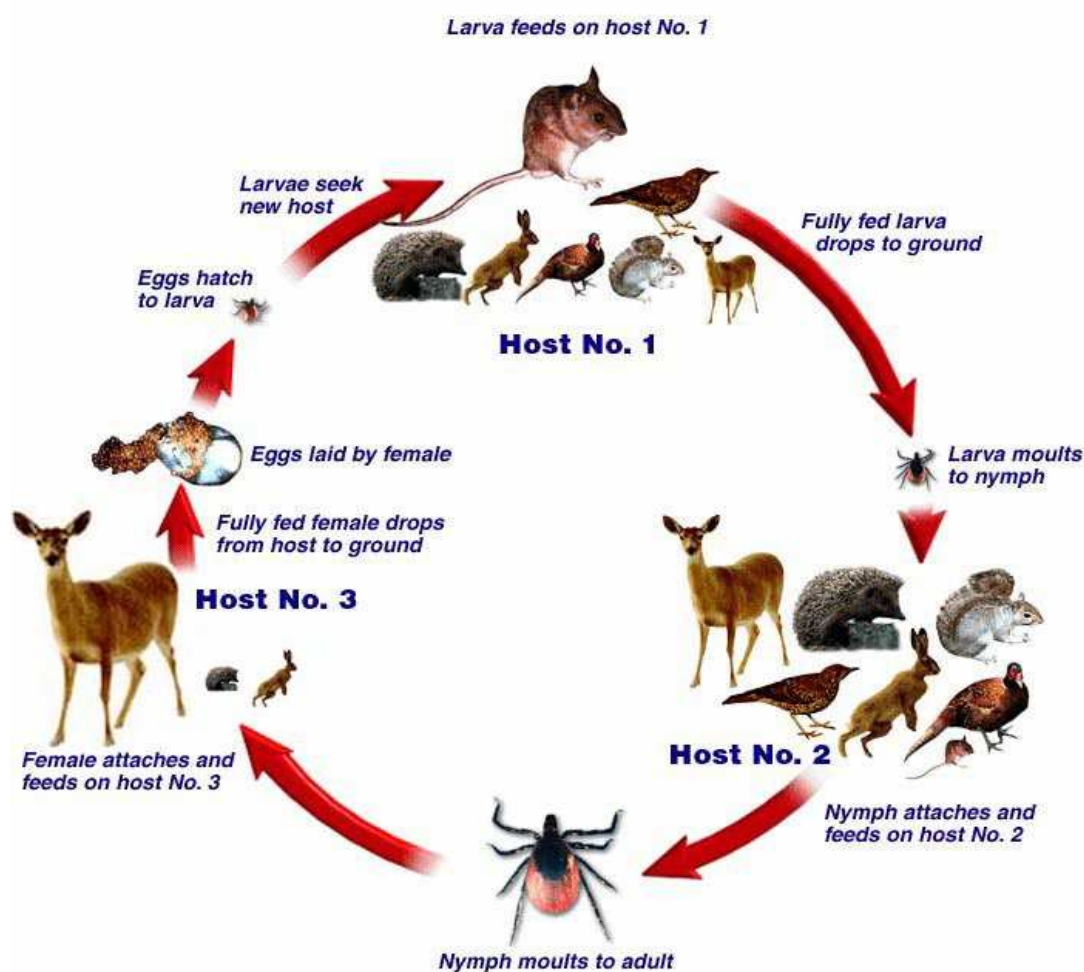


Fig. 4 Cycle de vie d'*I. ricinus* d'après Jeremy Gray et Bernard Kaye. © EUCALB 1997-2005. L'importance des hôtes dans chaque stade du cycle de vie est indiquée par la taille des dessins.

Le cycle de vie de la tique se complète, en moyenne, sur 3 ans mais il peut varier de 2 à 6 ans (Anderson 1991; Gray 1991; Eisen et Lane 2002) selon les conditions environnementales, telles que la température, l'humidité relative et la photopériode. Ces conditions naturelles vont déterminer la durée du développement interstadial et l'émergence de nouvelles tiques en quête sur la végétation. La diapause, état de basse activité métabolique, est le régulateur le plus important de l'activité saisonnière des tiques (Belozero 1982). Ainsi, on peut distinguer deux catégories de diapause, la diapause comportementale, qui se manifeste chez les tiques à jeun par une réticence à quêter ou un retard du gorgement après l'attachement sur l'hôte, et la diapause morphogénétique, qui implique le retard de l'embryogenèse des œufs, le retard de la mue des larves et nymphes et le retard de l'oviposition des femelles gorgées. D'une manière simplifiée, les tiques gorgées au printemps, muent ou produisent des œufs en automne de la même année et la majorité entre en diapause comportementale, quêtant à nouveau au printemps suivant aussitôt que la température est favorable (Gray 1991). Les tiques gorgées et les œufs pondus en période de basse activité entrent en diapause

morphogénétique pendant l'hiver et muent et/ou éclosent en été de l'année suivante quêtant en automne. Dans des régions où la population de tiques suit ces deux formes de diapause, deux cohortes [par "cohorte" on entend l'émergence de tiques nouvellement muées ou écloses] différentes seront présentes, une au printemps et l'autre en automne (Gray 1991; Walker 2001). Randolph *et al* (2002), par contre, proposent l'apparition d'une seule cohorte de tiques chaque année en automne. La plupart de ces nouvelles tiques fraîchement muées entrent en diapause comportementale en hiver et quêtent au printemps de l'année suivante.

Il existe un large éventail d'hôtes sur lesquels les tiques se nourrissent à chaque stade de leur développement dont l'homme, qui apparaît comme un hôte accidentel dans leur cycle de vie. Les larves se trouvent de préférence sur des animaux de petite taille comme les micromammifères et les oiseaux; les nymphes infestent surtout des vertébrés de taille moyenne tels des hérissons, des carnivores, des oiseaux et éventuellement aussi des micromammifères; les femelles se nourrissent principalement sur des mammifères de grande taille comme les canidés et les ongulés. Le succès d'infestation dépend de facteurs biologiques, la disponibilité d'un hôte par exemple, et microclimatiques comme la température et l'humidité relative de l'air (Gern *et al* 1993).

La survie des tiques est conditionnée par divers facteurs biotiques (la densité des hôtes et la végétation, par exemple) et abiotiques (climat) qui agissent comme facteurs limitants dans leur croissance et développement (Perret *et al* 2004). Seuls certains biotopes abrités et humides sont favorables à leur développement. Ainsi les forêts mixtes et forêts de feuillus à sous-bois dense, avec une litière humide et une couverture herbacée importante, le long de lisières, les galeries forestières et les bosquets représentent des biotopes propices aux tiques. Elles sont aussi présentes dans les pâturages en Angleterre (Gray *et al* 1995) mais rarement dans des milieux ouverts exposés au vent et au soleil sur le continent (Aeschlimann 1972; Gern et Humair 2002). D'après Aeschlimann (1972) *I. ricinus* s'adapte facilement aux variations de température du climat continental suisse. Elle passe l'hiver protégée dans la litière du sol et s'habitue aux basses températures par une diminution de son activité métabolique et un ralentissement de son développement (diapause). L'autre élément qui peut limiter la survie des tiques est l'altitude, associée à l'absence des biotopes adéquats. En Suisse, aucune tique *I. ricinus* n'a été récoltée au-dessus de 1450 m (Cotty *et al* 1986).

2.2.3.1 EFFET DE LA TEMPÉRATURE ET L'HUMIDITÉ DANS LA BIOLOGIE DES TIQUES

Les facteurs climatiques ont une influence considérable sur la biologie et le cycle de vie des tiques. *I. ricinus* est une tique exophile qui attend à l'affût sur la végétation le passage d'un hôte approprié. Le comportement de recherche d'un hôte se caractérise par l'ensemble d'activités qui conduisent la tique à la rencontre de son hôte et au succès de son repas. Selon Perret (2003), on peut distinguer quatre étapes qui mènent la tique à jeun à la quête, à la localisation d'un hôte, à son acceptation et au début du repas sanguin. Pendant que la tique quête dans la partie supérieure de la végétation, la proximité d'un hôte et sa perception vont provoquer l'activation et l'orientation de la tique. L'attraction implique des réponses olfactives, visuelles, thermiques, etc. Ensuite la tique pourra s'agripper à l'hôte s'il est suffisamment proche avant de commencer son repas.

Chacun des stades d'*I. ricinus* attend à différentes hauteurs sur la végétation, larves et nymphes de préférence sur les couches basses du couvert végétal et les adultes sur les couches plus élevées (Gigon 1985; Mejlou et Jaenson 1997; Randolph et Storey 1999). Les déplacements verticaux sur la végétation sont liés aux besoins hygrométriques puisque les tiques en quête sont très vulnérables à la dessiccation. Elles requièrent une humidité relative de l'air supérieure à 85% pour parvenir à se réhydrater convenablement avant de continuer leur activité de quête (Gern *et al* 1993; Gern et Humair 2002). Perret *et al* (2004) ont observé que les tiques ne réagissent pas immédiatement aux conditions climatiques. Elles emploient leur contenu en eau comme tampon pour survivre aux conditions desséchantes pendant de courtes périodes. Il ne faut pas oublier que les valeurs d'humidité mesurées au moment de la récolte ne nous indiquent pas l'état d'hydratation de la tique en quête. Le déficit de saturation (Randolph et Storey 1999; Perret *et al* 2000), qui intègre la température et l'humidité relative pour donner une mesure du pouvoir desséchant de l'atmosphère, pourrait expliquer la variabilité de la densité d'*I. ricinus*, au cours d'une année.

L'influence du déficit de saturation (DS) dans le comportement de quête des tiques a été étudiée dans la nature (Perret *et al* 2000), dans des conditions climatiques naturelles dans des arènes placées dans la forêt (Perret *et al* 2004), dans des conditions semi-naturelles dans des arènes (Randolph et Storey 1999) et au laboratoire (Perret *et al* 2003). Perret *et al* (2004) ont introduit des nymphes et des adultes dans des arènes qui ont été placées ensuite dans la forêt. Ils ont suivi leur comportement de quête en comptant le nombre de tiques visibles dans les arènes et ils ont comparé ces données avec celles de récoltes au drapeau dans un site proche de la même forêt. Les tiques à l'intérieur des arènes sont à l'abri des prédateurs et aussi des hôtes, donc ces auteurs concluent que la diminution du nombre de tiques en quête, surtout les nymphes, au cours du temps est due à la mortalité par épuisement de leurs réserves énergétiques (Steele et Randolph 1985; Randolph et Storey 1999). La diminution de l'activité de quête des nymphes correspond à des périodes de sécheresse, due à une chute de l'humidité relative ou une augmentation du DS. Les adultes sont moins sensibles à la dessiccation car ils perdent proportionnellement moins d'eau que les nymphes. Ces conditions défavorables poussent les tiques à redescendre fréquemment dans la litière pour se réhydrater et épuisent ainsi toute leur énergie. En effet, au laboratoire, le suivi des tiques avec un système vidéo montre qu'elles alternent entre quête et quiescence en absence de stimuli des hôtes et que la durée de la quête est limitée, comme dans la nature, par la dessiccation (Perret *et al* 2003). La durée de quête est beaucoup plus courte lorsque le DS est élevé et les mouvements de la tique augmentés. Randolph et Storey (1999) montrent un autre effet des conditions desséchantes sur le comportement de quête des tiques. Les nymphes continuent leur quête mais dans les couches inférieures de la végétation, où l'humidité n'est pas si défavorable. Les larves descendent dans la litière et échappent à la dessiccation devenant quiescentes. Lorsque les conditions d'humidité redeviennent convenables, larves et nymphes récupèrent leur hauteur de quête habituelle sur la végétation.

2.2.4 PHÉNOLOGIE

Nous avons introduit le terme phénologie des tiques, qui se réfère à l'évolution de la densité des tiques en quête, au début et à la fin de leur activité saisonnière et au(x) pic(s) d'activité au cours d'une année (Jouda *et al* 2004a).

Les tiques en quête présentent une activité saisonnière, en général de février à novembre, et passent l'hiver en diapause dans la couche superficielle du sol. Les conditions climatiques jouent un rôle important dans la dynamique de la population des tiques. Sa phénologie présente une variabilité autant géographique (Korenberg 2000) que interannuelle, comme cela a été mis en évidence dans plusieurs études européennes menées en Irlande (Gray 1984), en Suède (Tälleklint et Jaenson 1996), au Royaume Uni (Randolph *et al* 2002) et en Suisse (Mermod *et al* 1973; Perret *et al* 2000; Jouda *et al* 2004a).

L'activité de quête chez *I. ricinus* peut être continue du printemps à l'automne (Irlande, Gray 1991); présenter une distribution bimodale –avec un "pic" de printemps considérable et un "pic" d'automne moins important– et unimodale sur la même année dans des sites différents (Angleterre, Randolph *et al* (2002)); montrer aussi une distribution unimodale mais avec un pic d'hiver (Algérie, Yousfi-Monod et Aeschlimann (1986)). En Suisse, des distributions unimodales et pseudo-bimodales sont les plus communément observées dans différentes régions: Neuchâtel (Perret *et al* 2000), Jura (Schneider 2005), Fribourg (Lommano 2005). D'après Jouda *et al* (2004a), nymphes et adultes peuvent montrer une phénologie distincte au même endroit. En général, l'activité de quête d'*I. ricinus* en Suisse occidentale est limitée par des températures supérieures à 7°C et des valeurs du DS < 15 mmHg (Perret 2003).

Le début de l'activité de quête au printemps dépend de la température en hiver, et peut donc être retardé en altitude. Plus précisément, les tiques en quête sont observées quand la moyenne de la température maximale journalière calculée sur 5 jours est supérieure à 7°C (Perret *et al* 2000). La date du pic du printemps arrive plus tôt dans l'année si la température cumulée en janvier est élevée et l'apparition d'un pic d'automne dépend de la température à la fin du printemps et au début de l'été (Perret 2003). Ainsi, Randolph *et al* (2002) expliquent l'absence d'un pic d'automne en Grande Bretagne en fonction des basses températures en été. Le pic d'automne est possible grâce à deux phénomènes, un démographique, caractérisé par l'apparition de nouvelles nymphes dérivées des larves gorgées au printemps, et l'autre comportemental, représenté par la réémergence des nymphes du printemps qui n'ont pas trouvé un hôte auparavant.

Nous avons commenté dans la section précédente l'influence du climat sur la biologie des tiques. Leur comportement se reflète sur l'activité de quête le long de l'année, c'est-à-dire sur la phénologie. Des périodes prolongées avec des valeurs du DS élevées raccourcissent simultanément la durée de vie des tiques et la durée de leur activité de quête (Perret *et al* 2000). Quand le DS augmente en été, la densité de tiques en quête diminue tandis que des valeurs basses du DS au printemps et en automne favorisent leur activité de quête (conditions optimales pour son évolution). Des valeurs du DS élevées au début du printemps peuvent empêcher ou réduire considérablement le pic de printemps (Perret *et*

al 2000) en augmentant la mortalité des tiques, ce qui pourrait expliquer partiellement une basse activité de quête. D'après Randolph (2004b), une densité de tiques en quête réduite est expliquée par divers facteurs, tels que la mortalité des tiques (par épuisement de leurs réserves), une proportion importante de tiques en repos mais également par une proportion élevée de tiques fixées sur les hôtes.

2.3 L'AGENT PATHOGÈNE

2.3.1 SYSTÉMATIQUE

L'agent étiologique de la borréliose de Lyme est une bactérie de la famille des *Spirochaetaceae* et du genre *Borrelia* appartenant au complexe *B. burgdorferi* sensu lato. Le genre *Borrelia* inclut aussi les borrélioses des fièvres récurrentes.

Phylum	<i>Spirochaetes</i>		
Classe	<i>Spirochaetes</i>		
Ordre	<i>Spirochaetales</i>		
Famille	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Serpulinaceae</i>
Genre	<i>Borrelia</i>	<i>Leptonema</i>	<i>Brachyspira</i>
	<i>Brevinema</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Serpulina</i>
	<i>Clevelandina</i>		
	<i>Cristispira</i>		
	<i>Diplocalyx</i>		
	<i>Hollandina</i>		
	<i>Pillotina</i>		
	<i>Spirochaeta</i>		
	<i>Treponema</i>		

Tableau 2 **Systématique des spirochètes selon Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2001. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. p. 165.**
www.springer.com

Des centaines d'isolats de *B. burgdorferi* sl ont été obtenus à partir de sources biologiques diverses (tiques, hôtes, patients atteints de la borréliose de Lyme) dans de nombreuses régions géographiques. Des analyses moléculaires telles que le séquençage ont été employées pour l'identification des géoespèces de *Borrelia* et ont permis d'établir un groupe de 12 espèces appartenant au complexe *B. burgdorferi* sl (Tableau 3). L'homologie entre les différentes séquences du gène ribosomal *rrs* des souches analysées de *B. burgdorferi* sl est très élevée, variant p. ex. entre 95,3% et 99,6% (Le Flèche *et al* 1997). En Europe, sept espèces ont été répertoriées: *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) (Johnson *et al* 1984), *B. garinii* (Baranton *et al* 1992), *B. afzelii* (Canica *et al* 1993), *B. valaisiana* (Wang *et al* 1997), *B. lusitaniae* (Le Flèche *et al* 1997), *B. bissetii* (Postic *et al* 1998) et *B. spielmanii* (Richter *et al* 2006).

En Europe, les principales géoespèces pathogènes pour l'homme sont *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss. Récemment, *B. spielmanii* (souche A14S) a été décrite comme nouvelle espèce pathogène et identifiée dans quelques pays européens (Hollande, Allemagne, Hongrie et Slovaquie)

dans des biopsies de peau chez des patients atteints d'EM (Van Dam *et al* 1993; Wang *et al* 1999b; Michel *et al* 2003; Fingerle *et al* 2004; Földvári *et al* 2005; Maraspin *et al* 2006). Quant au rôle joué par *B. valaisiana* et *B. lusitaniae*, il est encore incertain. Le potentiel pathogénique de *B. valaisiana* pour l'homme s'appuie sur son amplification par PCR à partir de biopsies de patients atteints d'EM et d'ACA (Rijpkema *et al* 1997) et de divers liquides de patients avec d'autres lésions (Ryffel *et al* 1999; Godfroid *et al* 2003). Parallèlement, l'implication de *B. lusitaniae* dans l'épidémiologie de la maladie de Lyme dans le bassin méditerranéen est supportée par la récente identification du premier isolat humain obtenu d'une patiente avec lésions cutanées chroniques (Collares-Pereira *et al* 2004; Da Franca *et al* 2005).

<i>Borrelia</i> sp	Vecteur	Distribution géographique
<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i> <i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> (?)	Eurasie et Amérique du Nord
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	Europe et certaines régions d'Asie
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	Europe et certaines régions d'Asie
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. granulatus</i> <i>I. columnae</i> <i>I. nipponensis</i>	Europe Centrale, Irlande, Grande Bretagne, Hollande, Espagne China, Japon Japon Corée du Sud
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Portugal, Tunisie, Maroc, Europe Centrale et de l'Est (rare)
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Hollande, Danemark, Allemagne, Rép. Tchèque, Slovénie, France, Hongrie, Ukraine
<i>B. bissettii</i>	<i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i> <i>I. ricinus</i> <i>I. spinipalpis</i>	Amérique du Nord, Slovénie et Slovaquie
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Japon
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	Japon
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Chine
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Japon
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	Amérique du Nord

Tableau 3 Génoespèces de *B. burgdorferi* sl et leur distribution géographique (Wang *et al* 1999a; Bergström *et al* 2002; Ferquel *et al* 2006; Richter *et al* 2006).

2.3.2 MORPHOLOGIE

Les spirochètes responsables de la borréliose de Lyme sont des bactéries microaérophiles, de forme hélicoïdale irrégulière et pourvues de mouvements de rotation et de translation. Leur taille varie de 10 à 30 µm de long et leur diamètre de 0,18 à 0,25 µm (Figs. 5 et 6).

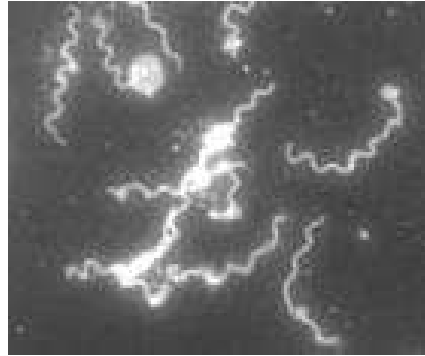


Fig. 5 *Borrelia burgdorferi* dans le milieu de culture BSK H observés au microscope à fond noir.
<http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cqi-bin/pdbs/2d-page/extern/index.cgi>

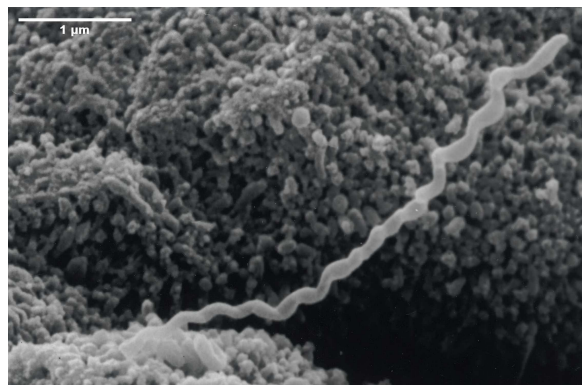


Fig. 6 Spirochète dans l'intestin d'une femelle *I. ricinus* après 2 heures de repas sanguin (microscope électronique à balayage Philips XL 20). Photo: Michèle Vlimant. Laboratoire de Physiologie Animale. Université de Neuchâtel.

Les extrémités de la cellule sont pointues et servent de point d'insertion à 7-11 flagelles périplasmiques disposés asymétriquement entre la paroi externe et la membrane cytoplasmique. Curieusement, chaque flagelle est attaché d'un seul côté et ils se chevauchent au centre de la cellule (Johnson *et al* 1984) (Fig. 7). La membrane externe contient d'abondantes lipoprotéines (dont les plus étudiées sont les protéines de surface OspA - OspF).

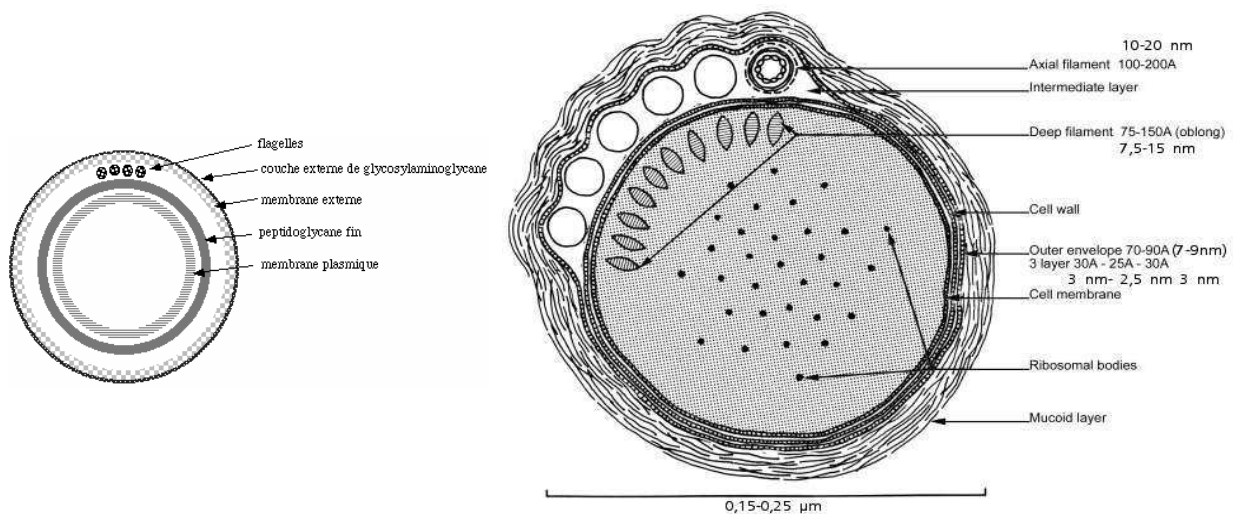


Fig. 7 Schéma de la coupe transversale de *B. burgdorferi*.
<http://www.techmicrobio.net/systematique/GramNegatif/Spirochetes/Spirochetes.html>

Son génome est unique par sa structure, son organisation et son nombre de copies. Il est relativement petit, constitué d'un chromosome linéaire d'environ 950 paires de kilobases et de 21 plasmides extrachromosomiques (9 circulaires et 12 linéaires) qui représentent un peu plus de 600 paires de kilobases. Le nombre de copies et la taille des plasmides peuvent varier selon les isolats de *Borrelia* sp. Les gènes ribosomiaux diffèrent de la plupart des bactéries puisque on trouve une seule copie du 16S rRNA et deux copies du tandem 23S - 5S rRNA (Schwartz *et al* 1992). La grande variabilité intraspécifique de la région intergénique (spacer) entre les deux tandems 23S - 5S a permis l'identification des espèces appartenant au complexe *B. burgdorferi* par PCR et RFLP (Postic *et al* 1994,1996). La séquence complète du génome de *B. burgdorferi* ss (souche B31) a été publiée à la fin des années 90 (Fraser *et al* 1997; Casjens *et al* 2000). Les gènes codés par les plasmides présentent un grand intérêt puisqu'ils sont impliqués dans les mécanismes d'adaptation et de pathogénicité des spirochètes.

2.3.3 CYCLE DE VIE ET ÉCOLOGIE

Le cycle de *Borrelia* sp dans la nature est maintenu par la circulation du pathogène entre son vecteur, la tique, et une large variété d'hôtes réservoirs. Ce cycle varie géographiquement et est déterminé par des facteurs spécifiques liés aux populations de tiques et aux hôtes. La tique *I. ricinus* acquiert les spirochètes en se nourrissant sur des animaux infectés. Dans la plupart des tiques à jeun, les spirochètes sont normalement confinés dans l'intestin (Monin *et al* 1989; Lebet et Gern 1994). La migration des spirochètes à l'intérieur de la tique et leur propagation vers l'hôte se produisent pendant le repas sanguin. Au début du repas il y a une multiplication des spirochètes dans l'intestin; une partie traverse la paroi intestinale et arrive dans l'hémolymphe, milieu qui permet sa migration vers les glandes salivaires et aussi vers d'autres organes tels que les ovaires.

L'expression des protéines de la membrane externe de *Borrelia* est modifiée avant sa transmission à l'hôte. Ces changements sont déclenchés par des signaux environnementaux comme l'augmentation de température et la diminution du pH occasionnée par le repas sanguin (Schwan *et al* 1995; Schwan et Piesman 2000). L'OspA est exprimée par les spirochètes dans l'intestin de la tique à jeun et contribue à son adhésion à l'épithélium intestinal (Schwan et Burgdorfer 1987; Pal *et al* 2000). L'expression d'OspC commence après le début du repas sanguin et est impliquée dans la migration des spirochètes de l'intestin de la tique vers ses glandes salivaires avant de pénétrer les tissus de l'hôte (Anderson *et al* 1989; Schwan *et al* 1995). La diffusion des spirochètes entre la tique et son hôte arrive via la salive de la tique lors du repas sanguin (Ribeiro *et al* 1987; Gern *et al* 1990). La transmission de *Borrelia* de l'hôte vers la tique au cours du repas sanguin ainsi que la cinétique d'expression des protéines n'est pas aussi bien connue que celle de la tique vers l'hôte (Kurtenbach *et al* 2002). Le succès de propagation du pathogène de l'hôte à la tique dépend de l'espèce d'hôte, de sa réponse immunitaire et aussi du nombre de tiques fixées sur celui-là. La transmission de borrelies par *co-feeding* entre tiques infectées et non infectées fixées à proximité sur un hôte et se nourrissant simultanément (en absence d'infection systémique) est également source d'infection pour les tiques (Gern et Rais 1996; Randolph *et al* 1996).

L'efficacité de la transmission du pathogène par la tique à l'hôte augmente avec le temps de fixation de la tique sur l'hôte. La transmission par *I. ricinus* est peu efficace pendant les 24 premières heures (Kahl *et al* 1998a; Crippa *et al* 2002) et à ce stade elle dépend de l'espèce de *Borrelia* considérée, *B. afzelii* étant transmis plus tôt que *B. burgdorferi* ss (Crippa *et al* 2002). Notons que *B. burgdorferi* ss est transmis par *I. scapularis* seulement 48 h après le début du repas sanguin (Piesman *et al* 1987; Piesman 1993). Ceci reflète les différences dans la dynamique de transmission de *Borrelia* en Europe et aux Etats-Unis. D'autre part, certaines tiques présentent une infection systémique qui touche plusieurs organes. La présence de bactéries dans les glandes salivaires de la tique déjà au début du repas sanguin favorise vraisemblablement une transmission plus rapide du pathogène. La proportion d'infection systémique fluctue entre 5% et 36% chez *I. ricinus* (Burgdorfer *et al* 1983; Lebet et Gern 1994) et est très rare chez *I. scapularis*, ce qui pourrait expliquer les observations précédentes.

Si les borrelies subsistent à l'intérieur de la tique après la mue d'un stade à l'autre on parle de transmission transstadiale (larve à nymphe, nymphe à adulte). Ceci sera possible si le repas sanguin est fini ou a atteint un certain seuil (Dizij et Kurtenbach 1995). Les borrelies présentes dans les ovaires peuvent être transmises par la femelle à la génération suivante (transmission aux œufs et aux larves résultant de l'éclosion); ce phénomène s'appelle transmission transovarienne. La contribution de la transmission transovarienne dans le maintien de l'infection par *Borrelia* sp est modeste. La proportion des larves en quête déjà infectées dans la nature est d'environ 3% (Wilske *et al* 1987; Zhiova *et al* 1994; Bellet-Edimo 1997; Bellet-Edimo *et al* 2005). Notons que si ce phénomène est rare chez *I. ricinus*, lorsqu'il a lieu le pourcentage d'œufs infectés est généralement élevé (Bellet-Edimo *et al* 2005).

Les rapports établis entre les spirochètes responsables de la borréliose de Lyme, son vecteur et leurs hôtes sont très complexes et variés en raison de:

- La variabilité génétique et phénotypique du pathogène (des 12 génoespèces identifiées, *B. garinii* s'avère la plus polymorphe).
- Le nombre élevé de vertébrés (environ 300 espèces) qui peuvent jouer un rôle dans l'écologie de *B. burgdorferi* (Anderson 1991), même si seulement un petit nombre sont reconnus comme hôtes réservoirs.
- La spécificité hôte - *Borrelia* sp, marquée par la spécificité du système du complément de l'hôte (Kurtenbach *et al* 1998c).

2.3.4 PRÉVALENCE D'INFECTION

De nombreuses études ont été entreprises en Europe sur l'infection et la distribution des espèces de *Borrelia* chez les tiques en quête. D'après Rauter et Hartung (2005), le taux d'infection global moyen est de 13,7%, significativement supérieur chez les adultes (18,6%) que chez les nymphes (10,1%). La prévalence d'infection chez *I. ricinus* exhibe une grande variabilité géographique et c'est en Europe centrale que l'on trouve le taux d'infection le plus élevé, avec une augmentation significative pour les adultes de l'ouest vers l'est de l'Europe.

Le complexe *B. burgdorferi* si regroupe 12 espèces dont sept sont présentes en Europe (cf. 2.3.1). Rauter et Hartung (2005) signalent *B. afzelii* (38%) et *B. garinii* (33%) comme les espèces les plus abondantes. Une situation différente est observée par Hubálek et Halouzka (1997) qui rapportent *B. garinii* (39%) plus souvent que *B. afzelii* (37%) à travers l'Europe. Selon Saint Girons et al (1998) *B. garinii* est la génoespèce la plus fréquemment isolée (44%) suivie de *B. afzelii* (27%) bien que des isolats humains et des rongeurs ont été inclus dans leur étude. *B. burgdorferi* ss est largement distribué en Europe centrale alors qu'elle n'est que rarement isolée en Europe de l'est (Hubálek et Halouzka 1997). Curieusement, *B. valaisiana* est prépondérante en Irlande (Kirstein et al 1997b,b; Gray et al 2000) -où *B. afzelii* est presque absente- et également présente en Russie (Postic et al 1997; Korenberg 2000) et dans une vingtaine de pays européens comme indiqué récemment par Rauter et Hartung (2005). *B. lusitaniae* est dominante dans le bassin méditerranéen, concrètement en Afrique du Nord (Zhioua et al 1999; Younsi et al 2001, 2005; Sarih et al 2003; Dsouli et al 2006) et au Portugal (De Michelis et al 2000; Baptista et al 2004) tandis qu'elle est peu abondante et présente une distribution ponctuelle en Europe centrale et de l'est. *B. lusitaniae* a été signalée sporadiquement en République Tchèque, Moldavie et Ukraine (Postic et al 1997), en Slovaquie (Gern et al 1999), en Pologne (Mizak et Krol 2000), en Espagne (Barral et al 2002), en France (Richter et al 2003), en Bulgarie (Christova et al 2003), en Turquie (Güner et al 2003), en Allemagne (Richter et al 2006) et en Italie (Bertolotti et al 2006). Quelques études ont confirmé le potentiel pathogène de *B. spielmanii* comme agent de la borréliose de Lyme en Europe mais rares sont les informations sur la présence de cette génoespèce dans les tiques en quête. *B. spielmanii* a été identifiée dans les tiques en quête et dans celles récupérées des lérots et muscardins principalement en France (Richter et al 2004). Ces auteurs ont obtenu une prévalence pour cette génoespèce d'entre 5% et 25% des tiques infectées. Richter et al (2004) montrent une association stricte de cette génoespèce avec des hôtes réservoirs particuliers, le lérot et le muscardin, ce qui la différencie des autres spirochètes responsables de la borréliose de Lyme. Apparemment *B. spielmanii* présente une distribution restreinte et n'a été signalée que dans 4 tiques en Allemagne (Rauter et al 2002; Michel et al 2003), dans 1 tique en République Tchèque (Derdáková et al 2003) et dans 1 tique en Ukraine (Nefedova et al 2005), avec des prévalences d'infection très basses parmi les tiques infectées, inférieures à 1.5%.

En Suisse, le taux d'infection varie considérablement dans les populations de tiques examinées autant à une échelle régionale que locale (Aeschlimann et al 1986; Miserez et al 1990; Jouda et al 2004a,b; Lommano 2005; Schneider 2005). Des valeurs comprises entre 5% et 40% pour les nymphes et entre 22% et 48% pour les adultes ont été répertoriées, ce qui situe notre pays parmi ceux ayant la plus haute prévalence d'infection. D'après Jouda et al (2004a), l'altitude a une influence directe sur l'infection des tiques (surtout sur les nymphes) et aussi sur la diversité des espèces identifiées (la plus grande diversité se trouve à basse altitude).

Cinq des génoespèces de *Borrelia* les plus fréquentes en Europe ont été aussi identifiées en Suisse, bien que la présence de *B. lusitaniae* soit rare (Jouda 2003,2004a,b; Casati et al 2004). *B. afzelii* est l'espèce prédominante en Valais (Burri 2005) et à Fribourg (Lommano 2005) tandis qu'à Neuchâtel (Jouda et al 2004a) et au Jura (Schneider 2005) *B. garinii* est en première position. *B. spielmanii* et *B. bissettii* n'ont jamais été identifiées en Suisse.

Les infections multiples sont constatées dans de nombreuses régions européennes avec des valeurs d'environ 13% (Rauter et Hartung 2005). L'infection mixte la plus fréquente est *B. garinii* - *B. valaisiana* cependant d'autres combinaisons ont été identifiées.

2.4 LES HÔTES RÉSERVOIRS

On parle habituellement des hôtes réservoirs pour se référer aux animaux qui participent significativement à la circulation et au maintien des spirochètes dans la nature. Selon la définition donnée par Kahl *et al* (2002), les vertébrés capables d'agir comme hôtes réservoirs doivent satisfaire quelques conditions:

- Servir d'hôtes aux tiques infectées.
- Acquérir le pathogène pendant le repas sanguin de la tique infectée.
- Permettre la multiplication et la survie du pathogène pendant une longue période.
- Constituer une source d'infection pour les autres tiques fixées sur lui.

En Europe, l'identification de ces réservoirs est réalisée principalement par xénodiagnose et par comparaison des taux d'infection entre les larves gorgées récupérées directement des hôtes et les larves en quête récoltées sur le terrain.

I. ricinus peut parasiter plus de 300 espèces différentes de vertébrés (Anderson 1991) dont plusieurs ordres de mammifères (insectivores, carnivores, artiodactyles, lagomorphes, rongeurs), des oiseaux et des reptiles. Parmi tous ces réservoirs potentiels pour *B. burgdorferi* si seul un petit nombre a été étudié concernant leur infectivité pour les tiques, spécialement des rongeurs car ils sont faciles à piéger et à manier en captivité. Le premier isolement de *B. burgdorferi* à partir des mulots (*Apodemus flavicollis*) et campagnols (*Clethrionomys glareolus*) a été effectué en Suède (Hovmark *et al* 1988).

Diverses études réalisées en Europe, en Asie et aux États-Unis ont permis d'établir comme réservoirs, entre autres, certaines espèces de rongeurs: *Apodemus* sp et *Clethrionomys* en Eurasie (Aeschlimann *et al* 1986; Matuschka *et al* 1992; Humair *et al* 1993) et *Peromyscus* sp et des rats aux États-Unis (Levine *et al* 1985; Brown et Lane 1992). D'autres mammifères ont été aussi reconnus comme réservoirs en Europe; c'est le cas des musaraignes et des lièvres (Tälleklint et Jaenson 1993, 1994), des loirs (Matuschka *et al* 1994,1999), des hérissons (Gray *et al* 1994; Gern *et al* 1997) et des écureuils (Craine *et al* 1997; Humair et Gern 1998). D'autres espèces impliquées dans la circulation de *B. burgdorferi* si dans la nature sont proposées par Gern *et al* (1998) et Gern et Humair (2002).

Pour les mammifères de plus grande taille, leur rôle comme hôtes réservoirs a toujours été très contesté. Certains ongulés (chevreuils, chamois, cerfs) ont été longtemps considérés comme ne jouant pas un rôle de réservoirs pour la transmission de borrélioses car aucune infection systémique n'était détectée et aucun spirochète isolé chez ces hôtes (Telford 3rd *et al* 1988; Jaenson et Tälleklint 1992; Matuschka *et al* 1993; Kurtenbach *et al* 1998c). Cependant, Oliver *et al* (1992) réussissent à infecter des larves et des nymphes d'*I. scapularis* en les gorgeant sur des cervidés infectés expérimentalement. De plus, Kimura *et al* (1995) et Pichon *et al* (2000) isolent et identifient des

spirochètes dans des biopsies de cervidés par PCR. Ces données alimentent la controverse sur le rôle de ces animaux dans le cycle des spirochètes. D'autant plus que Kurtenbach *et al* (1998c), en étudiant la sensibilité de différentes génoespèces de *Borrelia* aux sérums de divers hôtes, montrent l'effet "borrélicide" des sérums de cerfs. Ainsi on pourrait assister à une "dilution" de l'infection dans les populations de tiques de la nature par l'élimination des spirochètes présents dans les tiques après leur repas sur ces hôtes. Néanmoins, ces animaux sont des hôtes importants pour *I. ricinus*, principalement pour les femelles, contribuant de cette manière au maintien de la population de tiques et si leur nombre devient important dans une région, ils contribuent fortement à l'augmentation de la densité de tiques. S'il semble clair que ces hôtes ne développent pas des infections systémiques, ils peuvent, cependant, servir de supports pour l'infection des tiques grâce au phénomène de co-feeding (Gern et Rais 1996). Une telle transmission a été montrée par Kimura *et al* (1995) et Ogden *et al* (1997) chez des ongulés. Certainement que d'autres données sont nécessaires pour comprendre le rôle réel de ces animaux dans la circulation des borréliés dans la nature.

La pathologie de la borréliose de Lyme chez les hôtes sauvages est difficile à établir car, en général, ceux-ci sont porteurs de divers parasites (des bactéries, des protozoaires, des helminthes, des poux, etc). La réponse immunologique de l'hôte déclenchée après une piqure de tique infectée par *Borrelia* est primordiale dans la suite du processus de transmission et d'amplification du pathogène. Plusieurs travaux ont prouvé une association spécifique hôte-génoespèce de *Borrelia*. Ainsi *B. garinii* a été isolée à partir des tiques des oiseaux migrateurs en Suède et au Danemark (Olsen *et al* 1993,1995) et chez *Turdus* sp en Suisse (Humair *et al* 1998; Poupon *et al* 2006); *B. afzelii* à partir des mulots et de campagnols (Humair *et al* 1993,1995,1999; Kurtenbach *et al* 1995,1998a,2001); *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss à partir de l'écureuil roux *Sciurus vulgaris* (Humair et Gern 1998) et *B. valaisiana* chez les passériformes (Humair *et al* 1998; Poupon *et al* 2006). Il est aussi prouvé que des mulots du genre *Apodemus* peuvent être des hôtes réservoirs pour *B. garinii* OspA sérotype 4 (Hu *et al* 2001; Hügli *et al* 2002).

2.4.1 IDENTIFICATION DES HÔTES A PARTIR DU REPAS SANGUIN

L'analyse du repas sanguin d'*Ixodes* pour l'identification des hôtes réservoirs par PCR-RLB a débuté avec les travaux de Kirstein et Gray (1996) basés sur l'ADN mitochondrial du gène codant pour le cytochrome *b*. Pichon *et al* (2003,2005,2006) ont modifié cette technique avec le choix d'un gène nucléaire, le 18S rRNA. Une étude similaire en Espagne a permis la discrimination des hôtes au niveau du genre visant les gènes 18S rRNA et 12S rRNA (Estrada Peña *et al* 2005).

Nous avons progressé dans ce processus de détermination des hôtes avec l'identification au niveau de l'espèce des vertébrés par l'analyse de leur ADN présent dans l'intestin de la tique à jeun grâce à la méthode développée par Humair *et al* (*in press*). Plusieurs difficultés sont rencontrées dans cette voie de recherche pour l'identification de l'ADN de l'hôte en raison de la petite quantité de sang encore présent dans la tique après la mue, qui peut encore diminuer en fonction du temps écoulé depuis le dernier repas de la tique et aussi, en raison d'une possible contamination externe des tiques par de l'ADN d'autres vertébrés avec lesquels elles auraient pu être en contact sans succès d'attachement.

L'intérêt de cette méthode est l'identification de la faune présente dans un biotope et l'identification des hôtes réservoirs, qui sont parfois difficiles à capturer et à manipuler en laboratoire.

2.5 OBJECTIFS

Une étude récente réalisée à Neuchâtel sur le versant sud de la montagne de Chaumont a montré que la densité des tiques *I. ricinus* et leur infection par *Borrelia* sp diminuent en fonction de l'altitude (Jouda *et al* 2004a). La phénologie décrit l'évolution de la densité des tiques en quête sur une année; celle-ci est caractérisée par des événements cycliques tels que le début de l'activité des tiques, le pic et la chute de la densité des tiques. A partir de ces observations, nous avons voulu étendre notre recherche sur l'évolution des populations de tiques dans des biotopes différents avec les objectifs suivants:

- Suivre l'activité saisonnière des tiques en fonction de l'altitude sur deux versants de la montagne de Chaumont (Neuchâtel) pendant la période 2003-2005 en considérant des facteurs climatiques tels que l'humidité relative, la température et le déficit de saturation. Une troisième région d'étude a été choisie dans le canton du Valais, près de Sion, où le climat est totalement différent de celui rencontré à Neuchâtel
- Déterminer la prévalence d'infection dans ces biotopes et identifier les géoespèces de *B. burgdorferi* si chez *I. ricinus* par PCR et Reverse Line Blot (RLB) (Rijpkema *et al* 1995; Alekseev *et al* 2001; Poupon *et al* 2006).
- Identifier le contenu du repas sanguin présent dans l'intestin de tiques à jeun pour connaître l'hôte vertébré sur lequel la tique a pris son dernier repas sanguin et établir les hôtes réservoirs impliqués dans le cycle de *B. burgdorferi* dans les régions d'étude (Humair *et al*, *in press*).
- Établir le lien entre nos observations et les conditions microclimatiques caractéristiques dans chaque région de récolte et évaluer l'influence du climat dans la distribution des tiques et dans l'incidence de l'infection par *Borrelia*.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 SITES D'ÉTUDE

Nous avons choisi pour notre travail de terrain trois biotopes différents dans deux régions en Suisse occidentale, concrètement dans les cantons de Neuchâtel et du Valais (Figs. 8, 9, 10 et 11). Il s'agit de forêts mixtes qui s'étendent jusqu'à 1000 m d'altitude, avec dominance d'arbres caduques. À Neuchâtel, nous avons conservé les trois stations de la montagne de Chaumont avec exposition sud étudiées par Jouda *et al* (2004a): Haut: 900 m, Moyenne: 740 m et Bas: 620 m, et nous avons ajouté une quatrième située à 1070 m d'altitude. Pour étudier l'influence de l'exposition sur la phénologie des tiques, trois stations ont été choisies aux altitudes équivalentes sur le versant nord de la même montagne: à 780 m, 910 m et 1010 m. En Valais, la région d'étude se situe à Salins, près de Sion, où trois altitudes ont été aussi considérées: 750 m, 880 m et 1020 m (Tableau 4).

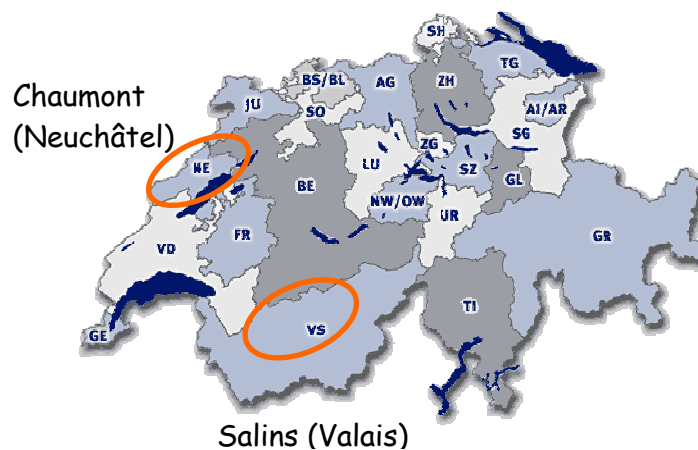


Fig. 8 Localisation des deux régions d'étude en Suisse occidentale.
<http://www.gonthier.ch/ATLAS/SUISSE/CANTON2.HTM>



Fig. 9 Gradient d'altitude dans la région de Salins (Valais) avec les sites de récolte situés à 750 m, 880 m et 1020 m. earth.google.com



Fig. 10 Gradient d'altitude sur la montagne de Chaumont (Neuchâtel) avec les sites de récolte sur le versant nord (780 m, 910 m et 1010 m) et le versant sud (620 m, 740 m, 900 m et 1070 m). earth.google.com

Site de récolte	Station	Altitude	Coordonnées suisses
Chaumont nord (NE)	I	780 m	560000 / 206750
Chaumont nord (NE)	II	910 m	560600 / 207200
Chaumont nord (NE)	III	1010 m	561085 / 207653
Chaumont sud (NE)	B	620 m	562287 / 206035
Chaumont sud (NE)	M	740 m	562670 / 207125
Chaumont sud (NE)	H	900 m	563121 / 207718
Chaumont sud (NE)	X	1070 m	563470 / 208470
Salins (VS)	1	750 m	592750 / 117600
Salins (VS)	2	880 m	593250 / 117400
Salins (VS)	3	1020 m	593550 / 117200

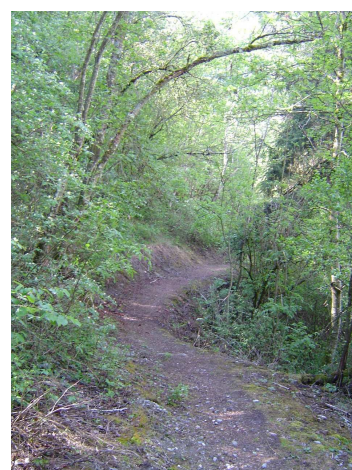
Tableau 4 Détails des sites de récolte dans les différentes régions d'étude à Neuchâtel et en Valais.



A) Salins, 750 m



Salins, 880 m



Salins, 1020 m



B) Chaumont nord, 780 m



Chaumont nord, 910 m



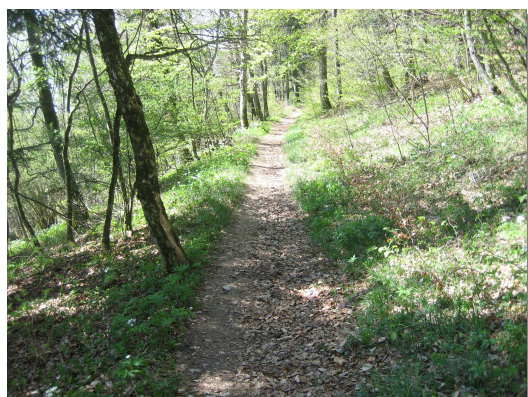
Chaumont nord, 1010 m



C) Chaumont sud, 620 m



Chaumont sud, 740 m



Chaumont sud, 900 m



Chaumont sud, 1070 m

Fig. 11 Sites de récolte le long des gradients altitudinaux en Valais et à Neuchâtel. A) Valais (photos: Caroline Burri); B) Chaumont nord (photos: Francisca Morán); C) Chaumont sud (photos: Olivier Rais).

3.2 RÉCOLTE DE TIQUES

La durée de notre étude est variable selon la région considérée:

- Chaumont sud: de février 2003 à décembre 2005.
- Chaumont nord: de septembre 2003 à décembre 2005.
- Valais: de mars 2004 à février 2005.

La récolte des tiques (nymphe et adultes) dans chaque terrain a été réalisée à un rythme mensuel sur une distance variant entre 100 et 150 m avec un drapeau blanc de 1 m². Tous les 25 m notre drapeau est retourné et inspecté de manière à enlever les tiques accrochées. Elles sont prélevées et placées dans des tubes en plastique avec quelques brins d'herbe fraîche qui apportent l'humidité appropriée pour leur conservation. Au laboratoire, ces tubes sont placés dans un bocal avec de l'eau au fond et les tiques sont maintenues vivantes à température ambiante et à une humidité proche du 95% jusqu'au moment de leur utilisation. La densité de tiques est exprimée en nombre de tiques / 100 m².

L'humidité relative de l'air et la température (au sol, à 10 cm et à 60 cm) sont mesurées dans chaque station lors de chaque récolte. Nous avons employé un mini-thermomètre Testo pour mesurer la température au sol et un thermo-hygromètre Testo 615 pour le reste des mesures.

Le déficit de saturation (DS), qui nous donne une mesure du pouvoir desséchant de l'atmosphère, en mmHg, a été calculé selon Randolph et Storey (1999) et Perret *et al* (2000):

$$DS = (1-HR/100)*4.9463*e^{0.0621T}$$

Où: T, température à 60 cm (°C)

HR, humidité relative (%)

3.2.1 PHÉNOLOGIE

Elle s'explique à partir de diverses variables statistiques descriptives (Eisen *et al* 2003; Perret 2003) dont voici les plus employées dans notre travail:

- Densité des tiques: exprimée comme nombre de tiques / 100 m².
- CTD (Cumulative Tick Density): valeur annuelle de la densité de tiques ou nb de tiques / 100 m² / année.
- PTD (Peak Tick Density): densité maximale mesurée sur une année.
- PTDi (Peak Density of Infected Tick): le risque maximal de rencontrer une tique infectée est calculé en multipliant le PTD * Prévalence d'infection.
- O10 (Onset 10%): début de l'activité des tiques. Date à laquelle la densité de tiques dépasse le 10% du PTD.
- F10 (Fall 10%): fin de l'activité des tiques. Date à partir de laquelle la densité de tiques reste en dessous du 10% du PTD.

3.3 DÉTECTION ET IDENTIFICATION DE *BORRELIA*

Chaque mois un maximum de 20 nymphes, 10 mâles et 10 femelles par site de récolte a été analysé pour la détection de *Borrelia* sp. Pour l'extraction de l'ADN des spirochètes nous avons employé deux méthodes différentes: la mise en culture dans du milieu BSK suivie de la préparation d'un thermolysat et l'extraction directe à partir de la tique sans amplification préalable. Quand ces deux méthodes d'extraction ont été employées simultanément, chaque tique a été coupée en deux et chaque moitié traitée indépendamment. Pour l'identification de *Borrelia* sp nous avons réalisé une PCR-RLB (cf. 3.3.4).

Au cours de ce travail de recherche plusieurs souches de *B. burgdorferi* si ont servi de références ou contrôles positifs: NE11, NE632, VS116, B31, PotiB1, PotiB2 et PotiB3.

Souche	Espèce	Source	Origine
NE11	<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i>	Université de Neuchâtel, CH (Hu)
NE632	<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i>	Université de Neuchâtel, CH (Hu)
VS116	<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i>	Institut Central des Hôpitaux Valaisans, CH (Péter)
B31	<i>B. burgdorferi ss</i>	<i>I. scapularis</i>	Institut Pasteur Paris, F (Baranton)
PotiB1, PotiB2, PotiB3	<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Portugal (Nuncio)

3.3.1 MISE EN CULTURE DES TIQUES ET EXTRACTION D'ADN

L'amplification des borrélioses est réalisée dans le milieu de culture BSK H (**Barbour-Stoenner-Kelly**), modifié selon Sinsky et Piesman (1989). Le milieu original décrit par Kelly a subi plusieurs améliorations, entre autres, l'addition d'antibiotiques pour réduire la contamination par d'autres bactéries.

Avant toute manipulation, chaque tique est brièvement rincée dans de l'éthanol 70%. Ensuite, elle est coupée longitudinalement avec des microciseaux et une moitié est placée dans un cryotube contenant 1.2 ml de milieu BSK H. L'autre moitié sera employée pour l'extraction directe d'ADN à l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH; cf. 3.3.2). Pour éviter de possibles contaminations entre les tiques, les brucelles et ciseaux employés sont soigneusement nettoyés à l'eau de javel et rincés à l'éthanol 70% après chaque utilisation.

Les cultures ont été incubées à 34°C pendant deux semaines puis on a procédé directement au lavage des cultures sans vérifier la présence des spirochètes au microscope à fond noir. Ponctuellement nous avons examiné la présence de spirochètes dans les cultures. Les lames ont été préparées sous une hotte stérile à flux laminaire; une goutte du milieu est déposée entre lame et lamelle et ensuite observée au microscope à fond noir (Wild MD GA-10822), avec l'objectif 50X.

Le lavage des cultures, qui permet la concentration des bactéries, se déroule comme suit:

- Centrifuger le milieu 15 - 30 minutes à 10.000 rpm.
- Aspirer le surnageant, suspendre le culot avec 1ml de PBS / MgCl₂ pH=7,3, vortexer et centrifuger 15 minutes à 10.000 rpm. Répéter cette étape 2 fois.
- Aspirer le surnageant et ajouter 30 µl d'eau.
- Vortexer et chauffer 15 minutes à 100°C dans un bloc chauffant.
- Laisser refroidir les tubes et centrifuger brièvement pour enlever la condensation dans les couvercles.
- Conserver l'ADN à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation.

Des contrôles négatifs sont prévus à chaque manipulation; il s'agit de tubes qui ne contiennent que du milieu de culture (sans addition de la demi-tique), nous permettant d'assurer l'absence de contaminations ou de faux positifs.

3.3.2 EXTRACTION D'ADN AU NH₄OH 0,7M

L'extraction directe de l'ADN des tiques a été faite soit à partir d'une demi-tique (simultanément avec la mise en culture) soit à partir de la tique entière (modifié à partir de Guy et Stanek (1991) et de Rijpkema *et al* (1996a)).

- Préparer une solution de NH₄OH 0,7M.
- Ajouter 100 µl de NH₄OH 0,7M dans chaque eppendorf et plonger chaque tique ou demi-tique dedans.
- Incuber dans un bloc chauffant 15 minutes à 100°C.
- Laisser refroidir brièvement les tubes et centrifuger brièvement pour enlever la condensation dans les couvercles.
- Ouvrir les tubes et laisser évaporer le NH₃ dans le bloc chauffant 15 minutes à 100°C.
- Conserver l'ADN à - 20°C jusqu'au moment de leur utilisation.

Comme pour la mise en culture, des contrôles négatifs ont été prévus; il s'agit de tubes qui ne contiennent que du NH₄OH 0,7M.

3.3.3 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

La PCR, acronyme de l'expression anglaise Polymerase Chain Reaction, ou amplification en chaîne par polymérisation nous permet d'obtenir rapidement une quantité importante de copies à partir d'une séquence double brin d'ADN peu abondant. L'amplification est exponentielle, jusqu'à un million de copies en quelques heures. Les amorces définissent l'échantillon ou séquence cible à amplifier.

Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes –dénaturation, hybridation et élongation– qui se déroulent à températures différentes dans un appareil programmable appelé thermocycleur.

- Dénaturation: à 94°C, les liaisons qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.
- Hybridation (annealing): les amorces se fixent sur les brins simples d'ADN selon le principe de bases complémentaires. La température d'hybridation, autour de 55°C, est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces.
- Élongation: à 72°C, les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ pour la polymérisation du brin d'ADN complémentaire à notre séquence cible. Les ADN polymérases (enzymes qui synthétisent l'ADN dans le sens 5'→3') utilisées en PCR sont thermorésistantes. La plus connue est la Taq polymérase, extraite d'une bactérie, *Thermophilus aquaticus*, vivant près des sources hydrothermales où la température dépasse les 100°C.

Nous avons amplifié un fragment d'ADN d'environ 410 paires de bases qui inclut la région intergénique entre les sous-unités 5S (*rrfA*) - 23S (*rrlB*) de *B. burgdorferi* si codant pour l'ARN ribosomal (Alekseev *et al* 2001) (Fig. 12). La variabilité intraspécifique de cette région intergénique

(spacer) nous permet l'identification des espèces appartenant au complexe *B. burgdorferi* s.l (Postic et al 1994).

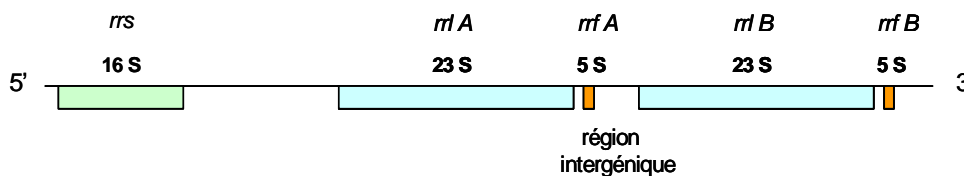


Fig. 12 Schéma de la région intergénique 5S (*rrfA*) - 23S (*rrlB*) amplifiée en PCR.

Chaque réaction PCR se produit dans un petit tube où sont ajoutés tous les produits nécessaires pour la polymérisation: l'ADN à amplifier, les amorces spécifiques choisies, un mélange des 4 désoxyribonucléotides (dNTP's) et la Taq polymérase.

Réaction PCR (50 μ l)

Taq buffer 10X (15 mM MgCl ₂)	5 μ l
dNTP 10 mM	1 μ l
Amorce 23S Bor 10 μ M	1 μ l
Amorce B-5S Bor ¹ 10 μ M	1 μ l
Taq polymérase 5U/ μ l (Qiagen)	0.15 μ l
ADN de la tique ²	10 / 20 μ l
H ₂ O (ajuster jusqu'à 50 μ l)	31.85 / 21.85 μ l

Pour les contrôles positifs nous avons ajouté 50 - 80 ng d'ADN de nos souches de référence dans 30 ou 40 μ l du master mix (selon le traitement des tiques) et nous avons ajusté avec de l'eau jusqu'au volume final de 50 μ l. Pour les contrôles négatifs, l'eau remplace l'ADN à amplifier.

Programme PCR

La dénaturation initiale à 94°C permet l'activation de la Taq polymérase. Durant les 9 cycles suivants la température d'hybridation diminue d'un degré de 60°C jusqu'à atteindre 52°C. Le programme touch down est suivi de 40 cycles supplémentaires de 20 secondes à 94°C, 30 secondes à 52°C et 30 secondes à 72°C. La PCR se termine par une élongation de 7 minutes à 72°C. Les produits amplifiés sont stockés à 4°C jusqu'à leur analyse.

¹ B-5S Bor : amorce marquée à la biotine.

² ADN de la tique: - 10 μ l de la mise en culture d'une ½ tique ou de l'hydrolyse alcaline de la tique entière.
- 20 μ l de l'hydrolyse alcaline d'une ½ tique.

Dénaturation initiale	94°C	3 min	1 ^{er} cycle
Dénaturation	94°C	20 sec	9 cycles Touch d own PCR
Hybridation	60°C à 52°C	30 sec	
Élongation	72°C	30 sec	
Dénaturation	94°C	20 sec	40 cycles
Hybridation	52°C	30 sec	
Élongation	72°C	30 sec	
Élongation finale	72°C	7 min	

3.3.4 RLB (REVERSE LINE BLOT)

La Reverse Line Blot (RLB) est une technique moléculaire avec différentes applications telles que la caractérisation moléculaire des microorganismes, la détection de mutations, l'identification spécifique des microorganismes et aussi la détection des variations alléliques de l'ADN des eucaryotes.

La RLB a été développée pour l'identification des spirochètes du genre *Borrelia* par Rijpkema *et al* (1995), et modifiée et complétée ensuite pour la détection d'*Ehrlichia* sp et *Bartonella* sp (Schouls *et al* 1999; Alekseev *et al* 2001). La PCR - RLB s'est avérée un outil précieux pour les études de diagnostic et d'épidémiologie de la borréliose de Lyme et d'autres pathogènes transmis par la tique comme *Theileria*, *Babesia* et *Anaplasma* (Bekker *et al* 2002; Christova *et al* 2003; Pichon *et al* 2003,2006; García-Sanmartín *et al* 2006; Wielinga *et al* 2006).

L'amplification de l'ADN par PCR est suivie d'une hybridation sur une membrane avec des oligonucléotides spécifiques (sondes) et la détection de géoespèces se fait par chimiluminescence (Fig. 13). Lors de chaque test, nous pouvons déterminer la réactivité d'un maximum de 45 échantillons avec 45 sondes différentes.

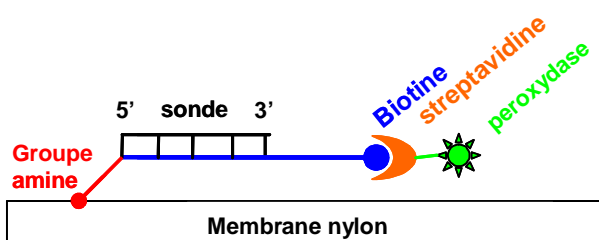


Fig. 13 Schéma du principe de la RLB: couplage covalent des sondes à la membrane et visualisation de l'hybridation par chimiluminescence (complexe streptavidine-peroxydase).

3.3.4.1 AMORCES ET SONDAS SPÉCIFIQUES POUR L'IDENTIFICATION DE *BORRELIA* SP

Pour l'identification des géoespèces du complexe *B. burgdorferi* si nous avons testé la réactivité des produits PCR biotinisés avec sept oligonucléotides spécifiques, répertoriés dans le Tableau 5, selon Rijpkema *et al* (1995) et Poupon *et al* (2006). Dans le même tableau, les séquences des amorces 23S Bor et B-5S Bor que nous avons employées pour l'amplification de l'ADN (Alekseev *et al* 2001) sont également présentées.

Désignation des oligonucléotides	Séquence 5' – 3'	Organisme cible
<u>Amorces</u>		
23S Bor	TCAGGGTACTTAGATGGTTCACTT	<i>B. burgdorferi</i> sl
B-5S Bor	5'-biotine-GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT	<i>B. burgdorferi</i> sl
<u>Sondes</u>		
SL	5'-amino-CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	<i>B. burgdorferi</i> sl
SS	5'-amino-AACACCAATATTTAAAAACATAA	<i>B. burgdorferi</i> ss
GA	5'-amino-AACATGAACATCTAAAAACATAAA	<i>B. garinii</i>
GANE	5'-amino-CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA	<i>B. garinii</i>
AF	5'-amino-AACATTTAAAAATAAATTC AAGG	<i>B. afzelii</i>
VSNE	5'-amino-TATATCTTTTGTTC AATCCATGT	<i>B. valaisiana</i>
LusiNE	5'-amino-TCAAGATTTGAAGTATAAAAATAAAA	<i>B. lusitaniae</i>

Tableau 5 Séquences des amorces et des sondes spécifiques employées pour l'identification de *Borrelia* sp par RLB.

3.3.4.2 ACTIVATION DE LA MEMBRANE (COUPLAGE COVALENT DES SONDÉS)

La première étape de la RLB est l'application des sondes spécifiques sur une membrane de nylon chargée négativement. Ces sondes sont appliquées en lignes dans un système de miniblottier et vont se fixer à la membrane grâce au groupe 5'-amine via une liaison covalente.

Voici le mode opératoire pour activer la membrane:

- Incuber la membrane 10 minutes avec 10 ml d'EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropil) carbodiimide) 16% fraîchement préparé à température ambiante (20°C).
- Rincer la membrane à l'eau (nanopure) et la placer dans le miniblottier sur un support ou coussin en plastique. Aspirer le liquide résiduel.
- Etablir la bonne concentration des sondes. Pour *Borrelia* sp, diluer 75 pmol d'oligonucléotides dans 150 µl de NaHCO₃ 500 mM (pH=8,4).
- Centrifuger brièvement les tubes avant de remplir les puits du miniblottier avec 150 µl des sondes diluées. Laisser vide le premier et le dernier puits.
- Le premier puits marque le bord de la membrane et on le remplit avec de l'encre diluée 1 :100 dans de l'eau.
- Incuber la membrane 1 minute à température ambiante et aspirer ensuite l'excès de solution.
- Retirer la membrane du miniblottier et l'inactiver par incubation pendant 10 minutes dans NaOH 100 mM.
- Rincer la membrane à l'eau et puis la laver avec 100 ml 2xSSPE / 0,1% SDS pendant 5 minutes à 60°C.

- i. À ce moment la membrane est prête à l'emploi. Pour la stocker à 4°C, la laver d'abord avec 100 ml d'EDTA (pH=8) pendant 15 minutes à température ambiante et la conserver scellée sous vide (pour éviter qu'elle se dessèche).

3.3.4.3 HYBRIDATION DE LA MEMBRANE

La membrane est à nouveau placée dans le miniblottier mais tournée 90° par rapport à sa position initiale (Fig. 14). Ainsi, les produits PCR s'appliquent sur la membrane perpendiculairement aux sondes. De cette façon l'hybridation spécifique de l'ADN du pathogène se fait au point de croisement entre la ligne avec les sondes et celle qui contient les échantillons amplifiés. La réaction peut être visualisée grâce à une streptavidine - peroxydase qui réagit avec la biotine attachée aux sondes.

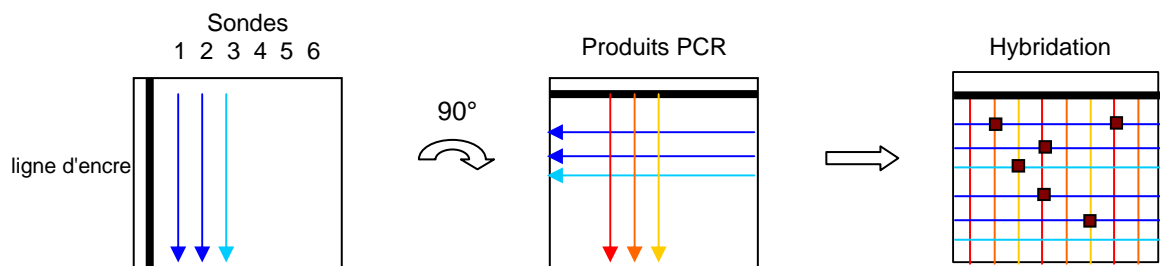


Fig. 14 Schéma du test de la RLB: réaction entre les sondes spécifiques et l'ADN amplifié.

Charger le miniblottier avec les produits PCR de la manière suivante:

- a. Ajouter 10 µl de produit PCR dans 150 µl de 2xSSPE / 0,1% SDS.
- b. Dénaturer le double brin d'ADN pendant 10 minutes à 99°C et refroidir immédiatement dans la glace afin d'éviter un nouvel appariement des bases. Puis centrifuger les tubes brièvement et les placer sur un support.
- c. Incuber la membrane environ 5 minutes à température ambiante dans 100 ml de 2xSSPE / 0,1% SDS.
- d. Placer la membrane dans le miniblottier (ligne d'encre sous les puits) et enlever le liquide résiduel par aspiration.
- e. Remplir les puits avec 150 µl du produit PCR dénaturé (les puits vides seront remplis avec 150 µl du 2xSSPE / 0,1% SDS).
- f. Incuber 60 minutes à 42°C sur une surface horizontale dans le four.
- g. Aspirer les échantillons du miniblottier puis laver la membrane deux fois pendant 10 minutes à 51°C avec 100 ml de 2xSSPE / 0,5% SDS (sous agitation).
- h. Incuber la membrane de 30 à 60 minutes à 42°C dans une bouteille avec 10 ml du conjugué streptavidine-peroxydase dilué 1:4000 dans du 2x SSPE / 0,5% SDS.
- i. Laver la membrane deux fois dans 100 ml de 2xSSPE / 0,5% SDS 10 minutes à 42°C.
- j. Rincer la membrane deux fois dans 100 ml de 2xSSPE 5 minutes à température ambiante.

- k. Les produits PCR marqués à la streptavidine sont détectés par chimiluminescence par incubation de la membrane 1-2 minutes avec les produits de détection ECL.
- l. Exposer la membrane sur un film photographique et développer ce dernier pour visualiser les résultats.

3.3.4.4 DÉSHYBRIDATION DE LA MEMBRANE

La membrane est réutilisable car les sondes restent fixées dessus. Pour enlever l'ADN amplifié fixé sur ces sondes nous procédons ainsi:

- a. Laver la membrane deux fois dans 100 ml de SDS 1% pendant 30 minutes à 80°C.
- b. Laver la membrane dans 100 ml d'EDTA 20 mM (pH=8) pendant 15 minutes à température ambiante.
- c. Conserver la membrane humide et sous vide dans un plastique pour éviter sa dessiccation. La stocker à 4°C jusqu'à la prochaine utilisation.

3.4 DÉTECTION ET IDENTIFICATION DE L'ADN DE L'HÔTE

Une partie importante de ce travail de recherche a été consacrée aux analyses pour la détection et l'identification de l'ADN de l'hôte présent dans l'intestin de la tique qui a servi comme source de son dernier repas sanguin (Humair *et al*, *in press*). Pour mener notre étude nous avons testé des tiques récoltées à Neuchâtel en 2005, sur les deux versants de la montagne de Chaumont et toujours selon un gradient d'altitude (cf. 3.1). Chaque mois un maximum de 20 nymphes, 10 mâles et 10 femelles par site de récolte a été analysé pour la détection de l'ADN des vertébrés. Pour l'extraction de l'ADN nous avons utilisé l'extraction directe à partir de la tique entière avec une solution de NH₄OH 0,7 M (cf. 3.3.2).

Rappelons que des mesures strictes ont été prises afin de réduire voire d'exclure des problèmes de contamination liés à la sensibilité de la méthode adoptée. Les différentes étapes pour la préparation des solutions, l'extraction de l'ADN, la préparation du mélange PCR et l'ajout de l'ADN dans les tubes PCR se passent dans des salles différentes sous des hottes stériles soigneusement nettoyées à l'éthanol 70%, au DNAzap et aux UV avant et après chaque utilisation et réservées exclusivement pour la recherche de l'ADN d'hôtes. La PCR et la RLB (manipulation de l'ADN amplifié) se déroulent dans une salle séparée.

3.4.1 PCR POUR LE REPAS SANGUIN

Nous avons amplifié un fragment d'environ 148 paires de bases du gène mitochondrial 12S rDNA commun aux vertébrés (Humair *et al*, *in press*).

Réaction PCR (50 µl)

Taq buffer 10X (15 mM MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Amorce 12S 6F 100 µM	0.4 µl
Amorce B-12S 9R ³ 10 µM	0.4 µl
Taq polymérase 5U/µl (Qiagen)	0.25 µl
ADN de la tique	20 µl
H ₂ O (ajuster jusqu'à 50 µl)	19.95 µl

Pour les contrôles positifs nous avons ajouté environ 100 ng des échantillons de référence (l'ADN de divers spécimens de vertébrés de la faune suisse dosés au spectrophotomètre) dans 30 µl du master mix et nous avons ajusté avec de l'eau jusqu'au volume final de 50 µl. Pour le contrôle négatif, 20 µl d'eau remplacent l'ADN à amplifier.

Programme PCR

Les conditions de la PCR sont les mêmes que pour l'identification de *Borrelia* sp (cf. 3.3.3).

3.4.2 RLB

Une RLB pour l'identification du repas sanguin chez *I. ricinus* qui nous permet de différencier les principaux groupes des vertébrés au niveau du genre ou de l'espèce a été développée dans notre laboratoire (Humair *et al*, *in press*). L'utilisation de cette technique conjointement à l'identification des borréliés transmises par les tiques nous permet d'avancer dans la détermination des hôtes réservoirs pour les génoespèces de *B. burgdorferi* s1 et la circulation du pathogène dans la nature.

3.4.2.1 AMORCES ET SONDAS SPÉCIFIQUES POUR L'IDENTIFICATION DE L'ADN DE L'HÔTE

Pour l'identification de l'ADN des vertébrés, nous avons testé la réactivité des produits PCR biotinilés avec 35 oligonucléotides spécifiques pour diverses espèces de mammifères, petits rongeurs, oiseaux et lézards (tableau 6; Humair *et al*, *in press*).

3.4.2.2 ACTIVATION DE LA MEMBRANE (COUPLAGE COVALENT DES SONDAS)

Suivre la procédure décrite en 3.3.4.2. La seule différence à cette étape concerne la concentration des sondes (point c). Pour l'identification des vertébrés, diluer 100 pmol des oligonucléotides dans 150 µl de NaHCO₃ 500 mM (pH=8.4). Seules trois sondes - celles pour le lézard, la musaraigne *S. araneus* et des oiseaux du genre *Sylvia* - requièrent une concentration supérieure, 500 pmol (voir tableau 6).

³ B-12S 9R: amorce marquée à la biotine.

Les séquences des amorces 12S 6F et B-12S 9R et des sondes employées pour l'identification de l'ADN de l'hôte présent dans l'intestin de tiques sont détaillées par Humair *et al* (*in press*).

Désignation des oligonucléotides	Organisme cible
<u>Amorces</u>	
12S-6F	Vertébrés
B-12S-9R	Vertébrés
<u>Sondes</u>	
Micromammifères	Muridae
Artiodactyles	Bovidae, Cervidae, Suidae
Oiseaux	Oiseaux
Lézards*	Lézards
Clethrionomys	<i>Clethrionomys glareolus</i>
Apodemus	<i>Apodemus sylvaticus</i> , <i>A. flavicollis</i>
M. agrestis	<i>Microtus agrestis</i> , <i>Micromys minutus</i>
M. arvalis	<i>Microtus arvalis</i>
M. minutus	<i>Micromys minutus</i>
R. norvegicus	<i>Rattus norvegicus</i>
R. rattus	<i>Rattus rattus</i>
Sciurus	<i>Sciurus vulgaris</i>
Glis	<i>Glis glis</i>
Lepus	<i>Lepus europaeus</i>
Erinaceus	<i>Erinaceus europaeus</i>
Neomys sp	<i>Neomys anomalus</i> , <i>N. fodiens</i>
N. anomalus	<i>N. anomalus</i>
T. europaea	<i>Talpa europaea</i>
Vulpes	<i>Vulpes vulpes</i>
Meles	<i>Meles meles</i>
M. erminea	<i>Mustela erminea</i>
M. putorius	<i>M. putorius</i> , (<i>M. nivalis</i>)
Capreolus	<i>Capreolus capreolus</i>
Sus	<i>Sus scrofa</i>
Turdus / Parus	<i>Turdus merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>T. philomelos</i> , <i>T. pilaris</i> , <i>Parus major</i> , <i>P. caeruleus</i>
Erithacus	<i>Erithacus rubecula</i>
Parus	<i>Parus major</i> , <i>P. caeruleus</i>
P. ater	<i>P. ater</i>
Fringilla / Pyrrhula	<i>Fringilla coelebs</i> , <i>F. montifringilla</i> , <i>Pyrrhula pyrrhula</i>
Prunella	<i>Prunella modularis</i>
Sitta	<i>Sitta europaea</i>
Sylvia*	<i>Sylvia atricapilla</i>
Troglodytes	<i>Troglodytes troglodytes</i>
Garrulus	<i>Garrulus glandarius</i>
S. araneus*	<i>S. araneus</i>

Tableau 6 Liste des amorces et des sondes spécifiques employées pour l'identification de l'hôte par RLB (Humair *et al*, *in press*)

3.4.2.3 HYBRIDATION DE LA MEMBRANE

Suivre la procédure décrite en 3.3.4.3. La seule différence à cette étape concerne le point g. La température de lavage de la membrane requise est de 55°C.

4 RÉSULTATS

PUBLICATION 1

Ixodes ricinus density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland).

Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2007. 7: 50-58.

PUBLICATION 2

Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland.

Journal of Medical Entomology. 2007. 44: 683-693.

PUBLICATION 3

Identification of host blood meal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland).

Journal of Medical Entomology. *In press*.

PUBLICATION 4

A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks using PCR and Reverse Line Blotting.

Vector-Borne and Zoonotic Diseases. *In press*.

AUTRES RÉSULTATS

Nous avons inclus dans l'Annexe 2 des résultats complémentaires qui ne sont pas compris dans les articles précédents et qui apportent des informations additionnelles sur les données climatiques obtenues dans les stations de récolte, sur la densité et la phénologie d'*I. ricinus* et des détails sur la prévalence d'infection d'*I. ricinus* et la distribution de génoespèces de *B. burgdorferi* sl.

4.1 PUBLICATION 1

Ixodes ricinus density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato*
along a north-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland)

Caroline Burri¹, Francisca Morán Cadenas¹, Véronique Douet¹, Jacqueline Moret² and Lise Gern¹

Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2007. 7: 50-58.

¹Institut de Biologie, Laboratoire d'Éco-Épidémiologie des Parasites, Université de Neuchâtel, Suisse.

²Institut de Mathématiques, Université de Neuchâtel, Suisse.

Ixodes ricinus Density and Infection Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Along a North-Facing Altitudinal Gradient in the Rhône Valley (Switzerland)

CAROLINE BURRI,¹ FRANCISCA MORAN CADENAS,¹ VERONIQUE DOUET,¹
JACQUELINE MORET,² and LISE GERN¹

ABSTRACT

Questing *Ixodes ricinus* ticks were sampled monthly along a north-facing altitudinal gradient in the canton of Valais, Switzerland, from March 2004 to February 2005. Tick density and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato were monitored. Ticks were collected by flagging vegetation at three different altitudes (750 m, 880 m, and 1020 m above sea level). Ticks were examined for *Borrelia* by polymerase chain reaction (PCR) followed by reverse line blot. At the three altitudes, questing tick activity was not observed under 10°C and was reduced when saturation deficit was higher than 5 mm Hg, most questing tick activity was occurred between 2 mm Hg and 7 mm Hg. Tick density and peak tick density were highest at 1020 m. High saturation deficits at the lowest altitudes appear to impair the tick population. The prevalence of *B. burgdorferi* infection in nymphs and adults decreased with altitude. The prevalence of infection was higher in adult ticks (47%) than in nymphs (29%). Four *B. burgdorferi* sensu lato genospecies were detected: *B. afzelii* (40%), *B. garinii* (22%), *B. valaisiana* (12%) and *B. burgdorferi* sensu stricto (6%). Mixed infections were detected in 13% of infected ticks. Key Words: *Borrelia*—Population—*Ixodes*—Climate. Vector-Borne Zoonotic Dis. 7, 50–58.

INTRODUCTION

THE TICK *Ixodes ricinus*, the main vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), the causative agent of Lyme borreliosis, is widespread in Europe and also present in North Africa (Dsouli et al. 2006, Gern and Humair 2002). This tick feeds on a large variety of hosts, including mammals, birds and reptiles (Gern and Humair 2002).

I. ricinus distribution and seasonal abundance are influenced by biotic (host species, host density and behavior, and vegetation structure) and abiotic factors (climate) (Gigon 1985, Perret et al. 2004, Randolph 2004). *I. ricinus* phenology varies according to its geo-

graphic distribution and to the year (Gray 1984, Jouda et al. 2004a, Korenberg 2000, Perret et al. 2000, Randolph et al. 2002, Tälleklint and Jaenson 1996). Studies have shown that the beginning of tick activity in spring is linked to temperature (Jouda et al. 2004a, Perret et al. 2000, Randolph 2004). Relative humidity as well as saturation deficit (a measure of the drying power of the atmosphere) are important factors influencing tick behavior and mortality rates (Perret et al. 2003, 2004, Randolph and Storey 1999, Steele and Randolph 1985).

The impact of climate, particularly climate warming, was shown to influence *I. ricinus* distribution. A northwards and westwards extension of *I. ricinus* distribution has been described

¹Institut de Biologie, University of Neuchâtel, Switzerland.

²Institut de Mathématiques, University of Neuchâtel, Switzerland.

within Sweden (Tälleklint and Jaenson 1998) and an extension of its distribution towards higher altitudes has been reported in the Czech Republic (Daniel et al. 1993, 2003). Jouda et al. (2004a) studied *I. ricinus* phenology on the slope of a mountain at various altitudes and demonstrated the influence of climatic conditions on the population of this tick species. These authors observed that tick density, tick phenology, and *B. burgdorferi* sl infection rate varied with altitude.

In the present study, we assessed the phenology of *I. ricinus* along an altitudinal gradient in an area presenting warm and dry climatic conditions in canton of Valais, Switzerland. We also estimated the infection prevalence of *B. burgdorferi* sl in the collected ticks.

MATERIALS AND METHODS

Study areas and tick collection

The study was carried out in the region of Salins in the canton of Valais, Switzerland, on the north-facing slope of the Rhône Valley known for its warm and dry climate (Werner 1994). To study the influence of altitude on tick population and on their infection rate with *Borrelia*, ticks were collected at three different altitudes: 750 m (592.750/117.600), 880 m (593.250/117.400), and 1020 m (593.550/117.200).

Host-seeking adult, nymphal, and larval ticks were collected monthly from March 2004 to February 2005 by flagging the low vegetation with a 1 m² white flag over a distance of 150 m. Collected ticks were kept in plastic tubes containing grass until examination for *Borrelia* infection.

Questing tick density was expressed as the number of ticks collected per 100 m². An annual value for tick density called cumulative tick density (CTD) was obtained by integrating the linearly interpolated curve of questing tick density over 1 year from March 2004 to February 2005 (Eisen et al. 2003, Jouda et al. 2004a,b). Peak tick density (PTD) was defined as the maximal tick density over one year (Jouda et al. 2004a,b). The date of onset of significant questing tick activity in spring was calculated from the questing tick density curve as the date

when tick density exceeded 10% of the peak tick density (O10) (Eisen et al. 2003). Similarly, the end of tick activity was calculated as the last date when tick density decreased below 10% of the peak tick density (F10). To evaluate the spatial variation in density of *I. ricinus* ticks infected with *B. burgdorferi* sl, the peak tick density of infected nymphs (PTDi nymphs) and adults (PTDi adults) was calculated (Jouda et al. 2004a,b).

Air temperature at 60 cm as well as relative humidity were recorded at each sampling session in each area using a thermo-hygrometer (Testo 615 S.A Lonay, Switzerland). Saturation deficit was calculated with temperature and relative humidity as described by Randolph and Storey (1999) and Perret et al. (2000).

Detection of B. burgdorferi sl in ticks

Ixodes ricinus ticks were examined for *B. burgdorferi* sl genospecies by polymerase chain reaction (PCR), followed by the reverse line blot (RLB) assay. Prior to PCR, ticks were washed in ethanol 70% and cut into two halves. To extract DNA directly from the tick, one half was placed in 100 μ L 0.7 M ammonium hydroxide using a sterile tip and boiled for 15 minutes at 100°C (20 μ L was used for PCR) (Poupon et al. 2006). The other half of the tick was placed in 1.2 mL of BSK-H culture medium (Sinsky and Piesman 1989) and incubated for two weeks at 34°C. All culture media were then washed and thermolysates were prepared according to Jouda et al. (2004b) with a final volume of 30 μ L (10 μ L was used for PCR). Primers used to amplify the variable spacer region between two repeated genes encoding for ribosomal 23S and 5S were B5S-Bor and 23S-Bor primers (Alekseev et al. 2001) (0.20 μ M each). Taq DNA polymerase from Qiagen (1.25 U per test), dNTPs (200 μ M each) and 10 μ L or 20 μ L (see above) of DNA samples were used for PCR. DNA amplification was performed in a reaction volume of 50 μ L using a Whatman Biometra Tgradient Thermocycler 96 (Göttingen, Deutschland).

A touchdown PCR program was used: amplification started by an initial denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by denaturation at 94°C for 20 seconds, annealing at 60°C for 30

seconds, extension at 72°C for 30 seconds. Then during the subsequent cycles set, the annealing temperature was lowered by 1°C until it reached 52°C. An additional 40 cycles set each consisting of 20 seconds at 94°C, 30 seconds at 52°C, and 30 seconds at 72°C, followed the touchdown program. The PCR ended by a final extension for 7 minutes at 72°C. PCR products were stored at 4°C until RLB analysis.

Isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto (B31), *B. garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632), *B. lusitaniae* (PotiB3), and *B. valaisiana* (VS116) were used as positive controls. Negative controls for culture were culture medium without ticks and negative controls for extraction were 0.7 M ammonium hydroxide without ticks.

The RLB technique was performed as described by Schouls et al. (1999). The PCR products were hybridized to 7 different oligonucleotide probes (75 pmol): *B. burgdorferi* sl (SL), *B. burgdorferi* sensu stricto (SS), *B. afzelii* (AF), *B. garinii* (GA) (Rijpkema et al. 1995, Schouls et al. 1999), *B. garinii* (GANE), *B. valaisiana* (VSNE), *B. lusitaniae* (LusiNE) (Poupon et al. 2006). All probes were blotted in lines on an activated Biodyne C membrane (Pall Europe Ltd., Portsmouth, UK) using a Miniblotter 45 (Immunetic, Cambridge, MA). Hybridization was visualized by incubating the membrane with enhanced chemiluminescence detection liquid (Amersham Biosciences Europe, Otelfingen, Switzerland) and by exposing the membrane to x-ray film (Hyperfilm; Amersham Europe).

Statistical analysis

All statistics were calculated with S-Plus[®] 7.0 for Windows (Insightful, Seattle, WA). Annual evolution of climatic data and relationship between altitude and CTD were evaluated with the Wilcoxon test. Infection rates between nymphs and adults and the relationship between *Borrelia* in ticks and altitude were evaluated with a Fisher's exact test.

RESULTS

Climate and tick phenology

Analysis of climatic data recorded along the altitudinal gradient in Salins (Valais) showed

that annual evolutions of temperature (Wilcoxon test, *p* value: 0.003 between 750 m and 1020 m; *p* value: 0.006 between 880 m and 1020 m), relative humidity (Wilcoxon test, *p* value: 0.003 between 750 m and 1020 m; *p* value: 0.012 between 880 m and 1020 m) and saturation deficit (Wilcoxon test, *p* value: 0.002 between 750 m and 1020 m; *p* value: 0.005 between 880 m and 1020 m) were significantly different between 1020 m and the two other altitudes but not between 750 m and 880 m (Fig. 1). At 1020 m saturation deficit was low and stable in comparison with the other altitudes (Fig. 1): the mean annual saturation deficit was 2.8 mm Hg whereas it reached 7.4 mm Hg and 7.3 mm Hg at 750 m and 880 m (Table 1). Relative humidity was also much higher at 1020 m than at the 2 lower sites where relative humidity was below 60% during most of the tick activity period (Fig. 1).

All collected ticks belonged to *I. ricinus*. Because only two larvae were collected larvae were not considered in this study. Questing tick density varied considerably among the three altitudes: annual questing tick density expressed as the CTD for nymphs was significantly higher at 1020 m (Wilcoxon test, *p* value: 0.007) than at 750 m and 880 m and CTD for adults was higher at 1020 m than at 880 m (Wilcoxon test, *p* value: 0.007) (Table 2). PTD was the highest at the highest altitude for both nymphs and adults (Table 2).

The phenology of nymphs and adults also varied with altitude (Fig. 1). At the two lowest altitudes the questing activity of nymphs decreased when saturation deficit reached values above 5 mm Hg and saturation deficit remained higher than 10 mm Hg from April–May until October. Duration of nymph and adult questing activity lasted only 4 months at 750 m (Fig. 1). At 1020 m tick activity lasted 6 to 7 months corresponding to the period when temperature was higher than 10°C (Fig. 1). It is noteworthy that at this altitude saturation deficit always remained under 5 mm Hg and temperature never reached 20°C. At the three altitudes, questing tick activity was not observed under 10°C and was reduced when saturation deficit was higher than 5 mm Hg, most questing tick activity was comprised between 2 mm Hg and 7 mm Hg (Fig. 2).

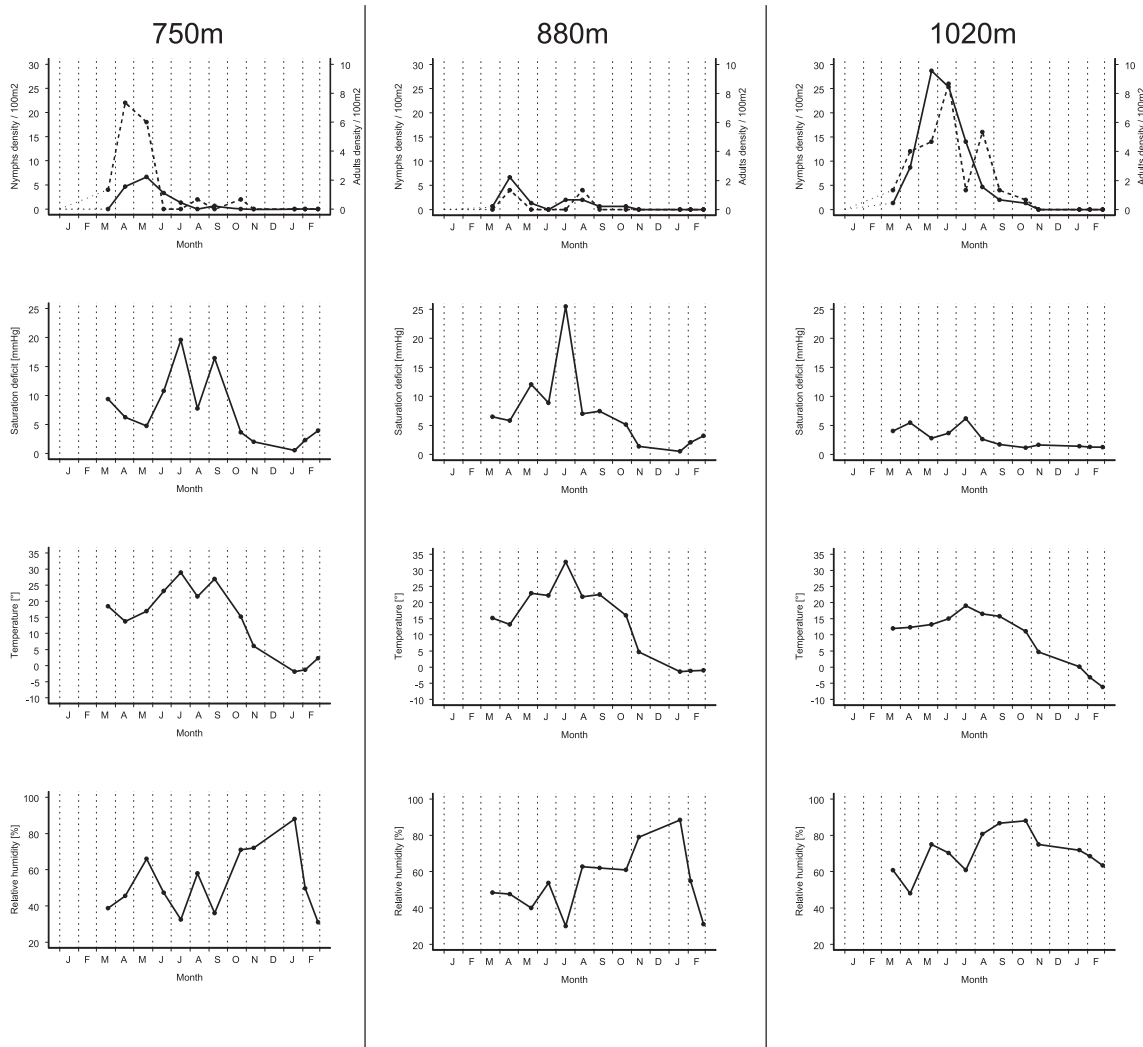


FIG. 1. Seasonal evolution (from March 2004 to February 2005) of *I. ricinus* density (— for nymphs and - - for adults) in relation with climatic conditions (Temperature [°], Relative humidity [%], Saturation deficit [mm Hg]) along an altitudinal gradient at 750 m, 880 m, 1020 m in the region of Salins (Valais).

B. burgdorferi sl in ticks

A total of 195 ticks (129 nymphs and 66 adults) were analyzed for *B. burgdorferi* infec-

tion, 35% (68/195) were found infected by *B. burgdorferi* sl using one or both extraction methods. Adults were more infected (31/66, 47%) than nymphs (37/129, 29%) (Fisher's exact test,

TABLE 1. MEAN ANNUAL VALUE FOR TEMPERATURE (MEAN T°) WITH EXTREME TEMPERATURE (T°MAX AND T°MIN), RELATIVE HUMIDITY (MEAN HR%) WITH EXTREME RELATIVE HUMIDITY (HR%MAX AND HR%MIN) AND SATURATION DEFICIT (MEAN SD) WITH EXTREME SATURATION DEFICIT (SDMAX AND SDMIN) AT THREE DIFFERENT ALTITUDES IN REGION OF SALINS (VALAIS) IN 2004

Altitude	Mean T°	T°max	T°min	Mean Hr%	Hr%max	Hr%min	Mean SD	SDmax	SDmin
2004									
750 m	14.16	28.9	-1.9	52.98	88	31	7.4	19.58	0.53
880 m	13.96	32.6	-1.4	54.91	88.4	30	7.3	25.46	0.53
1020 m	9.18	19	-6.2	70.76	88	48	2.8	6.19	1.24

TABLE 2. ANNUAL VALUE FOR TICK DENSITY (CTDA FOR ADULTS AND CTDN FOR NYMPHS), PEAK TICK DENSITY (PTDA FOR ADULT AND PTND FOR NYMPH), DATE OF ONSET OF QUESTING TICK ACTIVITY IN SPRING (O10A FOR ADULTS, O10N FOR NYMPHS) AND DATE OF END OF TICK ACTIVITY (F10A FOR ADULTS, F10N FOR NYMPHS) AT THREE DIFFERENT ALTITUDES IN REGION OF SALINS (VALAIS) IN 2004

Altitude	CTDA	PTDA	O10A	F10A	CTDN	PTDN	O10N	F10N
2004								
750 m	487	7	12.02.	16.06.	517	7	24.03.	30.07.
880 m	91	1	22.03.	08.09.	456	7	20.03.	10.09.
1020 m	821	8	24.02.	08.10.	2616	29	26.03.	01.09.

$p = 0.0168$) (Table 3). *Borrelia* infection prevalence decreased with increasing altitude (Fisher's exact test, $p = 0.0153$). At 1020 m the infection rate was 27.4% (34/124) whereas at

the other altitudes the infection prevalence was 48% (23/48 at 750 m and 11/23 at 880 m). The peak tick density of infected ticks (PTDi) was 3.2, 3.3, and 5.8 infected nymphs per 100 m²

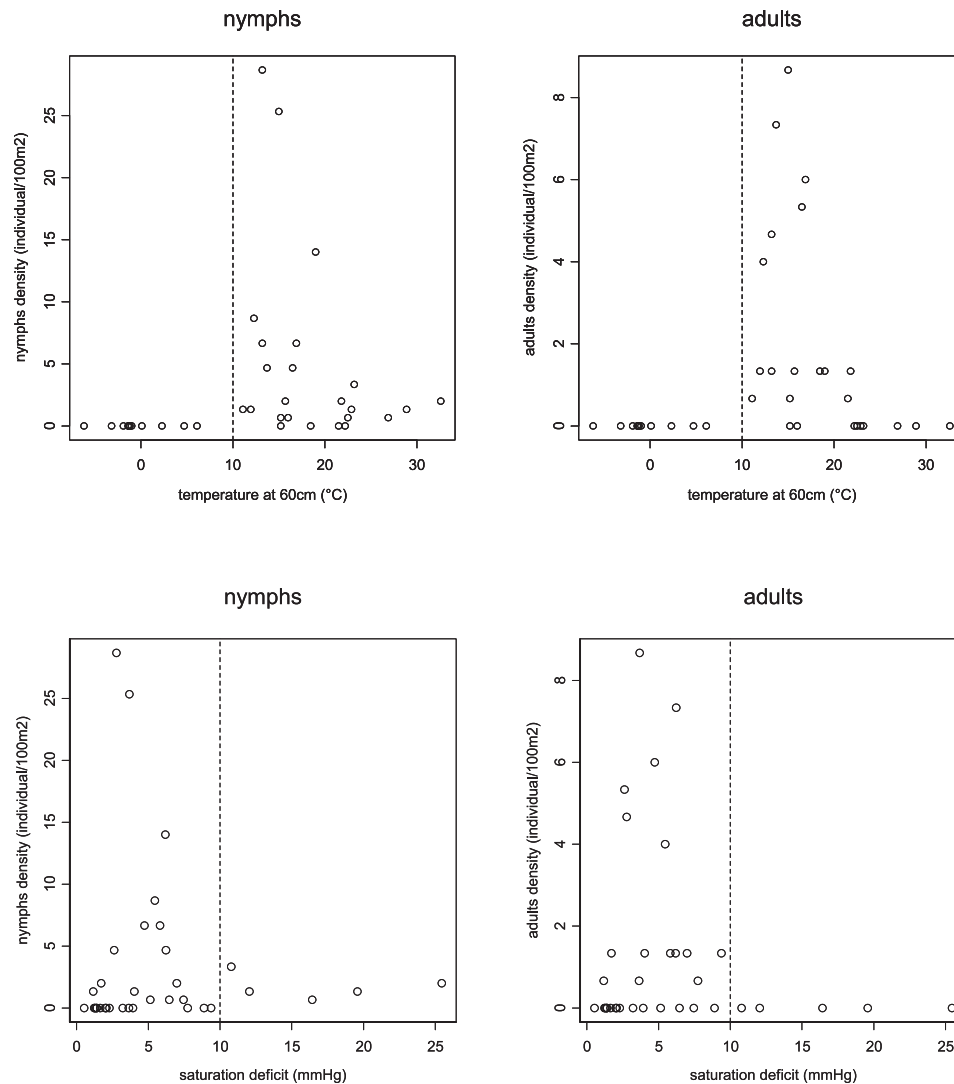


FIG. 2. Density of nymphs and adults from all sites (750 m, 880 m, 1020 m) in 2004 in relation with temperature at 60 cm and saturation deficit.

TABLE 3. PROPORTION OF *BORRELIA BURGENDORFERI* INFECTED *I. RICINUS* TICKS (NYMPHS AND ADULTS) AT THREE DIFFERENT ALTITUDES IN REGION OF SALINS (VALAIS) IN 2004

Altitude	Proportion of infected nymphs (%)	Proportion of infected adults (%)	Total
2004			
750 m	11/24 (46)	12/24 (50)	23/48 (48)
880 m	9/19 (47)	2/4 (50)	11/23 (48)
1020 m	17/86 (20)	17/38 (45)	34/124 (27)
Total	37/129 (29)	31/66 (47)	68/195 (35)

and 3.5, 0.5, and 4 infected adults per 100 m² at 750 m, 880 m, and 1020 m, respectively. PTDi for nymphs increased with increasing altitude.

Four *Borrelia* species were identified by PCR/RLB: *B. afzelii* was the most frequently detected species (27/68, 40%), followed by *B. garinii* (15/68, 22%), *B. valaisiana* (8/68, 12%), and *B. burgdorferi* ss (4/68, 6%). *Borrelia* genospecies could not be identified in five infected ticks (5/68, 7.4%). *B. afzelii* was the most frequent genospecies at 750 m (9/23) and at 1020 m (17/34) while at 880 m *B. garinii* was dominant (5/11) but this was not significantly different (Fisher's exact test, $p = 0.60$). Mixed infections with two *Borrelia* species were detected more often in adults (6/31, 19.4%) than in nymphs (3/37, 8.1%) but it was not significantly different (Fisher exact test, $p = 0.28$). Three combinations of mixed infections were identified: *B. garinii* with *B. valaisiana* ($n = 5$), *B. garinii* with *B. afzelli* ($n = 2$) and *B. burgdorferi* ss with *B. afzelii* ($n = 2$).

DISCUSSION

In a previous study, we assessed the influence of climate on the population of *I. ricinus* ticks and their infection with *B. burgdorferi* along a south-facing altitudinal gradient on the slope of a mountain in Neuchâtel (Chaumont, Switzerland) (Jouda et al. 2004a). The purpose of the present study was to examine the density and the phenology of *I. ricinus* and its infection with *B. burgdorferi* sl along a north-facing altitudinal gradient in an area in Switzerland with a dryer and warmer climate (Rhône Valley, canton of Valais), in the Alps. The Rhône Valley is one of the driest areas of

this country. Relief of the Valais also makes that winter temperatures are very cold and that summers are dry and hot at low altitudes (Werner 1994).

It has previously been described that tick densities are higher at low than at high altitudes in Switzerland (Jouda et al. 2004a, Kaltenrieder et al. 1985). However, in Valais, tick density over 1 year and peak tick density were higher at the highest altitude (1020 m). Most certainly climatic conditions are particular in Valais where annual mean rainfall reached 409 mm in 2004, in comparison it reached 949 mm in Neuchâtel, the same year (unpublished data from MétéoSuisse). A closer look at annual evolutions of climatic conditions at the three altitudes shows that they were different at 1020 m compared to those observed at 750 m and 880 m. Study sites located at the two lowest altitudes were clearly warmer and dryer than at 1020 m. *I. ricinus* ticks do not have a high tolerance to water stress. They have to interrupt questing when they have lost too much water (Lees and Milne 1951) and they move to the litter zone where they rehydrate by active water sorption (Gaede and Knülle 1997).

Reductions in the questing activity of *I. ricinus* in relation with high saturation deficit have been documented (Perret et al. 2000, 2003, Randolph and Storey 1999). In a computer-assisted video tracking study, it was reported that questing duration is inversely related to saturation deficit (Perret et al. 2003). In addition to behavior change induced by water stress, high saturation deficit may also induce mortality of ticks due to increase of tick movements (Perret et al. 2003) and active water sorption (Gaede and Knülle 1997) leading to exhaustion of their

energy reserves (Randolph and Storey 1999, Steele and Randolph 1985). Apparently, nymphal ticks show a lower resistance to water stress leading to the death of this tick stage (Perret et al. 2004). Consequently periods of questing activity of ticks are reduced when saturation deficit is too high (Randolph and Storey 1999, Steele and Randolph 1985). This phenomenon was observed here for nymphs at the two lowest altitudes. Most probably, questing tick populations at 750 m and 880 m suffered from high saturation deficit and low relative humidity during questing tick activity period forcing ticks to walk more (Perret et al. 2003) and to rehydrate more often, leading to a reduction of their fat content, the source of energy (Randolph and Storey 1999). Deprived of energy sources ticks will no more be able to find a host and will die. Tick populations at these low altitudes are probably at the limit of their maintenance because of moisture stress whereas at 1020 m climatic conditions are adequate for a stable tick population. In fact, tick collection in another site in the same area in Valais (643 m) with a very high saturation deficit (annual mean: 11.4 mm Hg, and values > 10 mm Hg from March to October) showed that establishment of ticks in this site was not possible (unpublished data). Possibly, the particular behavior of cervids, like red deer, who used to move up to higher altitudes in spring and remain there until fall, may also account for the higher tick density observed at 1020 m (Hausser 1995).

In Switzerland, the infection prevalence by *B. burgdorferi* s.l. varies from 5% to 47.5% (Aeschlimann et al. 1986, Jouda et al. 2004a,b, Péter et al. 1995). In this study the overall prevalence in *B. burgdorferi* s.l. in *I. ricinus* ticks was 35%. As previously reported by others, the infection prevalence was higher in adults (47%) than in nymphs (29%) (Jouda et al. 2004a,b, Rauter and Hartung 2005).

Our results confirm previous observations showing that ticks were less infected with increasing altitude (Aeschlimann et al. 1986, Jouda et al. 2004a, Rizzoli et al. 2002). The infection rate with *B. burgdorferi* s.l. could be influenced by the distribution of hosts. Indeed large mammals such as red deer are not reservoir hosts for *Borrelia* and they contribute to the

dilution of the infection of *B. burgdorferi* s.l. in tick population (Kurtenbach et al. 1998). Being hosts for adult ticks they are also very important for the maintenance and the development of tick populations. Since these mammals use to move up to higher altitudes during spring-summer they may have contributed to the lower infection rate detected in ticks collected at 1020 m.

In Switzerland, five *Borrelia* species have been isolated from *I. ricinus* ticks: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* (Jouda et al. 2003, 2004a,b, Casati et al. 2004). All *Borrelia* species except *B. lusitaniae* were detected in ticks collected at the three altitudes. *B. afzelii* was the most frequently detected species followed by *B. garinii*. These two species have been reported to be associated with rodents and birds, respectively which suggest that these hosts are the main reservoirs at all three altitudes (Gern and Humair 2002). The distribution of the *Borrelia* species and the frequency of mixed infections observed here are similar to those reported for Europe (Rauter and Hartung 2005).

Studies on spatial variation in density of *I. ricinus* ticks infected with *B. burgdorferi* s.l. reported densities of 0.2 to 114 infected ticks per 100 m² (Mejlon and Jaenson 1993, Tälleklint and Jaenson 1996, Rizzoli et al. 2002, Jouda et al. 2004b, Ferquel et al. 2006). In this study, we observed a low density of infected ticks ranging from 3.2 to 5.8 infected ticks per 100 m².

The most interesting result in this study is the higher tick density observed at the highest altitude (> 1000 m). We explained this by very dry and warm conditions at the low altitudes (750 m and 880 m) that impaired the favorable development of the tick population.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by the Swiss National Science Foundation (no. 3200B0-1000657) and is part of the PhD thesis of one of the author (F.M.C.). We would like to thank Olivier Rais for his technical assistance and the two reviewers for their useful comments.

REFERENCES

- Aeschlimann, A, Chamot, E, Gigon, F, Jeanneret, JP, et al. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zentbl Bakt Hyg A 1986; 263:450–458.
- Alekseev, AN, Dubinina, HV, van de Pol, I, Schouls, LM. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. J Clin Microbiol 2001; 39:2237–2242.
- Casati, S, Bernasconi, MV, Gern, L, Piffaretti, JC. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. FEMS Microbiol Lett 2004; 238:115–123.
- Daniel, M. Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* (L.) in central Europe. Acarologia 1993; XXXIV:105–113.
- Daniel, M, Danielova, V, Kriz, B, Jirsa, A, et al. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:327–328.
- Dsouli, N, Younsi-Kabachii, H, Postic, D, Nouira, S, et al. Reservoir role of lizard, *Psammmodromus algirus*, in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Spirochaetacea*) in Tunisia. J Med Entomol 2006; 43: 737–742.
- Eisen, RJ, Eisen, L, Castro, MB, Lane, RS. Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in Northern California: Effect of climatic conditions and habitat type. Environ Entomol 2003; 32:1010–1018.
- Ferquel, E, Garnier, M, Marie, J, Bernède-Bauduin, C, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. Appl Environ Microbiol 2006; 72:3074–3078.
- Gaede, K, Knülle, W. On the mechanism of water vapour sorption from unsaturated atmospheres by ticks. J Exp Biol 1997; 200:1491–1498.
- Gern, L, Humair, PF. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G, eds. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* Wallingford. Oxon, UK: CABI International, 2002: 149–174.
- Gigon, F. Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le Plateau Suisse—une contribution à l'écologie de ce vecteur [dissertation]. University of Neuchâtel, 1985.
- Gray, JS. Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. Acarologia 1984; 25:167–178.
- Hausser, J. *Mammifères de la Suisse*. Basel, Switzerland: Birkhäuser, Verlag, 1995.
- Jouda, F, Perret, JL, Gern, L. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. J Med Entomol 2004a; 41:162–169.
- Jouda, F, Perret, JL, Gern L. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: Spatio-temporal pattern at a regional scale. Vector Borne and Zoonotic Diseases 2004b; 4:23–32.
- Jouda, A, Crippa, M, Perret, JL, Gern, L. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). Eur J Epidemiol 2003;17:907–912.
- Kaltenrieder, M, Hess, E, Aeschlimann, A. Zur Vorkommen der Zecke *Ixodes ricinus* L. (*Ixodoidea*, *Ixodidae*) in der Schweiz. Rev. Suisse Zool 1985; 92:685–692.
- Korenberg, EI. Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. Exp Appl Acarol 2000; 24:665–681.
- Kurtenbach, K, Sewell, HS, Ogden NH, Randolph, SE, et al. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. Infect Immun 1998; 66:1248–1251.
- Lees, AD, Milne, A. The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L.). Parasitology 1951; 41:189–208.
- Mejlon, HA, Jaenson, TGT. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. Scand J Infect Dis 1993; 25:449–456.
- Perret, JL, Guerin, PM, Diehl, PA, Vlimant, M, et al. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. J Exp Biol 2003; 206:1809–1815.
- Perret, JL, Guigoz, E, Rais, O, Gern, L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). Parasitol Res 2000; 86:554–557.
- Perret, JL, Rais, O, Gern, L. Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. J Med Entomol 2004; 41: 361–365.
- Péter, O, Bretz, AG, Bee, D. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodid ticks of Valais, Switzerland. Eur J Epidemiol 1995; 11:463–467.
- Poupon, MA, Lommano, E, Humair, PF, Douet, V, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. Appl Env Microbiol 2006; 72:976–979.
- Randolph, SE. A tick ecology: processes and pattern behind the epidemiological risk posed by Ixodid ticks as vectors. Parasitology 2004; 129:S37–S65.
- Randolph, SE, Green, RM, Hoodless, AN, Peacey, MF. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. Int J Parasitol 2002; 32:979–989.
- Randolph, SE, Storey, K. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: *Ixodidae*): implications for parasite transmission. J Med Entomol 1999; 36:741–748.
- Rauter, C, Hartung, T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. Appl Env Microbiol 2005; 71:7203–7216.
- Rijpkema, SGT, Molkenboer, MJCH, Schouls, LM, Jongejan, F, et al. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the

- amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3091–3095.
- Rizzoli, A, Merler, S, Furlanello, C, Genchi, C. Geographical information systems and bootstrap aggregation (bagging) of tree-based classifiers for Lyme disease risk prediction in Trentino, Italian Alps. *J Med Entomol* 2002; 39:485–492.
- Schouls, LM, Van De Pol, I, Rijpkema, SGT, et al. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2215–2222.
- Sinsky, RJ, Piesman, J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1723–1727.
- Steele, GM, Randolph, SE. An experimental evaluation of conventional control measures against the sheep tick, *Ixodes ricinus* (L.) (Acari: Ixodidae). A unimodal seasonal pattern. *Bull Entomol Res* 1985; 75:489–499.
- Tälleklint, L, Jaenson, TGT. Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in central and northern Sweden. *J Med Entomol* 1998; 35:521–526.
- Tälleklint, L, Jaenson, TGT. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia*-like spirochetes and density of infected ticks. *J Med Entomol* 1996; 33:805–811.
- Werner, P. Connaître la nature en Valais-la flore. Pillet-Martigny, 1994.

Address reprint requests to:

Lise Gern
Institut de Biologie
Laboratoire d'Eco-Epidémiologie des Parasites
Emile Argand 11
Case postale 158
CH-2009 Neuchâtel
Switzerland

E-mail: lise.gern@unine.ch

4.2 PUBLICATION 2

Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland

Francisca Morán Cadenas¹, Olivier Rais¹, Fatima Jouda¹, Véronique Douet¹, Pierre-François Humair¹, Jacqueline Moret² and Lise Gern¹

Journal of Medical Entomology. 2007. 44: 683-693.

¹Institut de Biologie, Laboratoire d'Éco-Épidémiologie des Parasites, Université de Neuchâtel, Suisse.

²Institut de Mathématiques, Université de Neuchâtel, Suisse.

Phenology of *Ixodes ricinus* and Infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato Along a North- and South-Facing Altitudinal Gradient on Chaumont Mountain, Switzerland

FRANCISCA MORÁN CADENAS,¹ OLIVIER RAIS,¹ FATIMA JOUDA,¹ VÉRONIQUE DOUET,¹ PIERRE-FRANÇOIS HUMAIR,¹ JACQUELINE MORET,² AND LISE GERN^{1,3}

J. Med. Entomol. 44(4): 683–693 (2007)

ABSTRACT Questing *Ixodes ricinus* L. ticks were collected monthly from 2003 to 2005 on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain in Neuchâtel, Switzerland, at altitudes varying from 620 to 1,070 m. On the south-facing slope, questing tick density was higher than on the north-facing slope, and it decreased with altitude. Density tended to increase with altitude on the north-facing slope. Saturation deficit values higher than 10 mmHg and lasting for >2 mo were often recorded on the south-facing slope, explaining seasonal patterns of questing tick activity. The overall prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato was 22.4%, and prevalence differed according to exposure and among years. No difference was noticed between nymphs and adults. Four *Borrelia* species were identified. Mixed infections were detected in 52 ticks, *B. garinii* and *B. valaisiana* ($n = 21$) and *B. afzelii* and *B. burgdorferi* s.s. ($n = 20$) were the most frequent associations observed. The density of infected ticks varied from 3.6 to 78.7 infected nymphs per 100 m² and from 0.6 to 16.9 infected adults per 100 m², both slopes combined. The study on the south-facing slope was a follow-up of a previous study carried out at the same location during 1999–2001. Comparison of climatic data between the two periods showed a marked increase in saturation deficit. Substantial differences in density and phenology of ticks also were observed. At high elevations, ticks were significantly more abundant during the current study. This can be explained by rising temperatures recorded during summer at altitude, reaching values similar to those registered in the first study beneath. At the lowest altitude, adults were significantly less abundant, probably due to long-lasting high saturation deficits that impaired nymphal survival. The density of *Borrelia*-infected ticks was higher than in the previous study.

KEY WORDS tick density, *Borrelia*-infected ticks, phenology, climate, mixed infection

The tick *Ixodes ricinus* L. is the main vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the etiological agents of Lyme borreliosis, in Europe. Seven *Borrelia* genospecies have been found associated with this tick species: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. bissettii*, and *B. spielmanii* (Rauter and Hartung 2005, Richter et al. 2006).

Throughout the wide distribution of *I. ricinus*, its phenology (the evolution of the questing tick density over time, Jouda et al. 2004b) varies considerably from a unimodal pattern with maximum nymphal density in winter (Algeria) or in summer (Tunisia) (Yousfi-Monod and Aeschlimann 1986, Dsouli et al. 2006) to a bimodal pattern reaching its maximum density in spring (Ireland) or in autumn (Crimea) (Gray 1984, Korenberg 2000). In England (Randolph et al. 2002) and in Switzerland (Mermod et al. 1973; Perret et al. 2000; Jouda et al. 2004a, 2004b; Burri et al. 2007), both

bimodal and unimodal patterns with a maximum nymphal density in spring were shown to occur. The phenology of *I. ricinus* also was reported to be variable between years (Tälleklint and Jaenson 1996, Perret et al. 2000, Randolph et al. 2002, Randolph 2004, Jouda et al. 2004b). Variations in the seasonal activity of questing ticks may be associated with variations in biotic (host species, density and behavior, and vegetation structure) as well as abiotic factors (climate). For example, the duration of development of *I. ricinus* is inversely proportional to temperature (MacLeod 1934, Campbell 1948 cited in Randolph et al. 2002); therefore, temperature may allow fast development of spring-fed ticks and the emergence of the next stage in the same year in autumn (Chmela 1969, Randolph et al. 2002). Hence, we would expect an autumnal peak when temperatures are high in summer and no autumn peak otherwise.

In a previous study on the phenology of *I. ricinus* ticks along an altitudinal gradient on the south-facing slope of a mountain (Chaumont), the seasonal activity of questing ticks was related to altitude, and tick density and prevalence of *B. burgdorferi* infection de-

¹ Institut de Biologie, Laboratoire d'Éco-Épidémiologie des Parasites, University of Neuchâtel, CH-2009-Neuchâtel, Switzerland.

² Institut de Mathématiques, University of Neuchâtel, CH-2009-Neuchâtel, Switzerland.

³ Corresponding author, e-mail: lise.gern@unine.ch.

creased with altitude (Jouda et al. 2004b). In this study, variable phenologies and variable *Borrelia* infection rates of ticks were reported by Jouda et al. (2004b) at different altitudes, under different temperature conditions, within the same forest at a short distance, suggesting that such an area is suitable to follow the impact of different climatic scenarios on the seasonal activity of questing tick populations. Therefore, in the context of climate change, we followed up the seasonal activity of questing *I. ricinus* ticks as well as their infection rate with *B. burgdorferi* s.l. along this altitudinal gradient over three more years in relation with climatic data, and we investigated the situation on the north-facing slope of the same mountain.

Materials and Methods

Collection of Ticks. This study was carried out in a mixed forest dominated by deciduous trees (*Quercus* spp., *Fagus* spp., *Fraxinus* spp., and *Prunus* spp.) along two altitudinal gradients on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain in Neuchâtel, Switzerland, within a 3-km radius of 47° 01' N, 06° 56' E. Questing ticks were collected monthly from February 2003 to November 2005 on the south-facing slope of Chaumont and from March 2004 to November 2005 on the north-facing slope. Sampling sites on the south-facing slope were located at 620, 740, and 900 m as described in Jouda et al. (2004b), and one sampling site was added at 1,070 m. Sites on the north-facing slope were chosen at similar altitudes: 780, 910, and 1,010 m. A 1-m² cotton flag was dragged across low vegetation over a distance of 150 m except at 620 m on the south-facing slope where flagging distance was 100 m. The flag was inspected every 25 m, and nymphs and adults were placed separately in vials containing fresh grass and kept alive (at room temperature and relative humidity close to 95%) until detection of *Borrelia* sp. infection.

Climatic Data. Environmental data such as air temperature at 60 cm and relative humidity were recorded monthly at each sampling site using a thermohygrometer (model 615, Testo SA, Lonay, Switzerland), and saturation deficit (SD), which integrates temperature and relative humidity to derive a measure of the drying power of the atmosphere, was calculated according to Randolph and Storey (1999). SD values for 1999–2001 were calculated from unpublished data recorded monthly at each sampling site during the first study. In addition, air temperature for the south-facing slope was recorded by two automatic meteorological stations (MétéoSuisse) located at 485 and 1,073 m above sea level, close to our study sites. Monthly average temperatures were considered to calculate mean values by seasons: winter (December of previous year, January and February), spring (March, April, and May), summer (June, July, and August) and autumn (September, October, and November).

Tick Phenology. Host-seeking tick density was expressed as the number of ticks collected per 100 m². Same variables used in the previous study at the same location (Jouda et al. 2004b) were applied to charac-

terize tick phenology (Eisen et al. 2003, Jouda et al. 2004a). The cumulative density of ticks (CTD), expressed as the number of ticks per 100 m² and per year, was estimated by integrating the linearly extrapolated curve of questing tick density over 1 yr for nymphs (CTDN) and adults (CTDA). The peak tick density (PTD) is the maximal tick density over 1 yr, calculated for nymphs (PTDN) and adults (PTDA).

The onset of significant questing tick activity in spring (O10) was calculated from the questing tick density curve as the date when tick density was higher than 10% of PTD (Jouda et al. 2004b). Likewise, the end of questing tick activity (F10) was considered as the date when tick density remains constantly below 10% of PTD. To estimate maximal density of *Borrelia*-infected ticks, the peak tick density of infected nymphs (PTDNI) and adults (PTDAI) were calculated by multiplying PTD by the infection rate (Jouda et al. 2004a, 2004b).

***Borrelia* DNA Extraction from Ticks.** Every month, a maximum of 20 nymphs and 20 adults (10 males and 10 females) collected in each site were examined for *Borrelia* infection. Before DNA isolation, ticks were soaked in ethanol 70% and air-dried. Isolation of DNA from ticks collected in 2005 was achieved using ammonium hydroxide (NH₄OH) as described previously (Guy and Stanek 1991, Rijpkema et al. 1996). Briefly, ticks were boiled for 15 min at 100°C in 100 µl of 0.7 M NH₄OH, cooled quickly, and boiled again for 15 min in open vials to evaporate the ammonia (10-µl samples were retained for polymerase chain reaction [PCR] analysis). Ticks collected in 2004 were halved lengthwise: one half was processed by using ammonium hydroxide as described above (20 µl used for PCR), and the other half of the tick was incubated for 2 wk at 34°C in 1.2 ml of BSK-H culture medium (Sinsky and Piesman 1989). These cultures were washed twice with phosphate-buffered saline/MgCl₂, and the pellet was resuspended in 30 µl of water and heated for 15 min at 100°C according to Postic et al. (1994) (10 µl used for PCR). To check for cross-contamination, negative controls were included during DNA extraction, which consisted of reagents without ticks.

Identification of *Borrelia* Species by PCR and Reverse Line Blotting (RLB). *I. ricinus* ticks were analyzed for detection of *B. burgdorferi* s.l. genospecies by PCR and RLB. Primers B5S-Bor and 23S-Bor were used to amplify the variable spacer region between two repeated copies of the 23S and 5S ribosomal genes (Alekseev et al. 2001). PCR amplifications were run in a Tgradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Göttingen, Germany) by using a touchdown PCR program (Burri et al. 2007). Negative and positive controls were included in each PCR. In negative controls, water replaced DNA samples. Isolates of *B. burgdorferi* ss (B31), *B. garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632), *B. lusitaniae* (PotiB1, PotiB2, and PotiB3), and *B. valaisiana* (VS116) were used as positive controls.

For *Borrelia* identification by RLB, PCR products were hybridized to seven oligonucleotide probes (75 pmol) (Poupon et al. 2006, Burri et al. 2007) blotted in lines on an activated Biodyne C membrane (Pall

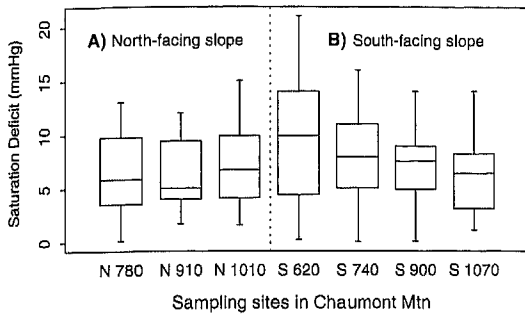


Fig. 1. Boxplot of saturation deficit values at different altitudes on both slopes of Chaumont Mountain. (A) North-facing slope (altitudes ranging from 780 to 1,010 m). Data from 2004 and 2005. (B) South-facing slope (altitudes ranging from 620 to 1,070 m). Data from 2003 to 2005.

(temperature, relative humidity, and SD) and altitude were evaluated with the Spearman's rank correlation. The relationship between tick density and exposure was evaluated with the unpaired Wilcoxon test. The Page test was applied to assess the relation between the onset of tick activity in spring and altitude. The chi-square goodness-of-fit test with uniform distribution was used to compare the CTD values between the earlier and the current study on the southern slope of Chaumont Mountain. The chi-square test on contingency table was used for *Borrelia* infection comparisons between stages and altitudes. The influence of exposure, altitude, and year on infection prevalence in nymphal and adult ticks was estimated by logistic regressions (only years 2004 and 2005 were taking into account). These variables were considered as factors. All statistics were calculated with S-Plus 7.0 for Windows (Insightful, Reinach, Switzerland).

Europe Ltd., Portsmouth, United Kingdom) by using a Miniblotter 45 (Immunic, Cambridge, MA). Hybridization was visualized by incubating the membrane with enhanced chemiluminescence detection liquid (GE Healthcare Europe, Otelfingen, Switzerland) and by exposing the membrane to X-ray film (Hyperfilm, GE Healthcare Europe).

Statistical Analysis. The relationships between tick density and altitude, and between climatic variables

Results

Climatic Data. Analysis of climatic data recorded at Chaumont Mountain showed a different pattern on both slopes of the mountain. On the south-facing slope, relative humidity increased with altitude, whereas SDs were inversely related to altitude (Spearman's rank correlation, $P = 0.046$ for relative humidity

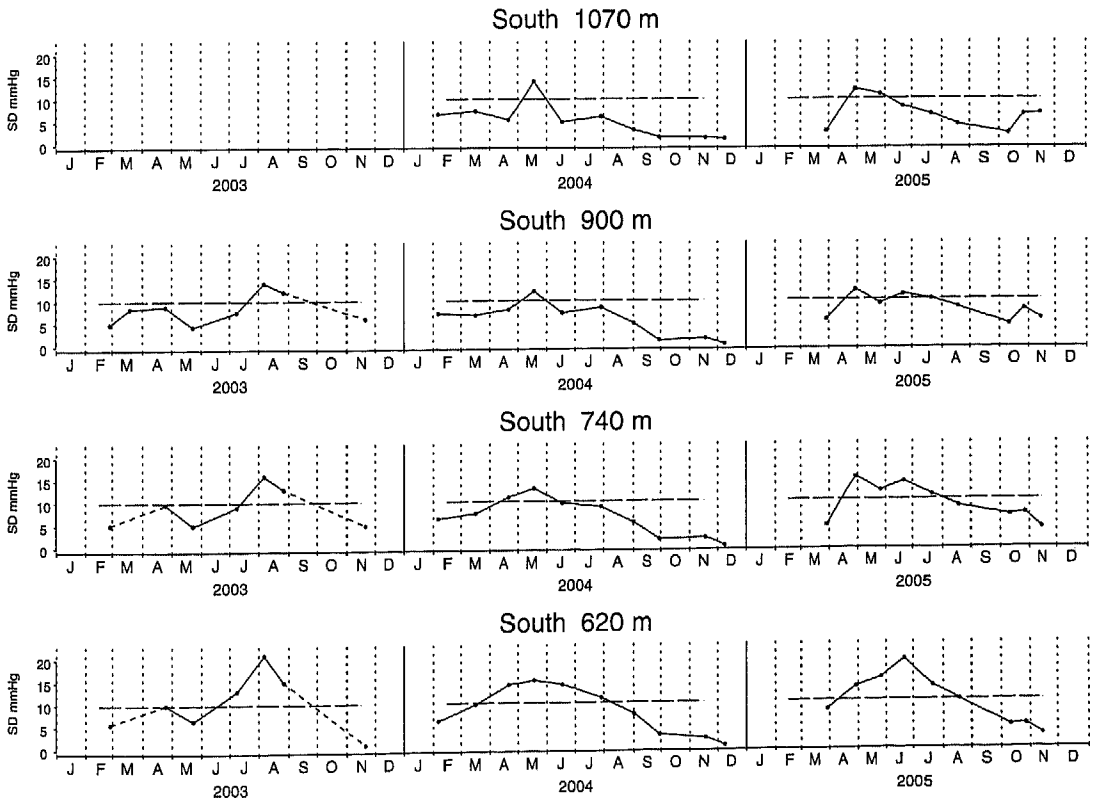


Fig. 2. Seasonal evolution of saturation deficit (SD, in mmHg) along an altitudinal gradient on the south-facing slope of Chaumont Mountain, from 2003 to 2005. The broken lines indicate the threshold of 10 mmHg.

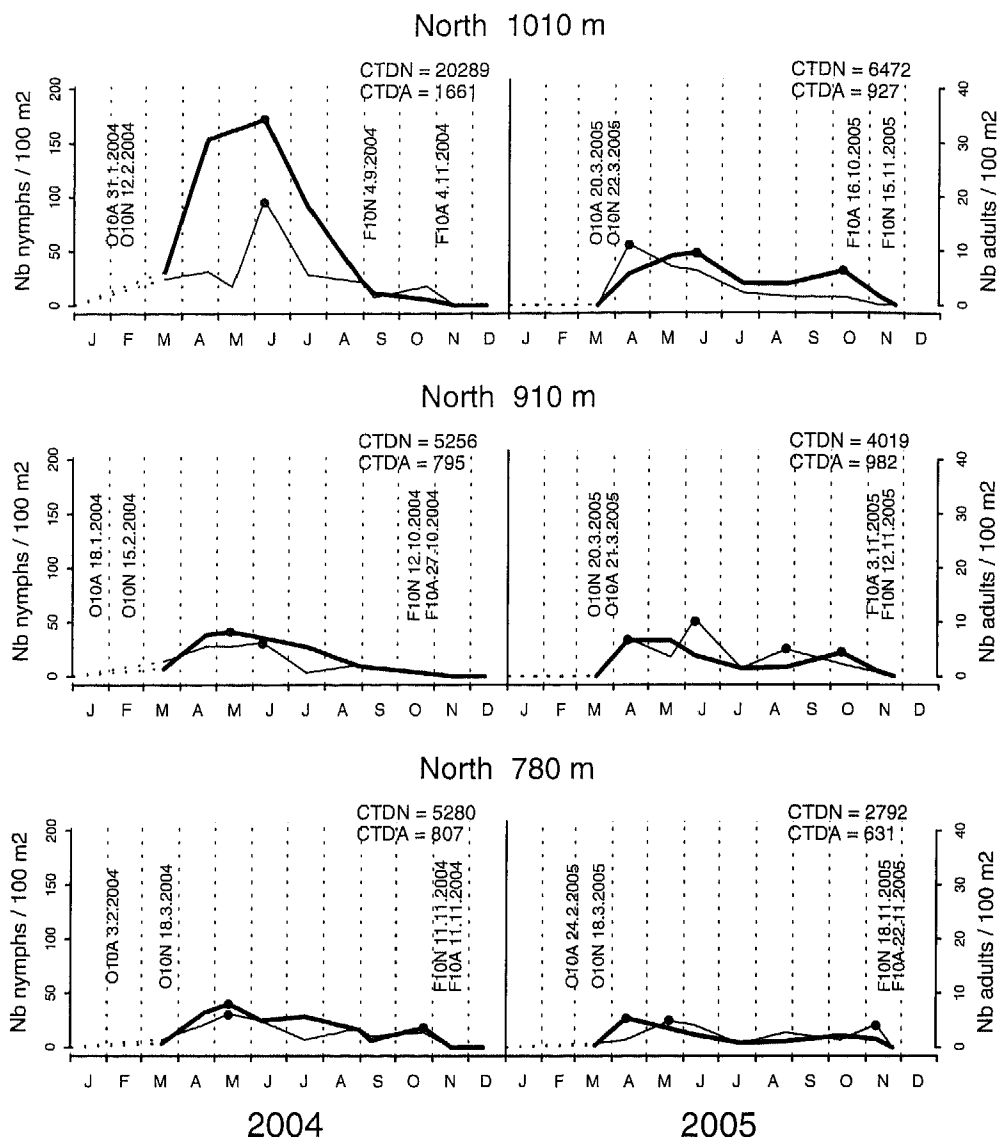


Fig. 3. Questing *I. ricinus* nymphs (bold line) and adults (thin line) at three different altitudes on the north-facing slope of Chaumont Mountain from 2004 to 2005. CTDN, number of nymphs per 100 m² per year. CTDA, number of adults per 100 m² per year. O10N, onset of nymphal activity. O10A, onset of adult activity. F10N, end of nymphal activity. F10A, end of adult activity.

and $P = 0.023$ for SD). Temperature tended to decrease with altitude (Spearman's rank correlation, $P = 0.07$). On the north-facing slope, no correlations were observed between climatic variables and altitude. On the south-facing slope, SD median values were between 6 and 10 mmHg, whereas these values were usually <6 mmHg on the north-facing slope (Fig. 1). Even if we excluded data from the hottest year (2003) on the south-facing slope, SD median values were always higher than 6 mmHg (values varied between 6.14 and 9.8 mmHg).

On the south-facing slope, at 620 and 740 m, SD values >10 mmHg and lasting for 2–4 mo from June to

September were observed in 2003, whereas in 2004 and 2005 these high SD values were already present from March–April and lasted for 4 mo at 620 m (Fig. 2). The maximum SD value was observed at 620 m on the south-facing slope reaching 21.6 mmHg in 2003. At the two highest altitudes, SD values rose above 10 mmHg only for short periods, except at 900 m in 2003 where SD remained higher than 10 mmHg for 2 mo. On the north-facing altitudinal gradient, SD values rarely exceeded 10 mmHg (data not shown).

Phenology, Tick Density, and *Borrelia* Infection on South- and North-Facing Slopes. The majority of questing ticks was collected at temperatures $>8^{\circ}\text{C}$ for

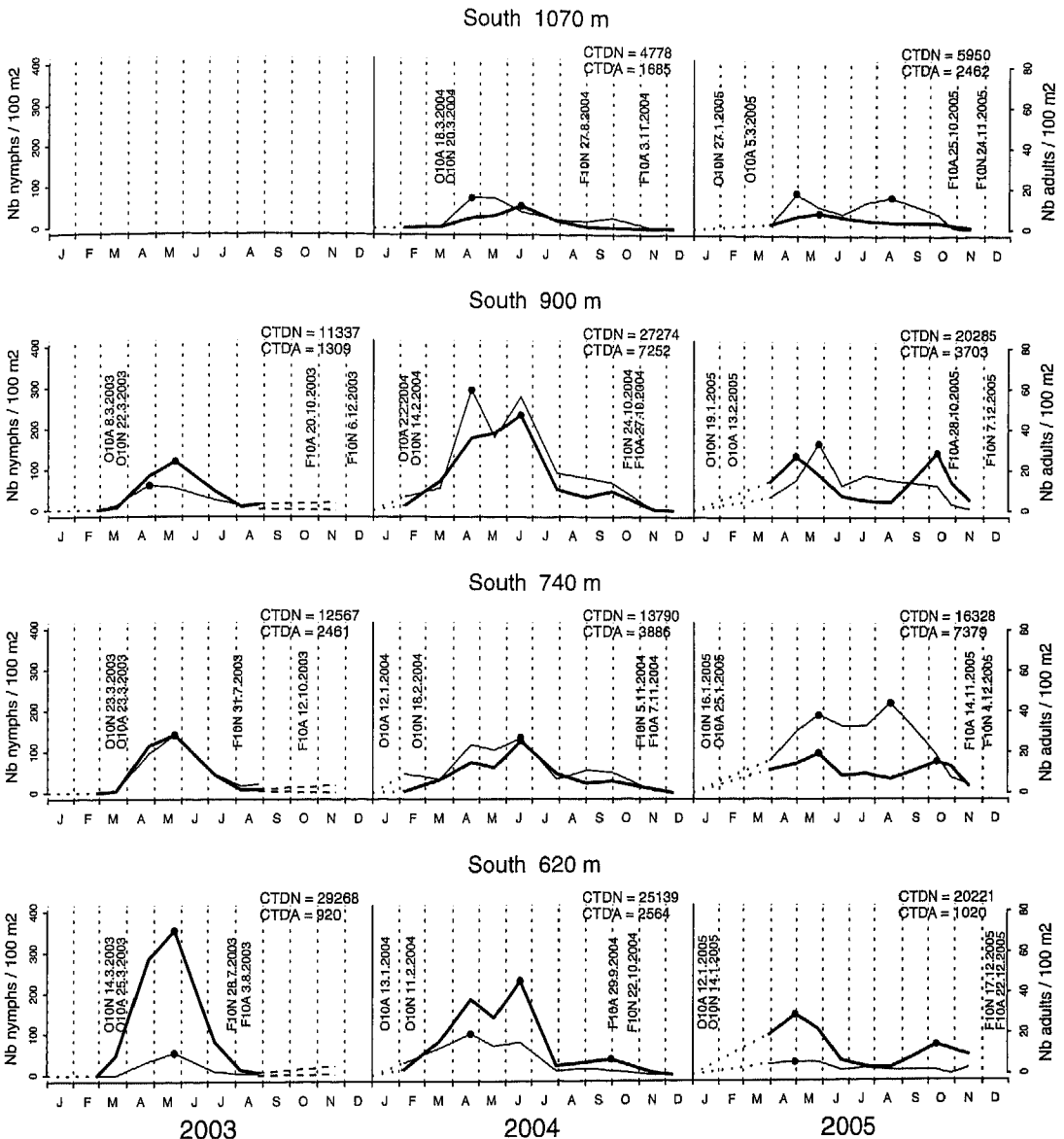


Fig. 4. Questing *I. ricinus* nymphs (bold line) and adults (thin line) at four different altitudes on the south-facing slope of Chaumont Mountain from 2003 to 2005. CTDN, number of nymphs per 100 m² per year. CTDA, number of adults per 100 m² per year. O10N, onset of nymphal activity. O10A, onset of adult activity. F10N, end of nymphal activity. F10A, end of adult activity.

nymphs and 8.5°C for adults (data not shown). However, nymphs could occasionally be collected already at 2.9°C and adults at 4.2°C.

On both slopes of Chaumont, the seasonal patterns of questing tick activity varied according to year and to altitude (Figs. 3 and 4). On the north-facing slope, larvae peaked in June in all sites. On the south-facing slope, questing activity of larvae and nymphs reached their maximum simultaneously in May to July according to altitudes, except at the highest altitude where the larval peak occurred 1 mo after the nymphal peak (data not shown for larvae). On the north-facing

slope, seasonal nymphal and adult questing activity patterns were usually stable, except in 2004 at 1,010 m with the emergence of a strong activity peak in spring (Fig. 3). On the south-facing slope, seasonal patterns were stable at 1,070 m, whereas they were changeable among years at the other elevations (Fig. 4).

In 2003, unimodal tick activity patterns were observed along the south-facing altitudinal gradient (no data for the north-facing slope) (Fig. 4). In 2005, a clear bimodal distribution of questing tick activity was noticed in almost all study sites on both slopes of the mountain with peaks of similar magnitude in spring

Table 1. Proportion of *B. burgdorferi* s.l. infected *I. ricinus* ticks at different altitudes on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain from 2003 to 2005

Site/altitude (m)	Infection rates in nymphs (%)				Infection rates in adults (%)			
	2003	2004	2005	Total	2003	2004	2005	Total
N 1,010	na	37/140 (26.4)	32/116 (27.6)	69/256 (26.9)	na	9/59 (15.3)	3/40 (7.5)	12/99 (12.1)
N 910	na	12/112 (10.7)	11/101 (10.9)	23/213 (10.8)	na	5/34 (14.7)	11/39 (28.2)	16/73 (21.9)
N 780	na	23/131 (17.6)	21/90 (23.3)	44/221 (19.9)	na	8/38 (21.1)	4/28 (14.3)	12/66 (18.2)
Total N	na	72/383 (18.8)	64/307 (20.8)	136/690 (19.7)	na	22/131 (16.8)	18/107 (16.8)	40/238 (16.8)
S 1,070	0/5 (0.0)	31/88 (35.2)	25/123 (20.3)	56/216 (25.9)	0/2 (0.0)	12/49 (24.5)	17/69 (24.6)	29/120 (24.2)
S 900	14/86 (16.3)	40/140 (28.6)	23/149 (15.4)	77/375 (20.5)	7/30 (23.3)	19/107 (17.8)	25/94 (26.6)	51/231 (22.1)
S 740	16/75 (21.3)	46/144 (31.9)	16/164 (9.8)	78/383 (20.4)	11/43 (25.6)	38/91 (41.8)	25/137 (18.2)	74/271 (27.3)
S 620	22/100 (22.0)	54/158 (34.2)	36/154 (23.4)	112/412 (27.2)	0/5 (0.0)	21/59 (35.6)	3/22 (13.6)	24/86 (27.9)
Total S	52/266 (19.5)	171/530 (32.3)	100/590 (16.9)	323/1386 (23.3)	18/80 (22.5)	90/306 (29.4)	70/322 (21.7)	178/708 (25.1)
Total N & S	52/266 (19.5)	243/913 (26.6)	164/897 (18.3)	459/2076 (22.1)	18/80 (22.5)	112/437 (25.6)	88/429 (20.5)	218/946 (23.0)

N, north-facing slope; S, south-facing slope; na, not available.

and autumn (Figs. 3 and 4). Tick density in autumn was sometimes even higher than in spring as seen for adults at 740 m and for nymphs at 900 m on the south-facing slope.

Altogether, cumulative tick density was significantly higher on the south-facing slope than on the north-facing slope (Figs. 3 and 4) (unpaired Wilcoxon test, $n = 17$, $P = 0.036$). Density for nymphs decreased with altitude on the south-facing slope (Spearman's rank correlation, $P = 0.048$), but it had a tendency to increase with altitude on the north-facing slope of Chaumont (Spearman's rank correlation, $P = 0.09$). The beginning of nymphal activity in spring (ON10) was delayed with altitude on the south-facing slope (Page test, $P < 0.05$) but not on the northern slope.

In total, 459/2,076 (22.1%) nymphs and 218/946 (23.0%) adults analyzed on both altitudinal gradients were infected by *B. burgdorferi* s.l. (Table 1). There were no significant differences in the infection prevalences between nymphal and adult stages either between the seven examined sites (χ^2 test, $P = 0.6$) or when the north- and south-facing slopes were considered (χ^2 test, $P = 0.37$ and $P = 0.38$, respectively).

Borrelia prevalences in ticks varied according to exposure (higher on the south-facing slope of Chaumont) and among years on the south-facing slope (maximal prevalence in 2004) (logistic regression,

nymphs: $t = 2.257$, $P = 0.024$; adults: $t = 2.592$, $P = 0.009$ for exposure; logistic regression, nymphs: $t = -5.789$, $P < 0.0001$; adults: $t = -2.032$, $P = 0.042$ for year). Infection prevalences in nymphs varied according to altitude, higher at the lowest altitude on the south-facing slope (620 m) (logistic regression, $t = -2.275$, $P = 0.023$) and higher at the highest altitude (1,010 m) on the north-facing slope (logistic regression, $t = 3.823$, $P = 0.0001$). During the current study, the PTDi varied from 3.6 to 78.7 infected nymphs per 100 m² (Table 2) and was five-fold lower for adults, ranging between 0.6 and 16.9 infected adults per 100 m².

Four *Borrelia* species were identified by RLB in ticks analyzed in 2004 ($n = 1,350$) and 2005 ($n = 1,326$): *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., and *B. valaisiana*. *B. afzelii* was usually the dominant species at each site with the highest prevalence at 1,010 m on the north-facing slope and the lowest at 1,070 m on the south-facing slope (Table 3). At this site *B. burgdorferi* s.s. was the dominant species closely followed by *B. valaisiana*. On the north-facing slope *B. burgdorferi* s.s. was more frequent at 910 m and *B. garinii* and *B. valaisiana* at 780 m. Mixed infections were detected in 52 ticks (29 nymphs and 23 adults): *B. garinii* and *B. valaisiana* in 21 ticks, *B. afzelii* and *B. burgdorferi* s.s. in 20 ticks, *B. garinii* and *B. afzelii* in six ticks, *B. garinii* and *B. burgdorferi* s.s. in three ticks, and *B. afzelii* and

Table 2. Peak tick density (PTD)^a and peak tick density of infected *I. ricinus* ticks (PTDI)^b at different altitudes on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain from 2003 to 2005

Site/altitude (m)	Nymphs						Adults					
	PTD			PTDI			PTD			PTDI		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
N 1,010	na	172	47	na	45.4	13.0	na	19	11	na	5.0	3.0
N 910	na	41	33	na	4.4	3.6	na	6	10	na	0.6	1.1
N 780	na	40	27	na	7.0	6.3	na	6	5	na	1.1	1.2
S 1,070	na	56	40	na	19.7	8.1	na	15	18	na	5.3	3.7
S 900	120	234	143	19.6	66.9	22.0	12	59	33	2.0	16.9	5.1
S 740	142	127	97	30.2	40.5	9.5	28	27	44	6.0	8.6	4.3
S 620	355	230	147	78.1	78.7	34.4	11	20	6	2.4	6.7	1.4

N, north-facing slope; na, not available; S, south-facing slope.

^a PTD, maximal tick density over 1 yr expressed as number of ticks per 100 m².

^b PTDI: PTD x infection prevalence. Maximal infected tick density over 1 yr expressed as number of infected ticks per 100 m².

Table 3. Distribution and prevalence of *B. burgdorferi* s.l species in infected *I. ricinus* ticks on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain in 2004 and 2005

Site/altitude (m)	Nymphs						Adults					
	Borrelia Identification (%) ^a			Infected/tested (%)			Borrelia Identification (%)			Infected/tested (%)		
	af	ga	ss	vs	sl	mixed	af	ga	ss	vs	sl	mixed
N 1,010	50	5	3	3	4	4	4	2	3	2	1	0
N 910	12	2	3	2	3	1	5	2	5	1	1	2
N 780	13	10	2	7	8	4	3	1	1	3	2	2
Total N	75 (55.2)	17 (12.5)	8 (5.9)	12 (8.8)	15 (11.0)	9 (6.6)	12 (30.0)	5 (12.5)	9 (22.5)	6 (15.0)	4 (10.0)	4 (10.0)
S 1,070	12	10	13	11	6	4	4	4	8	6	4	3
S 900	34	6	10	5	4	4	16	7	10	3	3	5
S 740	30	11	6	2	6	7	14	10	13	9	9	8
S 620	53	15	4	4	9	5	10	6	0	1	4	3
Total S	129 (47.6)	42 (15.5)	33 (12.2)	22 (8.1)	25 (9.2)	20 (7.4)	44 (27.5)	27 (16.9)	31 (19.3)	19 (11.9)	20 (12.5)	19 (11.9)
Total N & S	204 (50.1)	59 (14.5)	41 (10.1)	34 (8.4)	40 (9.8)	29 (7.1)	56 (28.0)	32 (16.0)	40 (20.0)	25 (12.5)	24 (12.0)	23 (11.5)

N, north-facing slope, S, south-facing slope.
^a af, *B. afzelii*; ga, *B. garinii*; ss, *B. burgdorferi* s.s.; vs, *B. valaisiana*; sl, untypeable *Borrelia*; mixed, mixed *B. burgdorferi* s.l. infection.

B. valaisiana, and *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, and *B. afzelii* in one tick each.

Evolution of Tick Densities and Seasonal Activity on the South-Facing Slope between Two Study Periods. Comparison of climatic data on the south-facing slope between the previous study carried out in 1999–2001 (Jouda et al. 2004b) and the current study showed a marked increase in SD in 2003–2005. During the first study, the threshold of 10 mmHg was rarely reached even at the lowest altitudes and only for very short periods. This threshold happened punctually after the spring peak (in September 1999 and in July 2000) or earlier (end of May 2001 until mid-July). Between the two studies, differences were observed in monthly average temperature as recorded by the MétéoSuisse stations (Table 4). Monthly average temperatures during winter and spring decreased between the two periods, whereas monthly average temperature in summer and autumn increased. This evolution belongs to a general trend observed during 1996–2005. The major temperature increase was recorded at the highest altitude: mean summery temperatures were 1.6°C above the 1999–2001 values. A closer look at the monthly average temperatures showed that the main decreases occurred in February (2.31°C at 485 m and 1.97°C at 1,073 m) and in May (1.83°C at 485 m and 1.73°C at 1,073 m), and the main increases took place in June (2.90°C at 485 m and 3.13°C at 1,073 m) and July (1.13°C for both stations).

Substantial variations in density and phenology of ticks were observed between the two studies. At high elevations (740 and 900 m), CTD values for nymphs and adults were significantly higher during the last period (chi-square goodness-of-fit test, $P < 0.0001$) than during the first period (Table 5). The most important divergence was observed at 900 m where mean CTD values were 2.25 and 3.5 times higher for nymphs and adults, respectively, during the current study. At the lowest altitude, no difference was observed for nymphs, whereas adults were significantly less abundant during the last period (chi-square goodness-of-fit test, $P < 0.0001$). In addition, the seasonal activity of ticks at 900 m displayed a greater variability between years compared with the first study.

Discussion

A previous study along an altitudinal gradient on the south-facing slope of Chaumont revealed that phenology was related to altitude and that tick density and prevalence of *B. burgdorferi* infection decreased with altitude (Jouda et al. 2004b). Different temperature conditions occurring simultaneously within a short distance along this altitudinal gradient induced variable phenologies of ticks. Hence, modifications of temperature in the context of global warming may help to better understand their influence on the evolution of questing tick density and Lyme borreliosis risk. Therefore, we followed up this study over three more years considering climatic factors, and we investigated the situation

Table 4. Seasonal average temperatures (°C) during the two study periods (1999–2001, Jouda et al. [2004b] and 2003–2005) and during the 3-yr period preceding the first study recorded at two meteorological stations located at 485 and 1,073 m on the south-facing slope of Chaumont Mountain

Season	Station at 485 m				Station at 1,073 m			
	1996–1998	1999–2001	2003–2005	Difference ^a	1996–1998	1999–2001	2003–2005	Difference ^a
Spring	9.9	10.6	10.1	-0.5	5.6	6.2	5.9	-0.3
Summer	18.4	18.5	20.0	1.5	13.6	13.9	15.5	1.6
Autumn	9.6	10.5	12.0	1.5	5.8	6.6	7.1	0.5
Winter	2.0	2.7	1.6	-1.1	-0.4	-0.7	-1.7	-1.0
Annual avg	10.0	10.6	10.9	0.3	6.2	6.5	6.7	0.2

^a Differences were calculated between 1999–2001 and 2003–2005.

along an altitudinal gradient on the north-facing slope of the same mountain.

An annual variability in tick density (CTD) as well as changeable patterns of tick activity between years was noticed in all study sites. This is in line with previous temporal studies on tick density reported in Europe (Tälleklint and Jaenson 1996, Jensen 2000, Jensen and Frandsen 2000, Randolph et al. 2002, Randolph 2004, Jouda et al. 2004b, Ferquel et al. 2006).

On the south-facing slope of the mountain, a unimodal distribution of tick activity was observed in 2003. Interestingly, this summer extreme heat and low precipitations led to an exceptionally dry season over most parts of Europe, particularly in western Switzerland (Rebetez et al. 2006). SD values above 10 mmHg were recorded after June and remained high for months. High SD causes water stress in ticks (especially in nymphs) so questing activity is generally interrupted and ticks move to the ground for rehydration. Moreover, rising tick movements due to high SD may increase tick mortality owing to exhaustion of their energy reserves (Randolph and Storey 1999; Perret et al. 2003, 2004). Thus, this exceptional increase in summer temperatures in 2003 and the high and long-lasting SD values may have impaired questing tick activity and increased tick mortality, preventing the occurrence of an autumn peak at short term and reducing tick density at long term.

The second remarkable event was the appearance of a low spring peak of questing tick activity and a marked autumn peak in 2005 at the three lowest elevations on the south-facing slope. Probably, the weak spring peak of questing tick may have been induced by high SD values exceeding 10 mmHg early in spring and remaining high until August. We do not think that the low winter temperatures recorded the same year are responsible for this reduced questing tick density in

spring. Moreover, snow cover prevents low soil temperatures (Berry 1981 cited in Lindgren et al. 2000) and protects ticks from very cold temperatures and probably does not have severe consequences for ticks, which are quiescent at this period (Randolph 2004). The autumn peaks, which are as important as spring peaks, are probably due to two phenomena. Favored development of spring-fed larvae and nymphs at all altitudes due to an increase in summer temperatures allowed these ticks to quest in autumn the same year. In addition, spring ticks may have reactivated their questing activity in autumn. Interestingly, the autumn peak emerged when SD values dropped. A similar phenomenon was described in 1998 in a very close site (Perret et al. 2000).

Recorded climatic data did not allow explaining changeable patterns of tick activity in sites with northern exposure, especially at 1,010 m in 2004 when a noteworthy spring peak of questing ticks occurred. Moreover, the effect of increased temperature, as recorded in summer 2003, on the behavior of some host communities that might influence tick densities is unknown.

Questing tick density decreased with altitude on the south-facing slope of Chaumont, which is in line with previous observations (Jouda et al. 2004b). On the north-facing slope, the highest tick density was recorded at the highest altitude, >1,000 m. This situation contrasts with a study describing that tick establishment and development were limited or prevented by cold temperatures at high altitudes (Daniel 1993). However, higher tick density in altitude also has been observed along a north-facing altitudinal gradient but in an area with a dry and warm climate, the Rhône Valley in Switzerland (Burri et al. 2007). Local differences in micro- and mesoclimatic conditions may allow a better maintenance at high altitudes than at low altitudes.

When we compared our results from the south-facing slope with those from the previous study (1999–2001), striking differences were observed in tick phenology and this during a period of climate features showing warmer summers and autumns and colder winters. Considering a longer period (1996–2005), annual average temperatures showed an increase of 0.9 and 0.5°C at the lowest and highest altitudes, respectively, and this within a clear trend of warmer summers and autumns and colder winters. The tem-

Table 5. Cumulative tick density (CTD) of *I. ricinus* ticks calculated for the 1999–2001 and 2003–2005 surveys on the south-facing slope of Chaumont Mountain

Altitude (m)	CTD Nymphs		CTD Adults	
	1999–2001 ^a	2003–2005	1999–2001 ^a	2003–2005
900	26,177	58,896	3,477	12,264
740	28,923	42,685	6,830	13,726
620	74,990	74,628	7,789	4,504

^a 1999–2001: Data from Jouda et al. (2004b).

peratures recorded at 485 m from 2003 to 2005 (10.9°C) were higher than the average annual temperature calculated over the 20th century, which was 9.4°C (Baniewicz 2002). Evolution of seasonal questing tick activity and tick densities at 900 m on the south-facing slope demonstrated great variability, whereas stability was the trend registered in the previous study at this altitude. This instability in tick phenology under warmer conditions at high altitude was predicted by Jouda et al. 2004b). This can be explained by rising temperatures recorded in summer at altitude, reaching values similar to those registered in the first study at the lowest altitude and that are favorable for ticks, increasing their density at 900 m. Similar effects of warm temperature on tick population at high elevation have been described by Daniel et al. (2003) and Danielova et al. (2006). They showed an extension of *I. ricinus* distribution at higher altitudes during the last decades in the Czech Republic, probably due to an increase in temperatures.

Otherwise, at the lowest altitude, high temperatures and moisture stress had a considerable negative impact on tick abundance. Long-lasting high SD values as observed during the last study probably represent a danger for tick population survival. At this altitude, ticks seem to suffer from the effect of global warming, and possibly, they are reaching here the limit of the climatic conditions tolerable for their maintenance. A similar phenomenon also was noticed in the Swiss Alps, in a warmer and drier region (Burri et al. 2007) where tick establishment was prevented by high and long-lasting SD values. Nymphs show lower resistance to water stress than adults, leading to increased death rates (Perret et al. 2004). Probably, nymphs could not quest long enough to find a host before dying of desiccation and/or energy exhaustion. This could explain the lower adult densities recorded during the current study.

Upon synchrony of extreme weather conditions with the tick questing activity, for example, in spring at the lowest altitude, whereas high and long-lasting SDs arose and many ticks quested, questing duration was reduced and tick mortality was increased, leading to a lower questing tick population (Perret et al. 2003, 2004). At higher altitudes, increased temperatures to values favorable to ticks led to an increase in tick density probably through reduced developmental duration from one instar to the next. In both scenarios, it remains to elucidate whether the host community was affected by temperature changes and how this might influence questing tick population.

The overall prevalence of *B. burgdorferi* s.l. in questing *I. ricinus* ticks was 22.4% (677/3,022) and differed considerably among years. Our data are in line with those previously reported in Switzerland (Péter et al. 1995; Jouda et al. 2003, 2004a; Burri et al. 2007) and more particularly in Neuchâtel (Aeschlimann et al. 1986; Jouda et al. 2004b). Curiously, no significant difference was detected between nymphal and adult infection rates as reported previously in this site (Jouda et al. 2004b). We noticed that nymphal population suffered from unfavorable climatic conditions

at the lowest altitude, resulting in a smaller adult population. Whether *Borrelia* infection has an influence on tick survival under such conditions is unknown.

Infection prevalence was lowest at the highest altitude on the south-facing slope as observed in other studies (Rizzoli et al. 2002; Jouda et al. 2004b; Burri et al. 2007). However, on the north-facing slope, highest infection rates occurred at the highest altitude, reasons for such a discrepancy are unclear.

Density of infected nymphs (calculated as PTDi) was five-fold higher than density of infected adults (ranging from 3.6 to 78.7 infected nymphs per 100 m² versus 0.6–16.9 infected adults per 100 m²). Maximal values surpassed those previously reported on the south-facing slope of the mountain (68.6 for nymphs and 16.7 for adults, Jouda et al. 2004b) and are among the highest notified in Switzerland (Jouda et al. 2004a, Burri et al. 2007). In France, PTDi for nymphs (calculated from data in Ferquel et al. 2006) reached higher values (106.9 infected nymphs), whereas in Sweden, PTDi was lower (6.5 infected nymphs/100 m², calculated from data in Tälleklint and Jaenson 1996). Usually, nymphs represent the stage of highest risk in Lyme borreliosis incidence. In Chaumont, a high nymph density and a high infection rate, both increasing, suggest an important risk for humans.

Molecular analysis of bloodmeal sources in ticks collected on both slopes of Chaumont Mountain showed that artiodactyls, red squirrels, birds, small rodents, and foxes were the main hosts for ticks (F.M.C. et al., unpublished data). This study also reported an association between host DNA and some *Borrelia* species in ticks. On both slopes, *B. afzelii* was associated with detection of rodent DNA in ticks and *B. garinii* and *B. valaisiana* with bird DNA. These hosts are known to be reservoirs for these genospecies (Kurtenbach et al. 1998; Humair and Gern 1998; Humair et al. 1998, 1999).

The great variability of infection prevalence (higher on the south-facing slope) and distinct distribution of *Borrelia* genospecies (related to exposure and altitude) at mesoclimatic scale underlines the large diversity of factors involved in *Borrelia* species prevalence in nature. *Borrelia* cycles are maintained in nature by a wide range of hosts that contribute differentially according to their competence for pathogen transmission (Piesman and Gern 2004). Understanding the evolution of tick population and tick-borne disease dynamics is essential to establishing human risk. For example, it has been predicted under climatic changes that enzootic cycles of tick-borne encephalitis virus in Europe may disappear from the southern edge of its distribution, whereas new foci will move into higher latitudes (Randolph 2001). Here, we observed an increase in the density of *Borrelia*-infected nymphs particularly at the highest altitudes over a period of 7 yr in a context of warmer summers and autumns. Global warming has an impact in this model, but it is still unclear why divergences are present depending on geographic areas and even at local scale. This is our incentive to continue to survey

tick population on the south-facing slope of Chaumont in the context of global warming.

Acknowledgments

We thank Caroline Burri and Véronique Douet for precious help. Thanks also to Adam Joyce for English review of the manuscript. This work is part of the Ph.D. dissertation of M.C.F. This study has been partly supported by the Swiss National Science Foundation grant 3200B0-100657.

References Cited

- Aeschlimann, A., E. Chamot, F. Gigon, J. P. Jeanneret, D. Kessler, and C. Walther. 1986. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zentbl. Bakt. Hyg. A 263: 450–458.
- Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, I. Van de Pol, and L. M. Schouls. 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. J. Clin. Microbiol. 39: 2237–2242.
- Baniewicz, J. 2002. Observations météorologiques faites en 2001 à l'observatoire cantonal de Neuchâtel. Bull. Soc. Neuchâtoise Sci. Nat. 125: 155–162.
- Burri, C., F. Morán Cadenas, V. Douet, J. Moret, and L. Gern. 2007. *Ixodes ricinus* density and infection prevalence with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). Vector Borne Zoonotic Dis. 7: 50–58.
- Chmela, J. 1969. On the developmental cycle of the common tick (*Ixodes ricinus* L.) in the North-Moravian natural focus of tick-borne encephalitis. Folia Parasitol. 16: 313–319.
- Daniel, M. 1993. Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* (L.) in central Europe. Acarologia XXXIV: 105–113.
- Daniel, M., V. Danielova, B. Kriz, A. Jirsa, and J. Nozicka. 2003. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22: 327–328.
- Danielova, V., N. Rudenko, M. Daniel, J. Holubova, J. Materna, M. Golovchenko, and L. Schwarzova. 2006. Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. Int. J. Med. Microbiol. 296S1: 48–53.
- Dsouli, N., H. Younsi-Kabachii, D. Postic, S. Nounira, L. Gern, and A. Bouattour. 2006. Reservoir role of lizard *Psammotromus algeris* in transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Spirochaetaceae) in Tunisia. J. Med. Entomol. 43: 737–742.
- Eisen, R. J., L. Eisen, M. B. Castro, and R. S. Lane. 2003. Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in northern California: effect of climatic conditions and habitat type. Environ. Entomol. 32: 1010–1018.
- Ferquel, E., M. Garnier, J. Marie, C. Bernède-Bauduin, G. Baranton, C. Pérez-Eid, and D. Postic. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmatocae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3074–3078.
- Gray, J. S. 1984. Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. Acarologia XXV: 167–178.
- Guy, E. C., and G. Stanek. 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. J. Clin. Pathol. 44: 610–611.
- Humair, P.-F., and L. Gern. 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. Acta Trop. 69: 213–227.
- Humair, P.-F., D. Postic, R. Wallich, and L. Gern. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. Zentralbl. Bakteriologie. 287: 521–538.
- Humair, P.-F., O. Rais, and L. Gern. 1999. Transmission of *B. afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. Parasitology 118: 33–42.
- Jensen, P. M. 2000. Host seeking activity of *Ixodes ricinus* ticks based on daily consecutive flagging samples. Exp. Appl. Acarol. 24: 695–708.
- Jensen, P. M., and F. Frandsen. 2000. Temporal risk assessment for Lyme borreliosis in Denmark. Scand. J. Infect. Dis. 32: 539–544.
- Jouda, F., M. Crippa, J.-L. Perret, and L. Gern. 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). Eur. J. Epidemiol. 18: 907–912.
- Jouda, F., J.-L. Perret, and L. Gern. 2004a. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. Vector Borne Zoonotic Dis. 4: 23–32.
- Jouda, F., J.-L. Perret, and L. Gern. 2004b. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. J. Med. Entomol. 41: 162–169.
- Korenberg, E. I. 2000. Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. Exp. Appl. Acarol. 24: 665–681.
- Kurtenbach, K., M. Peacy, S.G.T. Rijpkema, A. N. Hoodless, P. A. Nuttall, and S. E. Randolph. 1998. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1169–1174.
- Lindgren, E., L. Tälleklint, and T. Polfeldt. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. Environ. Health Perspect. 108: 119–123.
- MacLeod, J. 1934. *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment: the influence of climate on development. Parasitology 26: 282–305.
- Mermod, C., A. Aeschlimann, and J.-F. Graf. 1973. Ecologie et éthologie d'*Ixodes ricinus* Linné 1758, en Suisse (Acarina, Ixodoidea). Première note: fluctuations numériques. Acarologia XV: 197–205.
- Perret, J.-L., E. Guigoz, O. Rais, and L. Gern. 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). Parasitol. Res. 86: 554–557.
- Perret, J.-L., P. M. Guerin, P.-A. Diehl, M. Vlimant, and L. Gern. 2003. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. J. Exp. Biol. 206: 1809–1815.
- Perret, J.-L., O. Rais, and L. Gern. 2004. Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. J. Med. Entomol. 41: 361–365.
- Péter, O., A. G. Bretz, and D. Bee. 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. Eur. J. Epidemiol. 11: 463–467.
- Piesman, J., and L. Gern. 2004. Lyme borreliosis in Europe and North America. Parasitology 129: S191–S220.

- 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.
- Poupon, M.-A., E. Lommano, P.-F. Humair, V. Douet, O. Rais, M. Schaad, L. Jenni, and L. Gern. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 976-979.
- Randolph, S. E. 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356: 1045-1056.
- Randolph, S. E. 2004. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* 129: S37-S65.
- Randolph, S. E., and K. Storey. 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *J. Med. Entomol.* 36: 741-748.
- Randolph, S. E., R. M. Green, A. N. Hoodless, and M. F. Peacey. 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 32: 979-989.
- Rauter, C., and T. Hartung. 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7203-7216.
- Rebetez, M., H. Mayer, O. Dupont, D. Schindler, K. Gartner, J. P. Kropp, and A. Menzel. 2006. Heat and drought 2003 in Europe: a climate synthesis. *Ann. For. Sci.* 63: 569-577.
- Richter, D., D. Postic, N. Sertour, I. Livey, F. R. Matuschka, and G. Baranton. 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 873-881.
- Rijpkema, S., D. Golubic, M. Molkenboer, N. Verbeek-De Kruij, and J. Schellekens. 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp. Appl. Acarol.* 20: 23-30.
- Rizzoli, A., S. Merler, C. Furlanello, and C. Genchi. 2002. Geographical information systems and bootstrap aggregation (bagging) of tree-based classifiers for Lyme disease risk prediction in Trentino, Italian Alps. *J. Med. Entomol.* 39: 485-492.
- 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.
- Tälleklint, L., and T.G.T. Jaenson. 1996. Seasonal variations in density of questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) nymphs and prevalence of infection with *B. burgdorferi* s.l. in south central Sweden. *J. Med. Entomol.* 33: 592-597.
- Yousfi-Monod, R., and A. Aeschlimann. 1986. Recherches sur les tiques (Acarina, Ixodidae), parasites de bovidés dans l'ouest algérien. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 61: 341-358.

Received 19 December 2006; accepted 26 February 2007.

4.3 PUBLICATION 3

Identification of host blood meal source and *Borrelia burgdorferi sensu lato*
in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland)

Francisca Morán Cadenas¹, Olivier Rais¹, Pierre-François Humair¹, Véronique Douet¹, Jacqueline Moret²
and Lise Gern¹

Journal of Medical Entomology. *In press*.

¹Institut de Biologie, Laboratoire d'Éco-Épidémiologie des Parasites, Université de Neuchâtel, Suisse.

²Institut de Mathématiques, Université de Neuchâtel, Suisse.

Morán Cadenas et al.: Detection of
host blood meal and *Borrelia* in ticks

Lise Gern
Institut de Biologie
Laboratoire d'Éco-Épidémiologie
Emile-Argand 11
CH - 2009 - Neuchâtel
Phone: ++41 32 718 3000
Fax: ++41 32 718 3001
E-mail: lise.gern@unine.ch

IDENTIFICATION OF HOST BLOOD MEAL SOURCE AND *BORRELIA*
BURGDORFERI SENSU LATO IN FIELD-COLLECTED *IXODES RICINUS*
TICKS IN CHAUMONT (SWITZERLAND)

Francisca Morán Cadenas¹, Olivier Rais¹, Pierre-François Humair¹, Véronique
Douet¹, Jacqueline Moret² and Lise Gern¹

¹Institut de Biologie, Laboratoire d'Éco-Épidémiologie des Parasites, University of
Neuchâtel, Switzerland

²Institut de Mathématiques, University of Neuchâtel, Switzerland

ABSTRACT

To evaluate the importance of vertebrate species as tick hosts and as reservoir hosts in 2 endemic areas for Lyme Borreliosis in Switzerland, we applied molecular methods for the analysis of blood meal source and *Borrelia* infection in questing *Ixodes ricinus* ticks. A total of 1,326 questing ticks were simultaneously analyzed for *Borrelia* and for blood meal remnants using Reverse Line Blot. An overall infection prevalence of 19.0% was recorded for *Borrelia* sp, with similar rates in both sites. Using a newly developed method for the analysis of blood meal targeting the 12S rDNA mitochondrial gene, identification of host DNA from field-collected ticks was possible in 43.6% of cases. Success of host identification at the genus and species level reached 72%. In one site, host identification success reached its maximum in spring (93% in May), decreasing in summer (20% in July) and rising in autumn (73% in October). In the other site, identification rate in ticks remained low from April to July and increased in autumn reaching 68% in October and November. The most prevalent identified host DNA was artiodactyls in both sites. Red squirrel DNA was significantly more frequently detected in ticks collected in one site whereas insectivore DNA was more frequent in ticks in the other site. DNA from more than one vertebrate host was detected in 19.5% of nymphs and 18.9% of adults. Host DNA was identified in 48.4% of the *Borrelia* infected ticks. Although DNA from all *Borrelia* species was found in at least some ticks with DNA from mammals and some ticks with DNA from birds, our results confirm a general association of *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss with rodents, and *B. valaisiana* and *B. garinii* with birds.

Key words: *Borrelia* infected ticks, blood meal, host DNA identification.

The tick *Ixodes ricinus* is widespread in Europe where a large range of vertebrate species, including mammals, birds and reptiles play important roles for tick cycle maintenance. This tick species is also the main vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), the etiologic agent of Lyme borreliosis. Seven different *Borrelia* genospecies have been found associated with *I. ricinus*: *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissetii* and *B. spielmanii* (Rauter and Hartung 2005, Richter et al. 2006). *Borrelia* spirochetes are maintained in nature in transmission cycles involving ticks and some of their vertebrate hosts (Gern and Humair 2002). Identification of tick hosts and reservoir hosts is a difficult task since it requires animal trapping and even, if xenodiagnosis is applied, their maintenance in the laboratory. Application of molecular methods for the analysis of blood meal remnants in questing ticks to identify host DNA permits evaluation of the importance of vertebrate species as tick hosts as well as reservoir hosts, even those rarely trapped (Tobolewski et al. 1992, Kirstein and Gray 1996, Pichon et al. 2003, 2005, 2006; Estrada-Peña et al. 2005). The main drawbacks to this approach are the small quantities of blood meal remnants in questing tick guts and time passed since the last blood meal.

Reverse line blotting (RLB) is a reliable technique for the detection and identification of tick-borne pathogens. A RLB was recently developed to identify host DNA at the genus and species levels in questing *I. ricinus* ticks targeting the 12S rDNA mitochondrial gene (Humair et al. in press). RLB was applied here to identify host DNA that remains in tick guts since the previous blood meal (Humair et al. in press), as well as to detect *Borrelia* DNA (Burri et al. 2007).

The present study is part of a 3-yr study (2003-2005) on *I. ricinus* tick phenology and *Borrelia* infection prevalence along two altitudinal gradients on the

north- and south-facing slopes of a mountain (Chaumont, Switzerland) (Morán Cadenas et al. 2007). The aims of this study were to validate the blood meal analysis method targeting the 12S rDNA mitochondrial gene and to concomitantly identify *Borrelia* infection in ticks. Therefore we applied the newly developed technique allowing identification of host DNA in ticks at the species level to a large number of ticks (Humair et al. in press) collected in 2005 in 2 sites showing different *Borrelia* infection and tick population patterns (Morán Cadenas et al. 2007). The final goal of identifying *Borrelia* genospecies and vertebrate DNA together in the same tick is to obtain information on both tick host and reservoir host diversity in different biotopes that helps comprehension of pathogen circulation within the natural cycle between invertebrate vector and vertebrate host.

Materials and Methods

Collection of ticks. This study was carried out in a mixed forest dominated by deciduous trees on the north- and south facing-slopes of Chaumont Mountain (Neuchâtel, Switzerland) (Jouda et al. 2004, Morán Cadenas et al. 2007). Questing ticks were collected monthly from March to November 2005. A 1 m² cotton flag was dragged across low vegetation over a variable distance ranging between 100 and 150 m (Morán Cadenas et al. 2007). Tick density was expressed as the number of ticks collected per 100 m². The flag was inspected every 25 m and nymphs and adults were placed separately in vials containing fresh grass and kept alive at the laboratory for several days (at room temperature and relative humidity close to 95%) until detections of *Borrelia* sp infections and analyses of blood meal remnants for host identification were performed.

DNA extraction from ticks and from vertebrate hosts. Prior to DNA isolation,

ticks were soaked in 70% ethanol and air dried. Isolation of DNA was achieved using ammonium hydroxide (NH₄OH) as previously described (Guy and Stanek 1991, Rijpkema et al. 1996) and slightly modified (Humair et al. in press). Briefly, entire ticks were individually boiled for 15 min at 100°C in 100 µl 0.7 M NH₄OH, cooled quickly and boiled again for 15 min in open vials to evaporate the ammonia (10 or 20 µl samples were retained for PCR analysis, according to *Borrelia* or host DNA identification, respectively). To check for cross-contamination, negative controls were included during each DNA extraction procedure from ticks, which consisted of 100 µl 0.7 M NH₄OH without ticks.

To obtain positive controls for host DNA identification, DNA was extracted from muscle, skin or liver tissues of vertebrates using a DNeasy tissue kit (Qiagen, Basel, Switzerland) according to the manufacturer protocol. DNA was eluted in 200 µl of elution buffer (Qiagen), the DNA concentration was measured with a spectrophotometer and DNA extracts were stored at -20°C until further use.

Identification of *Borrelia* sp by PCR and reverse line blotting (RLB). *I. ricinus* ticks were analyzed for detection of *B. burgdorferi* s.l. genospecies by PCR and RLB hybridization. DNA amplification was performed in a reaction volume of 50 µl containing 10 µl of DNA samples. Primers B5S-Bor and 23S-Bor were used to amplify the variable spacer region between two repeated copies of the 23S and 5S ribosomal genes described in Alekseev et al. (2001). PCR amplifications were run in a Whatman Biometra Tgradient Thermocycler 96 (Göttingen, Deutschland) using a touchdown PCR program modified from Schouls et al. (1999) and described in Burri et al. (2007). Negative and positive controls were included in each PCR. Isolates of *B. burgdorferi* ss (B31), *B. garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632), *B. lusitaniae* (PotiB1, PotiB2, PotiB3) and *B. valaisiana* (VS116) were used as positive controls.

For *Borrelia* identification by RLB, PCR products were hybridized to seven different oligonucleotide probes (75 pmol) (Rijpkema et al. 1995, Poupon et al. 2006) blotted in lines on an activated Biodyne C membrane (Pall Europe Ltd., Portsmouth, UK) using a Miniblotter 45 (Immuntic, Cambridge, MA, USA). Hybridization was visualized by incubating the membrane with enhanced chemiluminescence detection liquid (Amersham Biosciences Europe, Switzerland) and exposing the membrane to X-ray film (Hyperfilm; Amersham, UK).

Identification of host DNA by PCR and RLB. Vertebrate DNA remaining in tick guts was amplified by a touchdown PCR using primers targeting the 12S rDNA mitochondrial gene: 12S-6F (CAAACCTGGGATTAGATACC) and B-12S-9R (5'biotin- AGAACAGGCTCCTCTAG), followed by a RLB hybridization carried out to identify host DNA as described in Humair et al. (in press). DNA extraction from field-collected ticks was achieved using ammonium hydroxide (see above) and 20 µl of tick lysates used as template. For each PCR reaction, negative and positive controls were included. Positive controls were 100 ng of vertebrate DNA.

For host DNA identification by RLB, PCR products were hybridized to a set of 35 different oligonucleotide probes (Table 1) (100 pmol, except for lizard, *Sylvia* and *S. araneus* probes, 500 pmol) that were used to identify the blood meal at the genus or species level within the major groups of vertebrates (small-, medium- and large-mammals, birds and lizards) (Humair et al. in press). Hybridization was performed as described above for *Borrelia*. To prevent contamination owing to the sensitivity of this technique, DNA extraction, PCR setup, and sample addition were completed in separate rooms under UV-hoods dedicated to host DNA identification.

Statistical analysis. All statistics were calculated with S-Plus[®] 7.0 for Windows. The chi-square test was used for *Borrelia* infection comparisons between stages and over

field sites (north- and south-facing slopes) as well as to compare host identification rates by exposure. The Fisher's exact test was used to compare frequency of associations between *Borrelia* genospecies and particular host sources in infected ticks.

Results

A total of 1,326 ticks were analyzed for both host DNA identification and *Borrelia* genospecies: 414 collected on the north-facing slope and 912 on the south-facing slope.

***Borrelia* identification and infection prevalence.** Overall infection prevalence of *Borrelia* spp. was 19.0% (252/1,326), with similar rates on both slopes of the mountain, 19.8% (82/414) on the north-facing slope of Chaumont and 18.6% (170/912) on the south-facing slope. Details are presented in Table 2. Among these 252 infected ticks, 23 ticks (16 nymphs and 7 adults) carried multiple *Borrelia* infection. Therefore, 276 *Borrelia* identifications were achieved clustered into four *Borrelia* species: *B. afzelii* (n = 122, 44.2%), *B. garinii* (n= 42, 15.2%), *B. burgdorferi* ss (n = 51, 18.5%) and *B. valaisiana* (n = 34, 12.3%). Twenty-seven (9.8%) *Borrelia* could not be typed at the species level by the panel of probes used in this study. *B. afzelii* was widely predominant in nymphs followed by *B. garinii* whereas *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* had a fairly similar prevalence in adults (Table 2). Mixed infections were *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss in 10 ticks, *B. garinii* and *B. valaisiana* in nine, *B. garinii* and *B. afzelii* in three and one triple infection with *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss.

Tick host DNA identification. Identification of tick host DNA from field-collected ticks using RLB was possible in 578 out of the 1,326 analyzed ticks (43.6%). Fig. 1

shows the RLB pattern obtained with some field-collected ticks. Identification success was significantly higher in adults (214/429, 49.9%) than in nymphs (364/897, 40.6%) (chi-square test, $P=0.002$). Furthermore, identification rate varied between sites, so it was significantly higher on the north-facing slope (204/414, 49.3%) than on the south-facing slope of Chaumont (374/912, 41.0%) (chi-square test, $P =0.006$). Identification success varied greatly among months. On the north-facing slope, host DNA identification success reached its maximum in spring, 93% (75/81) in May, decreasing to 20% (8/40) in July and was high again in autumn (58%, 35/60, in September and 73%, 22/30, in October) (Figs. 2a and 2b). On the south-facing slope, identification rate in ticks remained low from April to July and increased in autumn reaching 68% in October and November (58/85 and 48/71, respectively) (Figs. 2a and 2b). In 2005, questing tick densities showed a bimodal distribution on both slopes of the mountain. Tick density was higher on the south-facing slope than on the north-facing slope, in 2005 and during previous years (Morán Cadenas et al. 2007).

DNA from more than one host was detected in 111/578 ticks (71 nymphs and 40 adults) in which host DNA was detected (south-facing slope: 80/374, 21.4%; north-facing slope: 31/204, 15.2%, (chi-square test, $P = 0.09$)). Therefore, 712 host identifications were achieved from 578 ticks (Table 3). Multiple host DNA was detected as frequently in nymphs (71/364, 19.5%) as in adults (40/214, 18.7%) (chi-square test, $P = 0.89$). In 62.6% (446/712) host identification was possible at the species level, in 9.4% (67/712) at the genus level and in 27.9% (199/712) at the group level only. Rodent DNA and squirrel DNA were more frequently identified in nymphs than in adults (chi-square test, $P = 0$, $P = 0.04$, respectively), and roe deer DNA more frequently in adults than in nymphs (chi-square test, $P = 0$) (Table 3). For other host DNA no significant differences were observed between tick stages.

On both slopes of Chaumont Mtn., the most commonly identified host DNA was from artiodactyls (47%, 112/239 on the north-facing slope and 40%, 190/473 on the south-facing slope) (Fig. 3). For Artiodactyls, small rodents, birds and Carnivores no significant difference was observed between both slopes. However, red squirrel DNA was significantly more frequently detected in ticks collected on the south-facing slope (100/473, 21%, chi-square test, $P = 0.0028$) whereas insectivore DNA was significantly more frequently detected in those from the north-facing slope (8/239, 3%, chi-square test, $P = 0.0052$).

Reservoir hosts for *Borrelia* spp. Host DNA identification was possible in 47.6% (39/82) and 48.8% (83/170) of ticks infected with *B. burgdorferi* sl on the north- and south-facing slopes, respectively. Blood meal analyses in infected questing ticks are summarized in Table 4.

From previous reports, it is known that *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss are associated with rodents (small mammals and squirrels) and that *B. garinii* and *B. valaisiana* are associated with birds (Hu et al. 1997, Humair and Gern 1998, Humair et al. 1998, 1999; Kurtenbach et al. 1998a, Hanincová et al. 2003a, 2003b). To examine host-*Borrelia* associations thoroughly, we excluded ticks in which more than one host source was identified and those infected with untypeable *Borrelia*. Moreover, since *B. burgdorferi* is known to be transstadially maintained, only nymphs were considered in the analysis of host-*Borrelia* association. So, among *Borrelia* species identified in nymphs fed on small rodents and on squirrels, 4/4 (100%) and 12/14 (86%), respectively, were *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss. In infected ticks fed on birds, 7/15 (47%) carried *B. garinii* and *B. valaisiana*. *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss were more frequently identified in ticks fed on rodents than on birds likewise *B. garinii* and *B. valaisiana* were more frequently identified in ticks fed

on birds than on rodents (Fisher's exact test, $P = 0.047$).

Discussion

In the present study, molecular analysis of blood meals in *I. ricinus* ticks allowed assessment of the importance of host species for *I. ricinus* on a large number of ticks collected in 2 sites, on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain (Switzerland). Host DNA detection success significantly varied in both studied biotopes between 49.3% and 41.0%. Temperatures on the south-facing slope are higher than on the north-facing slope (Morán Cadenas et al. 2007) and may induce a faster digestion of blood explaining the lower success of DNA detection in ticks collected on the south-facing slope. The ability to detect host DNA in adult ticks was significantly higher than in nymphs, most probably due to the higher quantity of blood ingested by ticks during their previous blood meals as nymphs and as larvae. Success of host identification at the genus and species levels reached 72% among ticks with identified host DNA. Previous studies on host identification in ticks using 18S rRNA and 12S rRNA were unable to identify host DNA at the species level (Pichon et al. 2003, 2005, 2006; Estrada-Peña et al. 2005). Overall, the most frequent blood meal source detected in field-collected ticks was artiodactyls when identification was possible only at the group level, and wild boar, red squirrel followed by red fox when identification succeeded at the species level. These results are in line with reports from the Swiss Federal Office of Environment, OFEV, www.wildtier.ch/stat-chasse. In fact, Artiodactyls (deer and chamois) populations increased in Neuchâtel in 2004 and decreased slightly in 2005 due to the harsh winter, whereas wild boar population increased in 2002-2005. Other hosts are differently represented according to the site. Red squirrel DNA was more frequently detected in ticks collected on the south-facing

slope whereas insectivore DNA was further detected in ticks from the north-facing slope, suggesting that host distribution differed in the 2 biotopes.

In almost 20% of ticks in which host DNA was identified, DNA from multiple vertebrate hosts was detected. This observation suggests that interrupted feeding may occur more frequently than expected in *I. ricinus* as formerly observed in *I. scapularis* (Piesman 1991). Alternately, external DNA contamination of ticks due to contacts with hosts without success of attachment is also possible. Nevertheless, this information is useful because it indicates the diversity of host fauna in a biotope.

In 2005, a clear bimodal seasonal pattern of tick density occurred on both slopes of Chaumont. On the south-facing slope, clearly host DNA detection success was higher in autumn than in spring, reaching 68% in October and November. Pichon et al. (2005) reported similar improvement of host source identification in nymphs collected in October in Ireland. Sensitivity of host DNA detection in ticks is dependent on the interval from molting until the next questing activity (i.e. the time when ticks are collected and analyzed). According to Randolph et al. (2002), a single cohort of each stage of ticks emerges each year in the autumn. This is based on the fact that in various sites in UK, ticks with high fat content appeared each year in autumn and that a temperature-dependent development model predicted also the mean emergence of ticks in autumn. The fact that detection success of host DNA was higher in autumn than in spring on the south-facing slope supports the interpretation of *I. ricinus* population dynamics evidenced by Randolph et al. (2002) in UK and supported by Jensen and Kaufmann (2003) in Denmark. However, the situation on the north-facing slope seems different since two peaks in host DNA detection success emerged, one in May with host identification in 93% of ticks, suggesting that ticks molted in spring, and a second one in October with host identification of 73%.

Although these results concern only one year, they give reason to question whether local *I. ricinus* population dynamics may be different from a dynamic with a single cohort in autumn and whether this might be due to very specific climatic conditions.

The capacity of several vertebrates to serve as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes has been more extensively evaluated for rodents, birds and deer. Little is known concerning the status of other potential hosts, such as carnivores, foxes or edible dormice (Matuschka et al. 1994, Kahl and Geue 1998, Liebisch et al. 1998). We present here field evidence that confirms the reservoir status of foxes (Kahl and Geue 1998, Liebisch et al. 1998) and that sheds light on the possible reservoir roles of some hosts hitherto not studied, such as badger, polecat and wild boar. For example, we identified *B. afzelii* in ticks in which wild boar DNA was detected. A similar association between *B. afzelii* and wild boar DNA was recently reported in Spain by Estrada-Peña et al. (2005) targeting the same gene. Additional similar studies in other areas may help us better understand the reservoir status of these hosts, which are difficult to capture and maintain in the laboratory.

One important finding in Lyme borreliosis ecology in the last ten years is the observation of an association between different *Borrelia* genospecies or strains with different vertebrate host species (Kurtenbach et al. 1998b). *B. afzelii* was the most frequent genospecies identified in ticks collected on both slopes of the mountain. High prevalence of *B. afzelii* in infected nymphs suggested that small rodents, such as bank vole, woodmouse and yellow-necked mouse, might be relatively important as reservoir hosts for feeding larvae in our region (Humair et al. 1995, 1999; Hu et al. 1997). Unexpectedly, molecular analysis of blood meal remnants in nymphs showed that small rodents were relatively scarce as reservoir hosts of *Borrelia* spp and as hosts for ticks in our study sites. The implications of these observations are not clear

and are possibly related to reduced populations of mice and voles during the study period. In fact, previous studies in this area showed the importance of small mammals as tick hosts and as reservoirs for *Borrelia* (unpublished data). Most probably other rodents, such as red squirrels, acted more successfully as reservoir hosts for *Borrelia* spirochetes than did mice during the study period. Red squirrels have been shown to be heavily infested by *I. ricinus* larvae and nymphs and to transmit *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss to ticks (Humair and Gern 1998).

As expected, we observed that *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* were associated with small mammals and red squirrels, and *B. valaisiana* and *B. garinii* with birds (Gern and Humair 2002) although these *Borrelia* species were not entirely confined to rodents or birds. The absence of a strict association between *Borrelia* spp and particular hosts is not completely surprising. Similar results were obtained in Switzerland and France, showing no restricted specificity between *Borrelia* species and some host species like badgers (unpublished data), hedgehogs and deer (Gern et al. 1997, Pichon et al. 2000). Other studies on blood meal analysis similarly showed strict and loose associations between *Borrelia* spp and hosts (Pichon et al. 2003, 2005, 2006; Estrada-Peña et al. 2005). This implies that some host species that are not generally considered as reservoir hosts could in fact serve as reservoirs, like Artiodactyls (particularly Cervidae and Bovidae). Alternative explanations for this absence of specificity could be co-feeding transmission of *Borrelia* without systemic infections (Gern and Rais 1996, Hu et al. 2003) as already described for Artiodactyls, for sika deer in Japan and for sheep in the UK (Kimura et al. 1995, Ogden et al. 1997). Additionally, transovarially transmitted spirochetes (Bellet-Edimo et al. 2005), interrupted feeding (Piesman 1991) on various infected hosts or external DNA contamination due to unsuccessful attachment to a host might be responsible for the

variety of *Borrelia* in the different hosts.

In this study, we were able to validate our method for host DNA identification in a large number of field-collected ticks, to corroborate the association between *Borrelia* species and birds and rodents, to confirm the role of red foxes as reservoir hosts and to provide evidence for the role of wild boar as reservoir host for *B. afzelii*. Interestingly, the presence of multiple host DNA in ticks and the loose association between some hosts and *Borrelia* genospecies were rather frequent. This suggests that interrupted feeding of ticks is a common phenomenon in nature, that reservoir hosts for *Borrelia* are more diverse than previously thought and that some *Borrelia* species or strains are not confined to some host species. Co-feeding transmission may also be an explanation, adding to the range of reservoir hosts additional animal species that do not develop systemic infection, and yet might contribute significantly to the transmission of the pathogens (Randolph et al. 1996).

Acknowledgements

This study has been partly supported by the Swiss National Science Foundation grant 3200B0-100657.

This work is part of the Ph.D. dissertation of one of the authors (M.C.F.).

References Cited

- Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, I. Van de Pol, and L. M. Schouls. 2001.** Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2237-2242.
- Bellet-Edimo, R., B. Betschart, and L. Gern. 2005.** Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. *Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat.* 128: 117-125.
- Burri, C., F. Morán Cadenas, V. Douet, J. Moret, and L. Gern. 2007.** *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 50-58.
- Estrada-Peña, A., J. J. Osácar, B. Pichon, and J. S. Gray. 2005.** Host and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Exp. Appl. Acarol.* 37: 257-268.
- 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. 1997.** 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., and P.-F. Humair. 2002.** Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe, pp. 149-174. In J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, and G. Stanek (eds.), *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- Guy, E. C., and G. Stanek. 1991.** Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with

Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 44: 610-611.

Hanincová, K., S. M. Schäfer, S. Etti, H.-S. Sewell, V. Taragelová, D. Ziak, M. Labuda, and K. Kurtenbach. 2003a. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 126: 11-20.

Hanincová, K., V. Taragelová, J. Koci, S. M. Schäfer, R. Hails, A. J. Ullmann, J. Piesman, M. Labuda, and K. Kurtenbach. 2003b. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2825-2830.

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. *Zentralbl. Bakteriol.* 285: 558-564.

Hu, C. M., Y. Cheminade, J.-L. Perret, V. Weynants, Y. Lobet, and L. Gern. 2003. Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 421-426.

Humair, P.-F., O. Péter, 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., and L. Gern. 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop.* 69: 213-227.

Humair, P.-F., D. Postic, R. Wallich, and L. Gern. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 521-538.

Humair, P.-F., O. Rais, and L. Gern. 1999. Transmission of *B. afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential

transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* 118: 33-42.

Humair, P.-F., V. Douet, F. Morán Cadenas, L. Schouls, I. Van De Pol, and L. Gern. Molecular identification of blood meal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J. Med. Entomol.* *In press.*

Jensen, P. M., and U. Kaufmann. 2003. Seasonal and diel activity of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) subpopulations in Denmark. Aspects of size, physiological age, and malate dehydrogenase genotype in a forest site without any undergrowth. *Exp. Appl. Acarol.* 30: 289-303.

Jouda, F., J.-L. Perret, and L. Gern. 2004. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J. Med. Entomol.* 41: 162-169.

Kahl, O., and L. Geue. 1998. Laboratory study on the role of the European fox, *Vulpes vulpes*, as a possible reservoir of *Borrelia burgdorferi* s.l., pp. 239. *In* Proceedings, 2nd International Conference on Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface: a global perspective, 28 August – 1 September 1995, Kruger National Park, South Africa.

Kimura, K., E. Isogai, H. Isogai, Y. Kamewaka, T. Nishikawa, N. Ishii, and N. Fujii. 1995. Detection of Lyme disease spirochetes in the skin of naturally infected wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1641-1642.

Kirstein, F., and J. S. Gray. 1996. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4060-4065.

Kurtenbach, K., M. Peacy, S. G. T. Rijpkema, A. N. Hoodless, P. A. Nuttall, and S. E. Randolph. 1998a. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia*

burgdorferi sensu lato by game birds and small rodents in England. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1169-1174.

Kurtenbach, K., H.-S. Sewell, N. H. Ogden, S. E. Randolph, and P. A. Nuttall. 1998b. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. Infect. Immun. 66: 1248-1251.

Liebisch, G., B. Dimpfl, B. Finkbeiner-Weber, A. Liebisch, and M. Frosch. 1998. The red fox (*Vulpes vulpes*) a reservoir competent host for *Borrelia burgdorferi* sensu lato, pp. 238. In Proceedings, 2nd International Conference on Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface: a global perspective, 28 August – 1 September 1995, Kruger National Park, South Africa.

Matuschka, F.-R., H. Eiffert, A. Ohlenbusch, and A. Spielman. 1994. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in Central Europe. J. Infect. Dis. 170: 122-127.

Morán Cadenas, F., O. Rais, F. Jouda, V. Douet, P.-F. Humair, J. Moret, and L. Gern. Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. J. Med. Entomol. 44: 683-693.

Ogden, N. H., P. A. Nuttall, and S. E. Randolph. 1997. Natural Lyme disease cycles maintained *via* sheep by co-feeding ticks. Parasitology 115: 591-599.

Pichon, B., B. Gilot, and C. Pérez-Eid. 2000. Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. Eur. J. Epidemiol. 16: 869-873.

Pichon, B., D. Egan, M. Rogers, and J. Gray. 2003. Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 40: 723-731.

- Pichon, B., M. Rogers, D. Egan, and J. Gray. 2005.** Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5: 172-180.
- Pichon, B., O. Kahl, B. Hammer, and J. S. Gray. 2006.** Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6: 382-387.
- 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.
- Poupon, M.-A., E. Lommano, P.-F. Humair, V. Douet, O. Rais, M. Schaad, L. Jenni, and L. Gern. 2006.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 976-979.
- 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.
- Randolph, S. E., R. M. Green, A. N. Hoodless, and M. F. Peacey. 2002.** An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 32: 979-989.
- Rauter, C., and T. Hartung. 2005.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7203-7216.
- Richter, D., D. Postic, N. Sertour, I. Livey, F. R. Matuschka, and G. Baranton. 2006.** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J.*

Syst. Evol. Microbiol. 56: 873-881.

Rijpkema, S. G., M. J. Molkenboer, L. M. Schouls, F. Jongejan, and J. F.

Schellekens. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. J. Clin. Microbiol. 33: 3091-3095.

Rijpkema, S., D. Golubic, M. Molkenboer, N. Verbeek-De Kruif, and J.

Schellekens. 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. Exp. Appl. Acarol. 20: 23–30.

Schouls, L. M., I. Van De Pol, S. G. Rijpkema, and C. S. Schot. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J. Clin. Microbiol. 37: 2215-2222.

Tobolewski, J., M. J. Kaliszewski, R. K. Colwell, and J. H. Oliver Jr. 1992.

Detection and identification of mammalian DNA from the gut of museum specimens of ticks. J. Med. Entomol. 29: 1049-1051.

Table 1. Probes used in RLB assays and target vertebrates

Probe names	Target organisms
Small rodent	Muroidea (Muridae, Cricetidae)
Artiodactyl	Bovidae, Cervidae, Suidae
Bird	Birds
Lizard	Lizards
Clethrionomys	<i>Clethrionomys glareolus</i> (bank vole)
Apodemus	<i>Apodemus sylvaticus</i> (wood mouse), <i>A. flavicollis</i> (yellow-necked mouse)
M. agrestis/Micromys	<i>Microtus agrestis</i> (field vole), <i>Micromys minutus</i> (harvest mouse)
M. arvalis	<i>Microtus arvalis</i> (common vole)
M. minutus	<i>Micromys minutus</i> (harvest mouse)
R. norvegicus	<i>Rattus norvegicus</i> (brown rat)
R. rattus	<i>Rattus rattus</i> (black rat)
Sciurus	<i>Sciurus vulgaris</i> (red squirrel)
Glis	<i>Myoxus glis</i> (fat dormouse)
Lepus	<i>Lepus europaeus</i> (European hare)
Erinaceus	<i>Erinaceus europaeus</i> (European hedgehog)
S. araneus	<i>Sorex araneus</i> (common shrew)
Neomys sp.	<i>Neomys anomalus</i> (Miller's water shrew), <i>N. fodiens</i> (Eurasian water shrew)
N. anomalus	<i>Neomys anomalus</i> (Miller's water shrew)
T. europaea	<i>Talpa europaea</i> (European mole)
Vulpes	<i>Vulpes vulpes</i> (red fox)
Meles	<i>Meles meles</i> (Eurasian badger)
M. erminea	<i>Mustela erminea</i> (stoat/ermine)
M. putorius	<i>Mustela putorius</i> (European polecat)
Capreolus	<i>Capreolus capreolus</i> (roe deer)
Sus	<i>Sus scrofa</i> (wild boar)
Turdus/Parus	<i>Turdus merula</i> (black bird), <i>T. iliacus</i> (redwing), <i>T. philomelos</i> (song thrush), <i>T. pilaris</i> (fieldfare), <i>Parus major</i> (great tit), <i>P. caeruleus</i> (blue tit)
Erethacus	<i>Erethacus rubecula</i> (European robin)
Parus	<i>Parus major</i> (great tit), <i>P. caeruleus</i> (blue tit)
P. ater	<i>Parus ater</i> (coal tit)
Fringilla/Pyrrhula	<i>Fringilla coelebs</i> (chaffinch), <i>F. montifringilla</i> (brambling), <i>Pyrrhula pyrrhula</i> (Eurasian bullfinch)
Prunella	<i>Prunella modularis</i> (duncock / hedge accentor)
Sitta	<i>Sitta europaea</i> (Eurasian nuthatch)
Sylvia	<i>Sylvia atricapilla</i> (blackcap)
Troglodytes	<i>Troglodytes troglodytes</i> (wren)
Garrulus	<i>Garrulus glandarius</i> (Eurasian jay)

Table 2. *Borrelia burgdorferi* sI infection in questing *Ixodes ricinus* ticks collected on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain.

Site	Nymphs								Adults					
	no.	(%)	<i>Borrelia</i> identification					no.	(%)	<i>Borrelia</i> identification				
			af	ga	ss	vs	sl			af	ga	ss	vs	sl
N1	32/116	(27.6)	22	6	4	2	1	3/40	(7.5)	0	1	2	0	0
N2	11/101	(10.9)	6	2	3	0	1	11/39	(28.2)	6	1	5	1	0
N3	21/90	(23.3)	9	6	4	3	3	4/28	(14.3)	1	0	1	1	1
Total N	64/307	(20.8)	37 (51.4)	14 (19.4)	11 (15.3)	5 (6.9)	5 (6.9)	18/107	(16.8)	7 (35.0)	2 (10.0)	8 (40.0)	2 (10.0)	1 (5.0)
S1	25/123	(20.3)	4	4	6	9	2	17/69	(24.6)	3	3	7	3	2
S2	23/149	(15.4)	18	3	2	3	1	25/94	(26.6)	12	2	9	2	2
S3	16/164	(9.8)	9	4	1	4	1	25/137	(18.2)	6	3	5	6	7
S4	36/154	(23.4)	26	5	2	0	5	3/22	(13.6)	0	2	0	0	1
Total S	100/590	(16.9)	57 (52.3)	16 (14.7)	11 (10.1)	16 (14.7)	9 (8.3)	70/322	(21.7)	21 (28.0)	10 (13.3)	21 (28.0)	11 (14.7)	12 (16.0)
N & S	164/897	(18.3)	94 (51.9)	30 (16.6)	22 (12.2)	21 (11.6)	14 (7.7)	88/429	(20.5)	28 (29.5)	12 (12.6)	29 (30.5)	13 (13.7)	13 (13.7)

Mixed infections were included in single columns.

N1 to N3, sampling sites on the north-facing slope. S1 to S4, sampling sites on the south-facing slope.

af, *B. afzelii*; ga, *B. garinii*; ss, *B. burgdorferi* ss; vs, *B. valaisiana*; sl, untypeable *Borrelia*.

Table 3. Identification of host origin of the blood meal remnants in ticks (nymphs and adults) collected on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain.

Host DNA identification	Nymphs			Adults			Total		
	North	South	Total	North	South	Total	North	South	Total
Small rodents	1	5	6		1	1	1	6	7
<i>Apodemus</i> sp	5	19	24	1		1	6	19	25
<i>Clethrionomys glareolus</i>	14	12	26	1	4	5	15	16	31
<i>Sciurus vulgaris</i>	18	53	71	10	47	57	28	100	128
Artiodactyls	40	58	98	13	32	45	53	90	143
<i>Capreolus capreolus</i>	5	10	15	17	15	32	22	25	47
<i>Sus scrofa</i>	30	38	68	7	37	44	37	75	112
Birds	13	17	30	6	13	19	19	30	49
<i>Erithacus rubecula</i>	1	1	2	1	1	2	2	2	4
<i>Fringilla / Pyrrhula</i>	1	6	7				1	6	7
<i>Garrulus glandarius</i>		1	1		1	1		2	2
<i>Parus ater</i>		1	1					1	1
<i>Parus</i> sp	1	1	2				1	1	2
<i>Sylvia atricapilla</i>		11	11		3	3		14	14
<i>Turdus</i> sp	6	15	21	2	8	10	8	23	31
<i>Vulpes vulpes</i>	9	27	36	1	23	24	10	50	60
<i>Meles meles</i>	1	4	5		6	6	1	10	11
<i>Mustela erminea</i>		1	1	1		1	1	1	2
<i>M. putorius</i>	19		19	7		7	26		26
<i>Neomys anomalus</i>		1	1					1	1
<i>Neomys</i> sp	2		2				2		2
<i>Sorex araneus</i>			0		1	1		1	1
<i>Talpa europaea</i>	6		6				6		6
Total	172	281	453	67	192	259	239	473	712

Table 4. Host origin of the blood meal remnants in infected ticks (nymphs and adults) collected on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain.

Chaumont Mountain	Host DNA	<i>Borrelia</i> identification													
		Nymphs (n=31)						Adults (n=8)							
		af	ss	ga	vs	sl	total	af	ss	ga	vs	sl	total		
North	<i>Apodemus</i> sp	1	1				2								
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	2					2								
	<i>Sciurus vulgaris</i>	4	1			1	6								
	Artiodactyls	3	1	2	2		8		1	1				2	
	<i>Sus scrofa</i>	3	1				4	2	1				1	4	
	<i>Vulpes vulpes</i>	2					2								
	<i>Mustela putorius</i>								2					2	
	Birds	2	1				3								
	<i>Turdus</i> sp			1		2	3								
	Mixture of DNA	5		2			7	1						1	
	Total N	22	5	5	2	3	37	3	4	1	0	1	9		

	Host DNA	<i>Borrelia</i> identification												
		Nymphs (n=44)						Adults (n=39)						
		af	ss	ga	vs	sl	total	af	ss	ga	vs	sl	total	
South	Small rodents					1	1						1	1
	<i>Sciurus vulgaris</i>	4	3	1	1		9	1	7				1	9
	Artiodactyls	5	2			1	8		2	1			1	4
	<i>Capreolus capreolus</i>							1						1
	<i>Sus scrofa</i>	5	1			1	7	1		2			3	6
	<i>Vulpes vulpes</i>	5	1	1			7	1		2			2	5
	<i>Meles meles</i>							1						1
	Birds	1			2		3					1	1	2
	<i>Turdus</i> sp	2		2	2		6				1	1	2	
	<i>Sylvia atricapilla</i>	2					2	1						1
	Mixture of DNA	5	1		1		7	2		1	4			7
Total S	29	8	4	6	3	50	8	9	6	6	10	39		
Total N & S	51	13	9	8	6	87	11	13	7	6	11	48		

Mixed infections were included in single columns.

af, *B. afzelii*; ga, *B. garinii*; ss, *B. burgdorferi* ss; vs, *B. valaisiana*; sl, untypeable

Borrelia.

Figure legends

Fig. 1. RLB results for host DNA identification in field-collected ticks using 12S rDNA as genetic marker (Humair et al. in press). Probe names are listed on the left. N, nymphs. M, males. F, females.

Fig. 2. Monthly host identification success in field-ticks collected on both slopes of Chaumont Mountain (left scale). Questing tick densities (expressed as the number of ticks collected per 100 m²) showed a bimodal distribution (right scale). (A) North-facing slope of Chaumont. (B) South-facing slope of Chaumont. Percentages of identified and not identified hosts are shown by filled bars and by open bars, respectively. Numbers are presented on the table.

Fig. 3. Distribution of host DNA identification in *I. ricinus* ticks collected on the north- and south-facing slopes of Chaumont Mountain.

* Insectivores, more abundant on the north-facing slope of the mountain ($p < 0.05$).

** Red squirrels, more abundant on the south-facing slope of the mountain ($p < 0.05$).

Figures

Fig. 1.

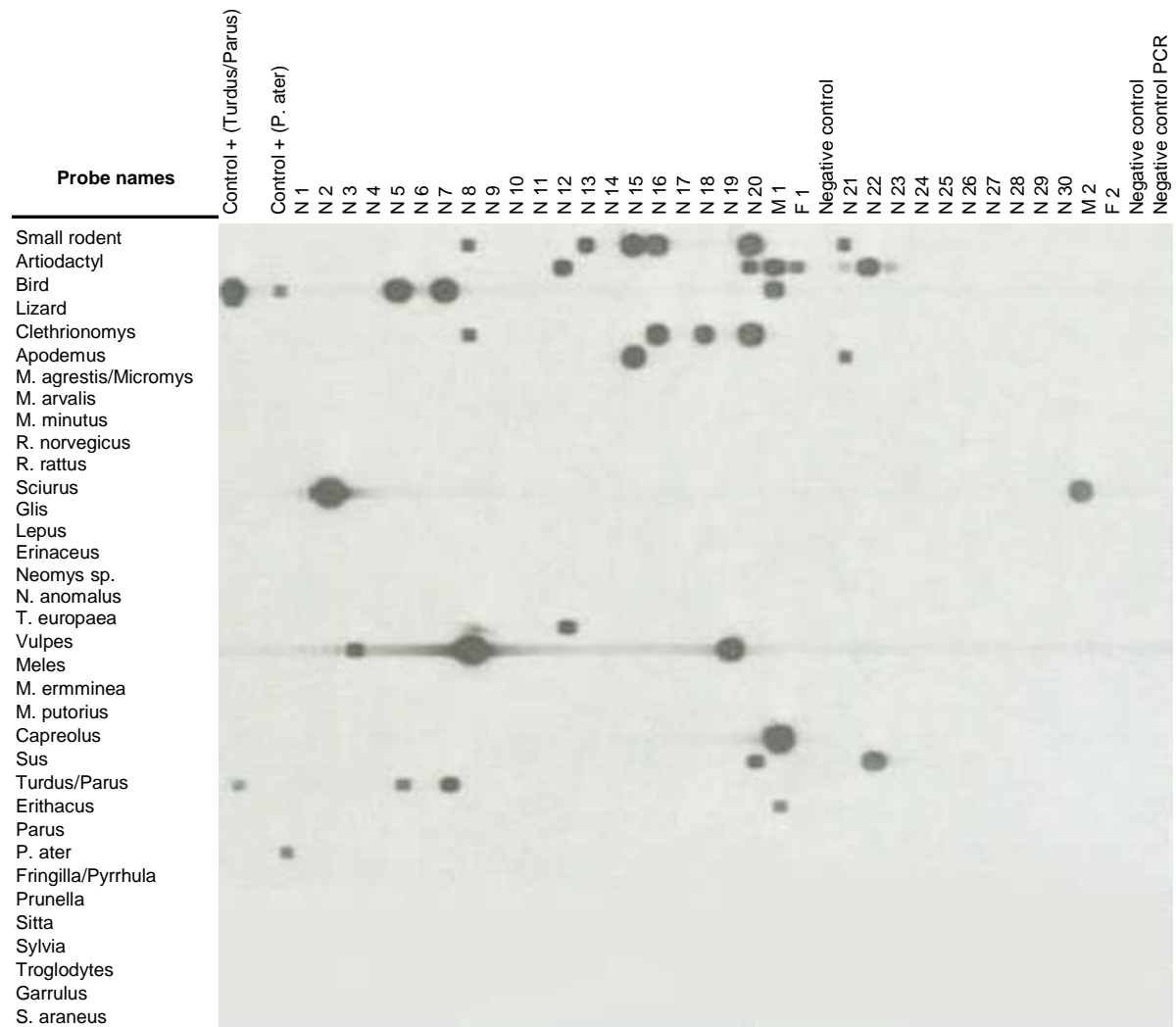
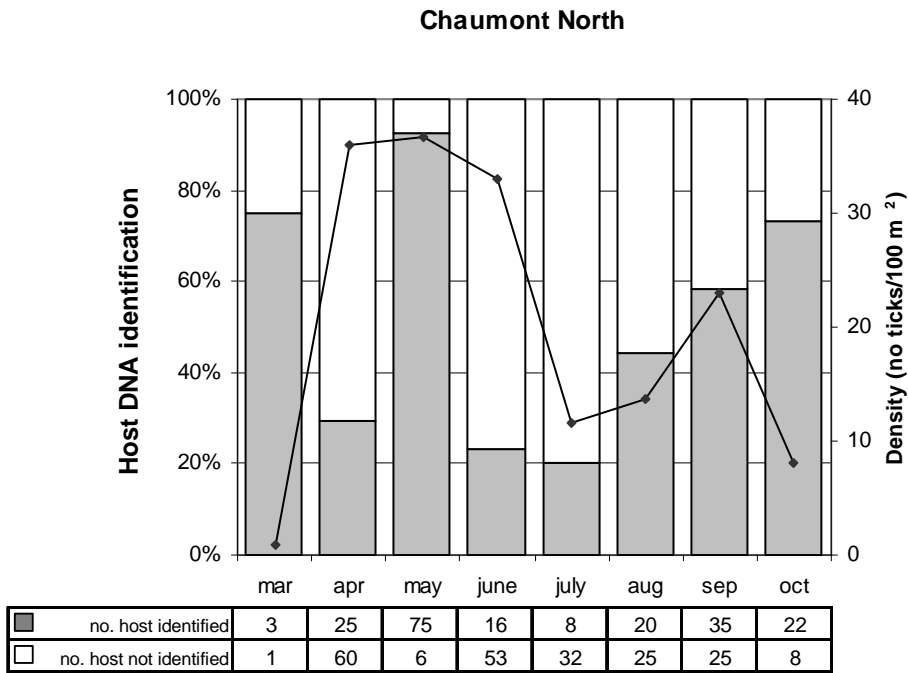


Fig. 2.

(A)



(B)

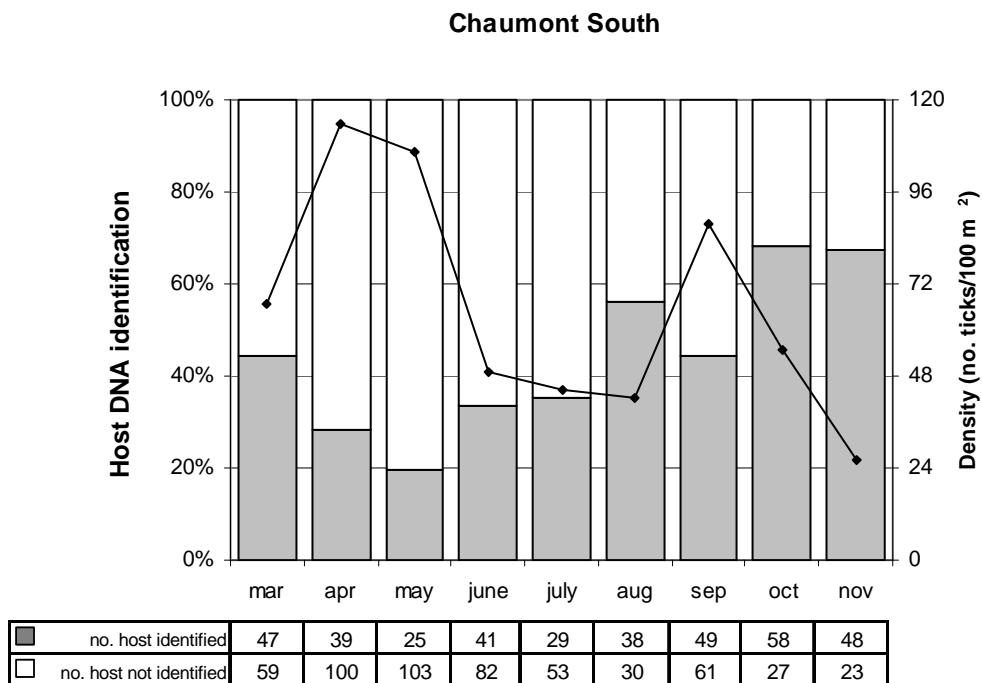
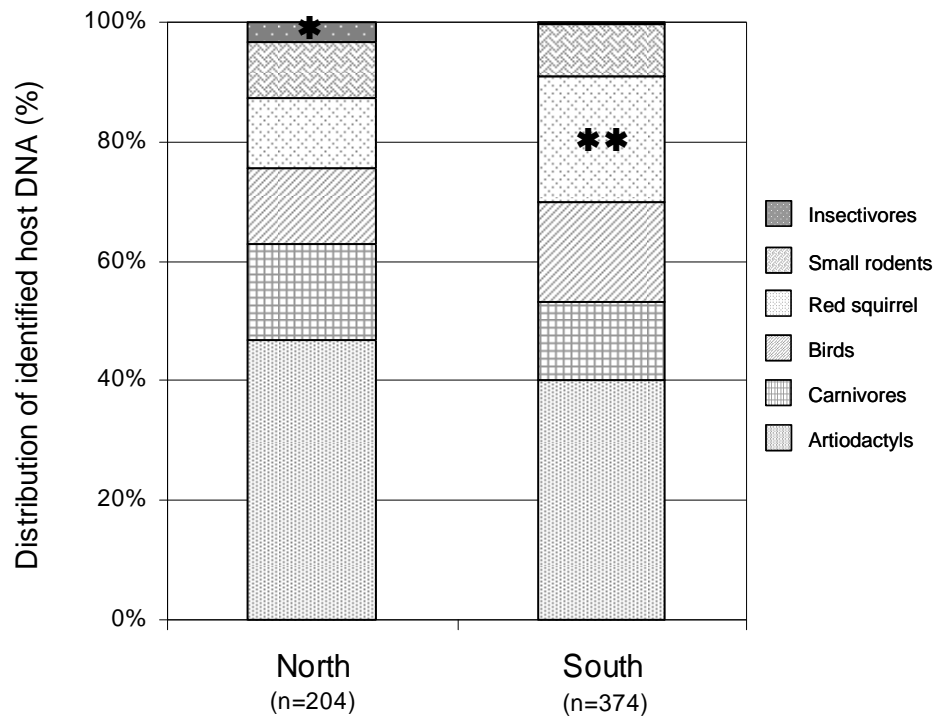


Fig. 3.



4.4 PUBLICATION 4

A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of
Borrelia burgdorferi sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks
using PCR and Reverse Line Blotting

Francisca Morán Cadenas¹, Hélène Schneider¹, Elena Lommano¹, Caroline Burri¹, Jacqueline Moret² and
Lise Gern¹

Vector-Borne and Zoonotic Diseases. *In press*.

¹Institut de Biologie, Laboratoire d'Éco-Épidémiologie des Parasites, Université de Neuchâtel, Suisse.

²Institut de Mathématiques, Université de Neuchâtel, Suisse.

A Comparison of Two DNA Extraction approaches in the Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* Ticks by PCR and Reverse Line Blotting.

Francisca Morán Cadenas¹, H el ene Schneider¹, Elena Lommano¹, Caroline Burri¹,
Jacqueline Moret² and Lise Gern^{1*}

Institute of Biology, Parasites Eco-Epidemiology Laboratory, University of Neuch atel,
Neuch atel, Switzerland¹

Institute of Mathematics, University of Neuch atel, Neuch atel, Switzerland²

Running title: Extraction method and *B. burgdorferi* DNA detection in ticks

Key words: *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, DNA extraction, infection prevalence

*Corresponding author:

Mailing address: Institute of Biology, Emile-Argand 11, 2009 Neuch atel, Switzerland

Phone number: ++41 32 718 3000

Fax number: ++41 32 718 3001

E-mail: lise.gern@unine.ch

ABSTRACT

We tested two approaches to extract *Borrelia* DNA from live *Ixodes ricinus* ticks before PCR and Reverse Line Blotting (RLB): DNA extraction of halved tick after incubation in BSK medium and DNA extraction of the other halved tick directly, using ammonium hydroxide. Among 2079 ticks, 31.2% (n=649) were found *Borrelia*-infected by PCR-RLB test using at least one of the DNA extraction methods. Five hundred four ticks (24.2%) were found infected after incubation in BSK and 481 (23.1%) after direct DNA extraction from the tick. The difference was not significant. However, these prevalences were significantly lower when only one method was applied (23.1% and 24.2%) compared to the prevalence obtained by the use of both methods (31.2%). In 313 infected ticks discordant results were obtained, i.e one half of the tick was found infected whereas the other half was found uninfected. Among these ticks, *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss were significantly more frequently identified in the half tick incubated in BSK. No significant differences were observed for *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. valaisiana* and for undetermined *Borrelia* species.

INTRODUCTION

In Europe, Lyme borreliosis spirochetes, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), are transmitted to hosts through the bites of infected *Ixodes ricinus* ticks (Gern and Humair 2002). At least seven *Borrelia* species have been reported from this tick in Europe: *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissettii* and *B. spielmanii* (Rauter and Hartung 2005, Richter *et al.* 2006).

Various methods are used to detect the presence of borreliae in ticks, *inter alia* immunofluorescence, dark-field microscopy, cultivation in Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) medium and Polymerase Chain Reaction (PCR). Culture of *B. burgdorferi* sl from ticks in BSK medium (Barbour *et al.* 1983) has been used intensively and successfully to isolate *Borrelia* from *I. ricinus*. However, cultivation is a fastidious and long method that requires work on sterile benches and the use of large quantities of BSK medium. This represents the main drawback when large sample sizes have to be processed. In addition, owing to the relatively low generation time of these spirochetes, the cultures must be incubated for several weeks before analysis. On the other hand, the main advantage of this procedure is the acquisition of *Borrelia* isolates from ticks.

PCR represents a sensitive and specific method to detect the presence of *Borrelia* DNA in ticks. A recent metaanalysis of prevalence of *B. burgdorferi* sl genospecies in *I. ricinus* ticks noted that the highest infection rates were detected almost exclusively with PCR (Rauter and Hartung 2005).

The efficiency of DNA extraction from ticks may be an important variable that can have an impact on the detection limits of PCR-based methods. Ticks have a hard chitinous exoskeleton and this can necessitate the use of particular steps for the

extraction of nucleic acids, including crushing of ticks, bisection, freezing or beating-beads followed by the extraction process using Chelex or phenol-chloroform and proteinase K, for example (Sparagano *et al.* 1999, Halos *et al.* 2004). These multiple steps prior to the direct chemical extraction complicate the procedure for pathogen detection in ticks. A simple DNA extraction method, using ammonium hydroxide (Guy and Stanek, 1991) is now frequently used to extract *Borrelia* DNA from *I. ricinus* ticks. In fact, in the metaanalysis of prevalence of *B. burgdorferi* s.l. in ticks in Europe (Rauter and Hartung 2005), this simple DNA extraction method is used in many reported papers.

In the present study, we tested two approaches to isolate *Borrelia* DNA from *I. ricinus* ticks before processing by PCR and Reverse Line Blotting (RLB) to identify the *Borrelia* species. Both approaches were used on each tick. The first approach was extraction of DNA after incubating one-half of a tick in BSK medium for 2 weeks (Sinsky and Piesman 1989). The second procedure was extraction of DNA directly from the other half-tick, by alkaline hydrolysis, using ammonium hydroxide (Guy and Stanek 1991, Rijpkema *et al.* 1996). This DNA extraction has the advantage to be rapid, simple and unexpensive. The aim of the evaluation of ammonium hydroxide extraction in comparison with isolation of borreliae, a method we intensively used in our laboratory, was to explore the possibility to switch from a fastidious extraction protocol (culture followed by extraction) to a simple extraction method commonly used before PCR and RLB.

MATERIAL AND METHODS

Ticks. *I. ricinus* ticks were collected by flagging vegetation with a 1m² flag in 4 geographic areas in Switzerland (Neuchâtel, Valais, Fribourg and Jura) in 2004 and

2005. All collection sites were located in mixed forests dominated by deciduous trees. Collected ticks were maintained in plastic vials containing a few blades of grass until they were analyzed for the presence of *Borrelia* infection.

***Borrelia burgdorferi* DNA extraction.** Each tick (nymph or adult) was soaked in ethanol, dried and cut longitudinally into halves. One half was used to extract *Borrelia* DNA using ammonium hydroxide (hereafter: direct extraction) (Guy and Stanek 1991, Rijpkema *et al.* 1996). Briefly, ticks were boiled for 15 min at 100°C in 100 µl of 0.7 M ammonium hydroxide in a heating block to free the DNA. The tube was then cooled to room temperature and left open for 15 min at 100°C to evaporate ammonia. The other half of each tick was placed in a culture tube containing 1.2 ml of BSK medium (hereafter: incubation) (Sinsky and Piesman 1989) and incubated at 34°C for 2 weeks to allow for potential *Borrelia* culturing. All cultures were washed twice in PBS/MgCl₂. The pellet was resuspended in 30 µl of pure H₂O and boiled for 15 min at 100°C in a heating block according to Postic *et al.* (1994). Negative controls were used for each extraction procedure from ticks to control for contamination in reagents, exposures to the laboratory environment and for cross-contamination between extracts, and negative controls were included in each PCR. For direct extractions, negative controls consisted in 100 µl of NH₄OH 0.7 M, and for incubation we used BSK medium placed at 34°C for 2 weeks and washed twice with PBS/MgCl₂.

PCR and RLB. The variable spacer region between two repeated genes encoding for ribosomal 23S and 5S units was amplified using primers B5S-Bor and 23S-Bor (Alekseev *et al.* 2001, Poupon *et al.* 2006, Schouls *et al.* 1999). DNA amplification was done in 50 µl reaction volumes containing 10 µl of BSK culture or 20 µl of direct extraction and was performed using a Whatman Biometra Tgradient Thermocycler 96

(Göttingen, Deutschland).

A touchdown PCR program was used: amplification was started by an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by denaturation at 94°C for 20 s, annealing at 60°C for 30 s, extension at 72°C for 30 s. Then during the subsequent cycles, the annealing temperature was lowered by 1°C per cycle until it reached 52°C. An additional 40 cycle step followed, consisting of 20 s at 94°C, 30 s at 52°C, and 30 s at 72°C. The PCR was ended by a final extension for 7 min at 72°C. PCR products were stored at 4°C until RLB analysis. Isolates of *B. burgdorferi* ss (B31), *B. garinii* (NE11), *B. lusitaniae* (PotiB1, PotiB2, PotiB3), *B. afzelii* (NE632) and *B. valaisiana* (VS116) were used as positive controls following their extraction by boiling (Postic *et al.* 1994).

RLB was performed as described in Alekseev *et al.* (2001) and Schouls *et al.* (1999). PCR products were hybridized to 7 different oligonucleotide probes (75 pmol) (Poupon *et al.* 2006) blotted in lines on an activated Biodyne C membrane (Pall Europe Ltd., Portsmouth, UK) using a Miniblotter 45 (Immunelect, Cambridge, MA). Hybridization was visualized by incubating the membrane with enhanced chemiluminescence detection liquid (Amersham Biosciences, Otelfingen, Switzerland) and by exposing the membrane to X-ray film (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Otelfingen, Switzerland).

Statistical analysis. All statistics were calculated with S-Plus[®] 7.0 for Windows. The Pearson's Chi-square test was used to compare infection prevalences obtained by each procedure, infection prevalences using only one method with the overall prevalence, and prevalences of mixed infections obtained by one or the other method. The Binomial test was used to compare the rates of infection by each *Borrelia* species relative to total of *Borrelia* infected ticks as well as to compare the

rates of each *Borrelia* species relative to total of ticks in which discordant results (one half infected vs the other half uninfected) were obtained. A p -value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

We first investigated if direct DNA extraction from ticks (direct extraction) or DNA extraction after incubation of the ticks in BSK medium for 2 weeks (incubation) influenced the detection of *Borrelia* by PCR/RLB. Among the 2079 ticks (1134 nymphs, 436 males and 509 females) examined for *Borrelia* by RLB, 31.2% ($n=649$) were found infected (Table 1). There was no difference between prevalences obtained by one procedure or the other (incubation: 24.2%; direct extraction: 23.1%) (Pearson's Chi-square test, $p=0.42$). However, the prevalences were significantly lower when only one method was applied compared to the overall prevalence obtained by the use of both DNA extraction approaches (incubation vs both: Pearson's Chi-square test, $p<0.0001$; direct extraction vs both: Pearson's Chi-square test, $p<0.0001$).

B. afzelii was the predominant species overall (46.4%), followed by *B. garinii* (26.0%), *B. valaisiana* (16.6%), *B. burgdorferi* ss (12.0%) and undetermined species (10.9%) (Table 1). Among the 649 infected ticks, 55 (8.5%) ticks had mixed infections. The most frequent association was *B. garinii* and *B. valaisiana* ($n=22$), followed by *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* ($n=16$), *B. afzelii* and *B. valaisiana* ($n=7$), *B. garinii* and *B. afzelii* ($n=5$), *B. burgdorferi* ss and *B. garinii* ($n=4$) and a triple infection with *B. garinii*, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* in one tick (detected after incubation). Mixed infections were detected in 33 (5.1%) and 35 (5.4%) of the 649

infected ticks after incubation and after direct extraction, respectively (Pearson's Chi-square test, $p=0.9$).

Among the 2079 tested ticks, 336 (16.2%) had discordant results. In 23 (1.1%) ticks, either the *Borrelia* species was different in each halved tick or could not be identified at the species level (Table 2). In 313 (15.1%) ticks, one halved tick was found infected and the other halved not: 168 ticks were found infected only by incubation and 145 after direct extraction. In a few ticks ($n=4$, 0.2%) *Borrelia* species differed in each half according to the extraction process used. In 1 tick, *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss was identified by incubation and direct extraction, respectively, in 2 ticks *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* and in 1 tick *B. burgdorferi* ss and *B. garinii*.

We then investigated the influence of tick incubation and direct extraction on the prevalence of the various *Borrelia* species. Considering all infected ticks ($n=649$), direct extraction favoured *B. afzelii* detection (Table 3a). In contrast, incubation favoured *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss. No significant difference was observed for *B. valaisiana* and for undetermined *Borrelia* species.

Considering in more detail the 313 infected ticks with discordant results, i.e the ticks found infected by one method and not by the other, *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss were significantly more frequently identified in the half tick incubated in BSK medium (Table 3b). No significant differences were observed for *B. afzelii*, *B. valaisiana* and undetermined *Borrelia* species.

DISCUSSION

The prevalence of *Borrelia* infection in *I. ricinus* ticks as well as the distribution of the various *Borrelia* species in ticks are very important factors to assess risk for Lyme borreliosis. In fact there is strong evidence that infections with the various

Borrelia species are correlated with various clinical manifestations (Balmelli and Piffaretti 1995, Péter *et al.* 1997, Ruzic-Sabljić *et al.* 2002, van Dam *et al.* 1993).

Borrelia transmission by *I. ricinus* ticks also depends on *Borrelia* species, for example *B. afzelii* is transmitted to the host earlier than *B. burgdorferi* ss (Crippa *et al.* 2002).

Currently PCR is the method of choice to detect *B. burgdorferi* sl in ticks and in most studies DNA is extracted directly from ticks. Here, we evaluated the influence of two approaches for DNA extraction on the sensitivity and specificity of the RLB.

The overall prevalence obtained in the 2079 analyzed ticks (31.2%) by the use of both methods was higher than the overall mean infection rate described for Europe (13.6%) (Rauter and Hartung 2005) but this infection rate is in line with previous reports from Switzerland (between 5% and 47.5%) (Aeschlimann *et al.* 1986, Casati *et al.* 2004, Jouda *et al.* 2003, 2004a, 2004b, Péter *et al.* 1995). Similarly, the ratios of the *Borrelia* species detected in our ticks are consistent with the overall ratio described for Europe, with the exception that *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss seem to be less frequent (26.0% in this study vs 33%, and 12.0% in this study vs 18.0% in Rauter and Hartung 2005, respectively). *B. afzelii* was clearly the predominant species (46.4%), followed by *B. garinii* (26.0%). *B. lusitaniae* was detected in one tick. Mixed infections with 2 or 3 *Borrelia* genospecies were more frequently reported in *I. ricinus* ticks with a mean percentage of 13% for Europe (Rauter and Hartung 2005) than in our study (8.5%).

Overall the infection prevalence was not different when *Borrelia* DNA was directly isolated from ticks using ammonium hydroxide (23.1%) compared to previous incubation of the tick in modified BSK medium (24.2%). However, if only one extraction method is considered, the obtained prevalences are significantly lower (23.1% and 24.2%) than when both methods (31.2%) are considered. Interestingly,

when we investigated the influence of tick incubation in BSK medium and direct extraction on the *Borrelia* species, we observed that *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss were favoured by incubation of the tick in BSK medium, whereas *B. afzelii* was favoured when DNA was directly extracted from the tick. No difference between methods was observed for *B. valaisiana* and for *Borrelia* species untypeable by RLB. In very rare cases (n=4), we identified 2 different *Borrelia* species in each half tick. So this discrepancy between *Borrelia* species in the two halves of the ticks does not seem to be responsible for the more frequent detection of *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss in the part of the tick that has been incubated.

However, in almost half of the infected ticks (313/649) we had discordant results, half of the tick being infected whereas the other half was not. If one considers these particular ticks, *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss are more often identified in the half tick that had been incubated. One explanation for this could be that some subtypes of these *Borrelia* species better grow in BSK medium or that ammonium hydroxide does not allow DNA extraction of these *Borrelia* subtypes for any reason. Sequencing could partly answer this question. All this seems to indicate that both methods are complementary. However, another possibility would be that extracting DNA from the two halves is better than from one half. Identical results obtained from both halves of ticks applying the same extraction approach to both halves would then allow to exclude this possibility, but would not allow to explain differences due to genospecies.

Mixed infections in vertebrate tissues and ticks have seemed more frequent in studies using PCR and direct DNA extraction than in those culturing bacteria from samples (Misonne *et al.* 1998, Rauter and Hartung 2005). We did not observe any difference in mixed infection prevalences using one or the other extraction procedure.

The discrepancy between both methods reported previously was explained either by false positive results of PCR or by an overgrowth of one species over the other in culture (Ruzic-Sabljić *et al.* 2005). Such an overgrowth was not observed here given that similar prevalences of mixed infections were detected in ticks when they were incubated in BSK medium and when direct extraction was applied. Moreover, the only triple infection was detected in a half tick incubated in BSK medium.

The most interesting results in this study are that even if the overall infection prevalence is the same for the DNA extraction approaches individually, the use of one extraction protocol or the other produced divergent data concerning the detection of the infection in 16.2% of tested ticks. Divergence was mainly observed among infected ticks since almost 50% of them were found infected by only one DNA extraction method. This was related to *Borrelia* species. In fact, *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss were less often evidenced in the half tick subjected to direct extraction. Previous studies reported that *Borrelia* prevalences and distribution in ticks may vary depending on the detection method used as for example immunofluorescence compared to *Borrelia* isolation followed by PCR (Gern *et al.* 1999) or immunofluorescence compared to nested or simple PCR (Kahl *et al.* 1998, Kampen *et al.* 2004). Here we show that the DNA extraction method applied prior to PCR may also influence in these parameters. According to these results, although it is clear that using one extraction approach or the other create some bias, direct extraction appears as more rapid, easier and less expensive than cultivation. Another advantage of this method is that, DNA extract from the same tick can be used for other analysis as for example other pathogens, or for tick host DNA identification.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was partially supported by the Swiss National Science Foundation (No 3200B0-100657). We warmly thank O. Rais and V. Douet for their precious help. This study is part of the PhD thesis from one of the authors (FMC).

REFERENCES

- Aeschlimann, A, Chamot, E, Gigon, F, Jeanneret, JP, et al. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zbl Bakt Hyg A 1986; 263: 450-458.
- Alekseev, AN, Dubinina, HV, Semenov, Van de Pol, I, Schouls, LM. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. J Clin Microbiol 2001; 39: 2237-2242.
- Balmelli, T, Piffaretti, JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res Microbiol 1995; 146: 329-340.
- Barbour, AG, Burgdorfer, W, Hayes, SF, Péter, O, et al. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. Curr Microbiol 1983; 8: 123-126.
- Casati, S, Bernasconi, MV, Gern, L, Piffaretti, JC. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. FEMS Microbiol Lett 2004; 238: 115-123.
- Crippa, M, Rais, O, Gern, L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. Vector Borne Zoonotic Dis 2002; 2: 3-9.

- Gern, L, Hu, CM, Kocianova, E, Vyrostekova, V, et al. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. Eur J Epidemiol 1999; 15: 665-669.
- Gern, L, Humair, PF. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: Gray, J, Kahl, O, Lane, RS, Stanek, G, eds. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom; 2002: 149-174.
- Guy, EC, Stanek, G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol 1991; 44: 610- 611.
- Halos, L, Jamal, T, Vial, L, Maillard, R, et al. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. Vet Res 2004; 35: 709-713.
- Jouda, F, Crippa, M, Perret, JL, Gern, L. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of Canton Ticino (Switzerland). Eur J Epidemiol 2003; 18: 907-912.
- Jouda, F, Perret, JL, Gern, L. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. J Med Entomol 2004a; 41: 162-169.
- Jouda, F, Perret, JL, Gern, L. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. Vector Borne Zoonotic Dis 2004b; 4: 23-32.
- Kahl, O, Gern, L, Gray, JS, Guy, EC et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks: immunofluorescence assay versus polymerase chain reaction. Zentralbl Bakteriologie 1998; 287: 205-210.
- Kampen, H, Rötzel, DC, Kurtenbach, K, Maier, WA, et al. Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of Western Germany

- over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1576-1582.
- Misonne, MC, van Impe, G, Hoet, PP. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3352-3354.
- Péter, O, Bretz, AG, Bee, D. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. *Eur J Epidemiol* 1995; 11: 463-467.
- Péter, O, Bretz, AG, Postic, D, Dayer, E. Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 423-431.
- 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.
- Poupon, MA, Lommano, E, Humair, PF, Douet, V, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 976-979.
- Rauter, C, Hartung, T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7203-7216.
- Richter, D, Postic, D, Sertour, N, Livey, I. et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 873-881.
- Rijpkema, S, Golubic, D, Molkenboer, M, Verbeek De Kruif, N, et al. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks

- collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol* 1996; 20: 23–30.
- Ruzic-Sabljić, E, Maraspin, V, Lotric-Furlan, S, Jurca, T, et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114: 544-550.
- Ruzic-Sabljić, E, Arnez M, Logar M, Maraspin V, et al. Comparison of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from specimens obtained simultaneously from two different sites of infection in individual patients. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 2194-2200.
- Schouls, LM, Van de Pol, I, Rijpkema, SGT, Schot, CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2215-2222.
- Sinsky, RJ, Piesman, J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1723-1727.
- Sparagano, OAE, Allsopp, MTEP, Mank, RA, Rijpkema, SGT, et al. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 929-960.
- van Dam, AP, Kuiper, H, Vos, K, Widjojokusumo, A, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 708-717.

Reprint address:

Institute of Biology, rue Emile-Argand 11, CP 158, 2009 Neuchâtel, Switzerland.

lise.gern@unine.ch

DNA Extraction Method	<i>Borrelia</i> - infected ticks	<i>Borrelia</i> genospecies identification ^a (%) ^b				
		<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Untypeable <i>Borrelia</i>
Incubation	504 (24.2) ^c	202 (31.1)	146 (22.5)	75 (11.6)	71 (10.9)	43 (6.6)
Direct extraction	481 (23.1) ^c	233 (35.9)	111 (17.1)	79 (12.2)	51 (7.9)	42 (6.5)
Incubation & Direct extraction	649 (31.2) ^c	301 (46.4)	169 (26.0)	108 (16.6)	78 (12.0)	71 (10.9)

Table 1 Distribution of genospecies of *B. burgdorferi* sI and infection rates in *I. ricinus* questing ticks according to the DNA extraction method applied to each half tick.

^a All mixed infections were considered separately and added to the appropriate single *Borrelia* species.

^b Calculated on the total number of *Borrelia* infected ticks whatever the method used for DNA extraction (n=649).

^c Percentage calculated on the total number of analyzed ticks (n=2079).

DNA extraction method applied in each tick		Analyzed ticks	
Incubation	Direct extraction	no.	%
<i>Borrelia</i> sp A	<i>Borrelia</i> sp A	313	15.0
<i>Borrelia</i> sp A	<i>Borrelia</i> sp B	4	0.2
<i>Borrelia</i> sp A	untypeable	8	0.4
untypeable	<i>Borrelia</i> sp A	11	0.5
<i>Borrelia</i> sp	-	168	8.1
-	<i>Borrelia</i> sp	145	7.0
-	-	1430	68.8
	Total	2079	100

Table 2 Details of *Borrelia* detection and identification in each half *I. ricinus* tick according to extraction method used.

Borrelia sp A, sp B: any *Borrelia* species belonging to *B. burgdorferi* sensu lato.

A)

Genospecies	Incubation + / Direct extraction +	Incubation + / Direct extraction -	Incubation - / Direct extraction +	Binomial test <i>p</i> -value
<i>AF</i>	134	68	99	0.0200
<i>GA</i>	88	58	23	0.0001
<i>VS</i>	46	29	33	0.7035
<i>SS</i>	44	27	7	0.0008
<i>SL</i>	14	29	28	1.0000

B)

Genospecies	Incubation + / Direct extraction +	Incubation + / Direct extraction -	Incubation - / Direct extraction +	Binomial test <i>p</i> -value
<i>AF</i>	0	65	82	0.1868
<i>GA</i>	0	52	17	< 0.0001
<i>VS</i>	0	27	28	0.1742
<i>SS</i>	0	22	6	0.0037
<i>SL</i>	0	18	20	0.8714

Table 3 Details on the *Borrelia* species identified in each half-tick according to the extraction methods a) for all infected ticks (n=649) b) for ticks with discordant results (one half infected vs the other one half uninfected) (n=313, direct extraction n= 145, incubation n= 168).

AF: *B. afzelii*; *GA*: *B. garinii*; *SS*: *B. burgdorferi* ss; *VS*: *B. valaisiana*; *SL*: untypeable *Borrelia*.

5 DISCUSSION

I. ricinus est la tique la plus répandue en Europe et le principal vecteur de l'agent de la maladie de Lyme. Cette zoonose est largement répandue dans l'hémisphère nord et est accidentellement transmise à l'homme via la piqûre des tiques infectées par la bactérie *B. burgdorferi* sl. Le cycle de *Borrelia* sp dans la nature est maintenu par la circulation du pathogène entre son vecteur, la tique, et une grande variété d'hôtes réservoirs. Ce cycle est déterminé par des facteurs spécifiques liés aux populations de tiques et aux hôtes. L'étude des interactions entre pathogène – vecteur – hôte est nécessaire pour une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la borréliose de Lyme dans le but d'établir le risque d'infection dans une région.

L'épidémiologie de la borréliose de Lyme dépend des contacts que la population a avec une zone à risque et dépend en partie de l'écologie du vecteur responsable de la maladie, de sa distribution temporelle et spatiale et aussi de l'influence du climat dans son cycle de vie. *I. ricinus* présente une large distribution géographique en Europe. Cette espèce se rencontre de la Scandinavie jusqu'en Afrique du Nord et des côtes atlantiques portugaises au centre de la Russie (Lindgren *et al* 2000; Gern et Humair 2002). Cette large distribution implique des conditions climatiques très hétérogènes qui vont avoir des effets différents sur les populations de tiques. À l'intérieur de cette vaste répartition, les tiques ne sont présentes que dans certains biotopes où les facteurs biotiques et abiotiques sont favorables pour leur établissement. Ainsi, des adaptations comportementales sont possibles à une échelle locale pour permettre la survie de ces populations dans un habitat bien défini. La dynamique saisonnière des populations sera donc très variable géographiquement (Korenberg 2000) et temporellement (Mermod *et al* 1973; Gray 1984; Tälleklint et Jaenson 1996; Perret *et al* 2000; Randolph *et al* 2002; Jouda *et al* 2004a,b). L'activité saisonnière de quête chez *I. ricinus* peut être continue du printemps à l'automne (Gray 1991); présenter une distribution unimodale, avec un pic de printemps (Mermod *et al* 1973; Perret *et al* 2000; Jouda *et al* 2004a,b) ou d'hiver (Yousfi-Monod et Aeschlimann 1986); et montrer aussi une distribution bimodale (Aeschlimann 1972; Mermod *et al* 1973,1974; Gray 1984; Mejlou et Jaenson 1993; Korenberg 2000).

Divers facteurs sont proposés pour expliquer les variations saisonnières des populations de tiques: le type de végétation (Doche *et al* 1993; Mejlou et Jaenson 1993,1997; Rizzoli *et al* 2002; Hubálek *et al* 2006), l'altitude (Rizzoli *et al* 2002; Jouda *et al* 2004a), la capacité hydrique du sol (Jensen *et al* 2000), le climat (Schulze et Jordan 1996; Randolph *et al* 2002; Perret *et al* 2004), des facteurs biotiques tels que la densité des hôtes (Jaenson et Tälleklint 1992,1996; Tälleklint et Jaenson 1994, 1995 ; Schulze et Jordan 1996; Jensen *et al* 2000; Rizzoli *et al* 2002; Perkins *et al* 2006) et même la production des glands (Ostfeld *et al* 2001; Schaubert *et al* 2005). L'influence du climat dans le cycle de vie et la dynamique des populations de tiques est très marquée. Le développement des tiques dépend, par exemple, de la température (Macleod 1934; Campbell 1948, cité dans Randolph *et al* 2002). Nous nous sommes donc intéressée aux conséquences du réchauffement climatique sur la l'activité saisonnière des tiques en Europe, plus particulièrement en Suisse. Des températures élevées en hiver pourraient favoriser un début précoce de l'activité au printemps. Puisque la durée du

développement chez *I. ricinus* est inversement proportionnelle à la température, une température un peu plus élevée à la fin du printemps pourrait accélérer le développement interstadial des tiques gorgées au printemps en contribuant à l'éclosion du stade suivant l'automne de la même année (Chmela 1969; Randolph *et al* 2002; Perret 2003). Des températures basses en été entraînent un retard du développement et l'absence d'un pic en automne, comme cela a été montré au Royaume-Uni (Randolph *et al* 2002) et en Suisse (Perret *et al* 2003).

La survie des tiques est déterminée par leurs réserves énergétiques disponibles après chaque mue (ou après l'éclosion pour les larves). Ces réserves sont utilisées pour les activités physiologiques et les déplacements des tiques et donc elles s'épuisent progressivement au cours du temps. Les tiques requièrent une balance hydrique favorable pour survivre à la dessiccation au cours de leur activité de quête. Elles abandonnent alors la quête pour se rendre au sol où elles se réhydratent pendant le repos dans une atmosphère saturée d'eau. Température et humidité relative ainsi que le DS, variable qui intègre ces deux paramètres, sont des facteurs limitant l'activité de quête des tiques. Des expériences réalisées au laboratoire avec un système de vidéosurveillance et en absence de stimuli des hôtes ont montré que la durée de l'activité de quête des tiques est inversement proportionnelle au DS (Perret *et al* 2003).

Ce comportement observé au laboratoire a aussi été décrit dans des conditions naturelles. En effet, divers auteurs ont montré comment le climat influence le comportement des tiques en quête (Perret *et al* 2000,2004; Randolph *et al* 2002) et aussi la proportion des tiques en quête (Perret *et al* 2000,2004). Sous nos latitudes, la densité de tiques en quête diminue en général (avec le temps) au cours de l'année. Cette diminution peut être le résultat de diverses circonstances: une augmentation de la proportion des tiques au repos, une augmentation de la quantité de tiques fixées sur les hôtes ou une augmentation de la mortalité. Perret *et al* (2000) ont observé une diminution de la densité de tiques en quête associée aux pics du DS ou à une diminution de l'humidité relative. En plaçant des tiques dans des arènes installées dans la nature, Perret *et al* (2004), ont montré que la proportion des nymphes en quête diminuait avec le temps et que cette diminution correspondait à des pics de DS. Les nymphes ne reprenant pas l'activité de quête après ces événements climatiques, les auteurs conclurent que les nymphes étaient mortes. Ceci n'a pas été observé avec les adultes, qui semblent être plus résistants à la dessiccation grâce à leur taille, aux réserves énergétiques supérieures aux nymphes et au contenu en eau supérieur à celui des nymphes. Des épisodes extraordinairement chauds alors que l'activité de quête est importante pourraient réduire la durée de cette activité, augmenter la mortalité des tiques avec comme conséquence une diminution de l'ensemble de la population (Perret *et al* 2003,2004).

Les conditions climatiques interviennent également dans la distribution géographique des tiques. En Suède, Lindgren *et al* (2000) attribuent l'augmentation de la densité d'*I. ricinus* aux hivers relativement doux survenus dans les années 90, qui ont permis de prolonger la durée de la saison des tiques et d'augmenter leur taux de survie. Tälleklint et Jaenson (1998) ont montré également une expansion de la distribution des tiques vers le nord et l'ouest du pays. Il peut également y avoir des changements dans la distribution des tiques à des altitudes plus élevées. D'après Daniel (1993), l'établissement et le

développement des tiques sont limités par de basses températures en altitude. Concrètement en République Tchèque, Daniel *et al* (2003), Materna *et al* (2005) et Danielová *et al* (2006) confirment une extension de la distribution d'*I. ricinus* (ainsi que de celle des maladies transmises) en altitude durant la dernière décennie, au-dessus du seuil d'établissement observé auparavant. Cette extension est probablement associée à l'augmentation de la température en altitude, atteignant des valeurs favorables pour le développement des tiques. Dans différentes localités des Alpes italiennes, Rizzoli *et al* (2002) observent des densités de tiques plus abondantes en dessous de 1300 m d'altitude, en relation sans doute avec des températures plus douces.

L'étude des populations de tiques à différentes altitudes nous apportent des données intéressantes dans le contexte du changement climatique. Une augmentation de la température peut avoir des répercussions différentes sur les populations établies aux différentes altitudes. Ces modifications intervenant dans les populations de tiques peuvent être suivies en relation avec le changement climatique (augmentation de la température). Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressée à des populations de tiques établies à différentes altitudes dans 3 sites de Suisse romande. Nous avons suivi l'évolution des populations de tiques en quête le long d'un gradient d'altitude sur le versant sud de Chaumont (NE) à partir des travaux entrepris de 1999 à 2001 par Jouda *et al* (2004a). Nous avons investigué l'influence de l'exposition de la montagne sur la densité et la distribution d'*I. ricinus*, en considérant un deuxième gradient à Chaumont avec orientation nord. Le troisième site d'étude se trouve dans la région de Salins, près de Sion (VS), le long d'un gradient d'altitude avec exposition nord, mais dans une des régions les plus chaudes du pays.

En Suisse, quelques auteurs ont étudié la distribution des tiques en altitude. En général *I. ricinus* est abondante sur le Plateau suisse (altitude moyenne 600 m), mais rare entre 1000 et 1500 m (Aeschlimann 1972; Aeschlimann *et al* 1986), où seul certains biotopes avec un microclimat favorable hébergent des tiques. Kaltenrieder *et al* (1985) récoltent des tiques dans différents biotopes mais jamais au-dessus de 900 m. Cotty *et al* (1986) fixent la limite supérieure de distribution pour *I. ricinus* à 1450 m (en Valais). Au Tessin, certains sites en altitude ont été aussi examinés par Miserez *et al* (1990), Zhioua *et al* (1994) et Jouda *et al* (2003), avec un maximum de récolte de tiques décrit à 980 m. Des populations établies jusqu'à 900 m sont signalées sur le Plateau suisse et dans certaines localités alpines (Jouda *et al* 2004a,b).

Dans notre travail en Valais le long d'un gradient orienté au nord (Burri *et al* 2007), une densité plus élevée de tiques en quête est observée à 1020 m qu'aux altitudes plus basses. Bien que cette situation paraisse atypique, il s'agit d'une région très sèche et chaude où probablement les tiques souffrent énormément des conditions desséchantes à basse altitude, et par contre trouvent des conditions plus favorables pour leur développement au-dessus de 1000 m. Le long du gradient d'altitude dans le versant nord de Chaumont (Morán Cadenas *et al* 2007), la densité de tiques montre une tendance claire à augmenter avec l'altitude, atteignant aussi sa valeur maximale au dessus de 1000 m. Dans ce cas, par contre, il n'y a pas de corrélation entre les variables climatiques et l'altitude qui nous permettraient d'expliquer les différences de densité entre le bas et le haut du gradient. À Neuchâtel, les températures mesurées pendant la dernière décennie dépassent la température

annuelle moyenne calculée pour le siècle passé (Baniewicz 2002), ce qui pourrait favoriser l'établissement de tiques en altitude. Effectivement, si on compare les données de densité de tiques à 900 m (valeurs de CTD) pour le gradient sud de Chaumont au cours du temps, nous avons constaté une augmentation de la densité de nymphes et adultes de 2.25 et 3.5 fois, respectivement, dans notre étude (Morán Cadenas *et al* 2007) par rapport à la période 1999-2001 (Jouda *et al* 2004a). Cette augmentation est probablement liée aux changements de température en altitude.

Le climat a aussi un effet sur l'évolution saisonnière de la population de tiques en quête. Sur le flanc sud de Chaumont, nous constatons une distribution unimodale de l'activité de quête de tiques en 2003. Des valeurs du DS au-dessus de 10 mmHg ont été mesurées à partir de juin et ont persisté quelques mois. Un DS élevé provoque un stress hydrique chez les tiques (surtout chez les nymphes) qui abandonnent leur activité de quête pour aller se réhydrater près du sol. L'augmentation de déplacements chez la tique lors de conditions très desséchantes peut diminuer ou épuiser ses réserves énergétiques, ce qui conduit à une augmentation de la mortalité (Randolph et Storey 1999; Perret *et al* 2003,2004). La canicule qui a sévi en 2003 dans la plupart des pays d'Europe, particulièrement dans l'ouest de la Suisse (Rebetez *et al* 2006), associée à des DSs élevés et de longue durée, ont probablement empêché le développement d'un pic d'automne.

La dynamique des tiques en quête en 2005 suit en général une distribution bimodale. Sur le versant sud de Chaumont, nous remarquons un pic de printemps et d'automne de magnitude similaire sur tout le gradient sauf à 1070 m. Le pic de printemps faible est probablement dû aux valeurs du DS supérieures à 10 mmHg présents déjà au début du printemps jusqu'en juillet-août plutôt qu'à un hiver 2004-2005 très rude, avec des températures très basses et une couche de neige persistant sur le terrain. L'apparition du pic d'automne peut s'expliquer par un développement rapide des tiques gorgées au printemps ainsi que par la réactivation des nymphes du printemps ayant été incapables de trouver un hôte auparavant. Ce pic d'automne coïncide avec une diminution importante du DS. Une situation similaire a été décrite par Perret *et al* (2000) dans une région très proche de la même forêt en 1998.

L'événement le plus remarquable pour le gradient nord de Chaumont est la présence en 2004 d'un pic de printemps considérable à 1010 m. La série d'observations pour ce terrain a débuté seulement quelque mois auparavant (septembre 2003). Nous pouvons évoquer ici la possibilité que cette population de tiques établie au-dessus de 1000 m ait pu profiter des températures favorables, à cette altitude, pour son développement dues à la canicule 2003. D'un autre côté, nous ne connaissons pas l'influence de ces conditions thermiques extraordinaires sur le comportement des populations d'hôtes, ce qui peut interagir sur l'augmentation de la densité de tiques. Le déplacement en altitude de certains vertébrés à la recherche de fraîcheur pourrait avoir augmenté la proportion de tiques qui ont trouvé un hôte et qui ont pu ensuite se nourrir et quêter à nouveau quelques mois plus tard.

Le début de l'activité des nymphes au printemps (O10N) est retardé en fonction de l'altitude sur le versant sud de la montagne, comme déjà signalé dans l'étude réalisée par Jouda *et al* (2004a). Ce retard n'a pas été remarqué en altitude sur le versant nord de Chaumont.

L'étude à long terme de la phénologie de tiques sur le gradient sud de Chaumont entre 1999-2001 et 2003-2005 nous montre que le contexte climatique qui accompagne ces deux périodes se caractérise par des étés et des automnes plus chauds ainsi que des hivers et des printemps légèrement plus froids pendant la période 2003-2005. L'activité saisonnière des tiques en quête à 900 m présente une importante variabilité dans notre travail, contrairement à ce qui était la tendance auparavant, avec une activité stable au cours des saisons. D'après Jouda *et al* (2004a), une phénologie instable pourrait apparaître en altitude sous l'influence de températures plus douces. Dans notre travail, nous avons constaté une augmentation de la température estivale en altitude ces dernières années, atteignant des valeurs équivalentes à celles mesurées à 620 m pendant l'étude précédente. Ces températures, favorables pour le développement des tiques, peuvent être à l'origine de l'augmentation de la densité des nymphes et des adultes en altitude. En basse altitude, par contre, les valeurs de CTD pour les nymphes ne varient pas entre les deux études tandis que celle des adultes sont plus faibles pour la période 2003-2005. Des températures et des DS trop élevés à 620 m ont eu un impact négatif sur la population des tiques qui a souffert du stress hydrique provoqué par des DS élevés et de longue durée. La survie des tiques pourrait avoir été compromise à cette altitude, entraînant la mort principalement des nymphes, moins résistantes que les adultes à la dessiccation (Perret *et al* 2004). Une population de nymphes ayant été soumise à un stress si important en 2003 pourrait expliquer la faible densité d'adultes en quête les années suivantes. Un phénomène similaire est observé en Valais en basse altitude (Burri *et al* 2007). Les tiques en quête sont peu abondantes à 750 et 880 m, où les conditions climatiques sont très particulières (des températures supérieures à 20°C sur de longues périodes et des précipitations faibles), avec des valeurs du DS dépassant les 10 mmHg dès avril-mai jusqu'en octobre. La durée de l'activité de quête (spécialement pour les nymphes) est réduite à cause du stress hydrique et les populations de tiques pourraient atteindre à ces altitudes la limite pour leur établissement. Aucune tique n'a pu être récoltée dans un site proche (643 m), où une moyenne annuelle du DS supérieur à 11 mmHg a été observée (Burri 2005). Se pose donc la question de savoir si les conditions climatiques observées à 620 m à Neuchâtel ne tendent pas à devenir également limites pour le maintien de la population des tiques si de telles conditions climatiques persistent.

B. burgdorferi est pratiquement présente dans toutes les populations d'*I. ricinus* examinées jusqu'à présent dans divers pays européens (Hubálek et Halouzka 1998; Rauter et Hartung 2005) et aussi en Suisse (Miserez *et al* 1990; Péter *et al* 1995; Jouda *et al* 2003,2004a,b). De ce fait, le risque d'infection humaine existe pratiquement dans tous les biotopes où *I. ricinus* est présente. Le cycle de *Borrelia* est maintenu par un grand éventail d'hôtes qui possèdent une capacité différente de transmettre le pathogène à la tique dus principalement à une association existante entre certaines espèces d'hôtes et les espèces de *Borrelia* (Piesman et Gern 2004). Ainsi, la prévalence d'infection chez *I. ricinus* montre une grande variabilité géographique liée, entre autres, à la distribution et à la densité des hôtes (spécialement des hôtes réservoirs) présents dans chaque région (Mejlon et Jaenson 1993; Tälleklint et Jaenson 1993,1994; Jensen 2000). Parallèlement à l'évaluation de la phénologie et de la densité des tiques en quête dans nos régions d'étude, nous avons examiné la prévalence d'infection par les borrelies chez les tiques ainsi que la distribution des génoespèces.

D'après Rauter et Hartung (2005), qui ont synthétisé des données sur l'infection d'*I. ricinus* dans 24 pays européens entre 1984 et 2003, la prévalence d'infection moyenne en Europe est de 13.6% (10.1% pour les nymphes et 18.6% pour les adultes), avec une plus grande prévalence dans les pays d'Europe centrale. Or les valeurs d'infection rapportées par ces auteurs pour la Suisse, variant de 10.9% à 49%, sont généralement supérieures à la moyenne. Dans notre travail en Valais et à Neuchâtel, les valeurs d'infection par borrelies sont supérieures à la moyenne proposée pour l'ensemble de l'Europe. À Chaumont, la prévalence moyenne de *B. burgdorferi* sl dans les tiques analysées en 2003-2005 est de 22% (689/3115), tous stades, années et lieux de récolte confondus, alors qu'en Valais elle est de 35% (68/195). Ces données correspondent aux valeurs décrites dans les travaux précédents réalisés en Suisse (Aeschlimann *et al* 1986; Péter *et al* 1995; Jouda *et al* 2003,2004a,b; Casati *et al* 2004). D'autre part, nous avons constaté une variabilité annuelle, géographique et altitudinale considérable. Ainsi à Neuchâtel, la prévalence d'infection est de 19% en 2003 et 2005, atteignant le maximum en 2004 avec 26% d'infection. Un taux d'infection élevé est obtenu aussi en Valais la même année. Considérant la relation entre l'infection et le gradient altitudinal, l'infection par borrelies diminue en général avec l'altitude, confirmant les résultats obtenus auparavant par d'autres auteurs (Aeschlimann 1972; Kaltenrieder *et al* 1985; Aeschlimann *et al* 1986; Jouda *et al* 2003,2004a), à l'exception du gradient nord de Chaumont où l'infection maximale se présente dans le site de récolte le plus élevé. Dans ce même site, à 1010 m d'altitude, nous avons déjà signalé une circonstance particulière, la densité des tiques étant supérieure aux autres stations plus basses. Les conditions mésoclimatiques à cette altitude sont favorables au développement des tiques qui y trouvent, sans doute, une population d'hôtes appropriée pour leur repas sanguin et pour l'infection par *B. burgdorferi* sl.

Pour les deux gradients à Neuchâtel, nous n'avons pas trouvé de différences significatives d'infection entre nymphes et adultes, alors qu'en Valais, la prévalence d'infection des adultes (47%) est statistiquement supérieure à celle des nymphes (27%). Bien que les adultes ont eu plus de chances que les nymphes d'acquérir l'infection avec un repas additionnel, des cas où l'infection des nymphes est équivalente ou supérieure à celle des adultes sont couramment décrits dans la littérature, comme par exemple, en Suisse (Caflisch *et al* 1984; Miserez *et al* 1990; Péter 1990; Jouda *et al* 2003), en France (Zhioua *et al* 1996; Quessada *et al* 2003), en Allemagne (Matuschka *et al* 1992), en République Tchèque (Hubálek *et al* 1991), au Danemark (Landbo et Flong 1992) ou en Hollande (Rijkema *et al* 1994,1995). Une faible infection chez les adultes pourrait être expliquée par le choix de l'hôte des nymphes, lesquelles pourraient avoir perdu leur infection si elles se sont nourries sur certains vertébrés. Cela pourrait être le cas d'un repas pris sur un cervidé, considéré traditionnellement comme un hôte zooprophyllactique (Telford 3rd *et al* 1988; Jaenson et Tälleklint 1992; Matuschka *et al* 1993; Kurtenbach *et al* 1998c). En ce qui concerne les populations de cervidés dans la région, les statistiques publiées par l'Office Fédéral de l'Environnement (OFEV), signalent une augmentation de leur population (chevreuils et chamois compris) à Neuchâtel en 2004 et une légère diminution en 2005. Nos analyses de la source du repas sanguin confirment que l'ADN le plus fréquemment identifié chez les tiques correspond au groupe des artiodactyles (Morán Cadenas *et al*, *in press a*).

Quant à la fréquence des sept espèces de *B. burgdorferi* sI dans *I. ricinus* identifiées en Europe (Rauter et Hartung 2005; Richter *et al* 2006), certaines particularités géographiques sont décrites. Notons que ces différences ne sont pas liées uniquement aux spécificités régionales mais également aux divergences amenées par les méthodes de détection et d'identification appliquées dans chaque laboratoire. Ainsi, au nord et au centre de l'Europe, *B. afzelii* est prédominante chez *I. ricinus* (Gern *et al* 1999; Kurtenbach *et al* 2001; Quessada *et al* 2003; Casati *et al* 2004; Rauter et Hartung 2005). Au contraire, *B. afzelii* n'est pas très fréquente le long de sa distribution sud, comme observé en Italie (Cinco *et al* 1998a,b; Bertolotti *et al* 2006), au Portugal (Matuschka *et al* 1998; Kurtenbach *et al* 2001; Baptista *et al* 2005) et en Espagne (Estrada Peña *et al* 2005; Gil *et al* 2005). D'après Hubálek et Halouska (1998) et Saint Girons *et al* (1998), *B. garinii* est l'espèce la plus fréquente dans le centre et le sud-ouest de l'Europe. *B. valaisiana* est largement distribuée dans les tiques en Irlande et en Angleterre (Kirstein *et al* 1997a, b; Kurtenbach *et al* 1998b; Gray *et al* 2000) et une forte prévalence est signalée en Allemagne par Kampen *et al* (2004). Dans le sud de la distribution d'*I. ricinus*, *B. lusitaniae* est largement répandue, surtout au Portugal (De Michelis *et al* 2000; Baptista *et al* 2004) et au nord de l'Afrique (Zhioua *et al* 1999; Younsi *et al* 2001, 2005; Sarih *et al* 2003; Dsouli *et al* 2006). Par contre, cette espèce est peu abondante en Europe, excepté le Portugal, où elle a été signalée sporadiquement en République Tchèque, Moldavie et Ukraine (Postic *et al* 1997), en Slovaquie (Gern *et al* 1999), en Pologne (Mizak et Krol 2000), en Espagne (Barral *et al* 2002), en France (Richter *et al* 2003), en Turquie (Güner *et al* 2003), en Allemagne (Richter *et al* 2006) et en Italie (Bertolotti *et al* 2006). D'ailleurs, De Michelis *et al* (2000) et Wang *et al* (1999b) signalent que la diversité des géoespèces de *Borrelia* sp associées à *I. ricinus* diminue à l'intérieur de sa zone de distribution selon un gradient nord-sud.

En Suisse, cinq géoespèces appartenant au complexe *B. burgdorferi* sI ont été identifiées jusqu'à maintenant: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae*. Jouda *et al* (2003) signalent par la première fois la présence de *B. lusitaniae* au Tessin, au sud des Alpes. Depuis, elle a été identifiée dans d'autres localités en Suisse Romande (Jouda *et al* 2004b), y compris Neuchâtel (Casati *et al* 2004; Jouda *et al* 2004a). Contrairement aux études précédentes, nous n'avons pas identifié *B. lusitaniae* ni à Neuchâtel ni en Valais, en dépit du nombre élevé de tiques analysées durant la période 2003-2005. Globalement, *B. afzelii* s'avère l'espèce prévalente pour les trois gradients étudiés. Si on considère en détail la situation selon l'altitude, *B. garinii* prédomine à 880 m en Valais tandis que *B. burgdorferi* ss, suivi de *B. valaisiana*, dominant à 1070 m dans le gradient sud de Chaumont.

Nous avons mentionné auparavant la répercussion de l'emploi de différents protocoles pour la détection et l'identification des spirochètes dans la distribution de *Borrelia* sp. La sensibilité des méthodes régulièrement appliquées pour la détection des borrelies varie considérablement de même que la précision de l'identification des espèces et la subjectivité inhérente à certaines méthodes, comme par exemple l'immunofluorescence. Divers auteurs montrent des différences quant à la prévalence de *Borrelia* chez *I. ricinus* selon la méthode de détection employée, par exemple l'immunofluorescence, la culture dans le milieu BSK, la microscopie au fond noir ou la PCR (Péter *et al* 1995; Kahl *et al* 1998b; Gern *et al* 1999; Kampen *et al* 2004). La PCR est devenue la méthode

adoptée couramment pour la détection des borrelies dans les tiques. Les limites de détection de cette méthode sensible et spécifique peuvent varier, entre autres, en fonction de l'efficacité de l'extraction de l'ADN des tiques. Dans notre laboratoire, la culture dans le milieu BSK (Barbour *et al* 1983) a été employée intensivement pour l'isolement de *Borrelia* sp à partir d'*I. ricinus*. Cependant, la préparation du milieu de culture est laborieuse et l'attente pour la détection du pathogène peut s'avérer longue, surtout pour le traitement d'une grande quantité de tiques. Nous avons, donc essayé un autre protocole d'extraction de l'ADN, l'hydrolyse alcaline avec l'hydroxyde d'ammonium (Guy et Stanek 1991), avec pour objectif le remplacement de la mise en culture par l'extraction avec l'hydroxyde d'ammonium (simple, rapide et économique). Nous avons, donc, testé simultanément les deux procédés d'isolement de l'ADN de *Borrelia* chez *I. ricinus* (Morán Cadenas *et al*, *in press b*). Nymphes et adultes ont été coupés longitudinalement en deux parties et chaque moitié a suivi un traitement d'extraction de l'ADN différent. Un peu plus de deux mille tiques récoltées en Suisse romande (Neuchâtel, Jura, Fribourg et Valais) en 2004 ont été examinées de cette manière avant la détection et l'identification du pathogène par PCR et RLB. Nous avons comparé d'abord les prévalences d'infection globales obtenues avec chacune des méthodes et nous avons investigué ensuite la distribution de *B. burgdorferi* sI et la prévalence des différentes génoespèces dans ces tiques.

Nous n'avons pas constaté de différences significatives dans le succès de détection de *Borrelia* selon le procédé d'extraction de l'ADN utilisé. La prévalence totale d'infection était de 31.2% (649/2079), avec *B. afzelii* comme espèce dominante (46%), suivie par *B. garinii* (26%), *B. valaisiana* (17%), *B. burgdorferi* ss (12%) et *B. burgdorferi* sI (11%). L'accord entre les deux méthodes appliquées à chaque demi-tique est supérieur à 80%. Ainsi 336 des tiques analysées montrent des résultats discordants: l'identification de l'espèce de *Borrelia* est différente dans chaque moitié (n=4) selon la procédure employée, ou l'identification n'est pas possible au niveau de l'espèce dans une des deux moitiés (n=19) ou bien une demi-tique est infectée mais pas l'autre (n=313). L'analyse des tiques infectées nous montre que l'extraction par l'hydroxyde d'ammonium favorise l'identification de *B. afzelii* tandis que la mise en culture favorise celle de *B. garinii* et de *B. burgdorferi* ss. Cette particularité pourrait s'expliquer par un développement favorisé de certaines souches dans le milieu de culture ou par la difficulté de l'hydroxyde d'ammonium à isoler l'ADN de certaines souches. Une autre possibilité serait que l'extraction de l'ADN est meilleure sur la tique entière que sur une moitié, quelque soit la méthode employée. Consciente du biais créé par une technique ou l'autre, nous préconisons plutôt l'extraction directe de l'ADN avec l'hydroxyde d'ammonium en raison de la simplicité, la rapidité et l'économie assurée. Un avantage supplémentaire est que l'ADN ainsi isolé peut être employé pour l'identification simultanée de *Borrelia* sp et de l'hôte source du repas sanguin chez la tique. En contrepartie, l'abandon de la mise en culture pour l'identification de *Borrelia* sp écarte la possibilité d'obtenir de nouvelles souches dérivées des tiques.

Les résultats de cette comparaison nous montrent l'influence du procédé employé pour l'isolement de l'ADN des tiques sur la détection des génoespèces de borrelies, ce qui peut avoir une répercussion sur la distribution décrite de *Borrelia* à travers l'Europe. L'utilisation de procédés d'extraction différents suivis de la PCR et de la RLB (techniques non utilisées dans les études précédentes en Suisse (Jouda *et al* 2003,2004a,b; Casati *et al* 2004)) pourrait être une explication à l'absence de *B.*

lusitaniae dans notre travail. La sonde pour *B. lusitaniae* (LusiNE) (Poupon *et al* 2006), qui fait partie de la batterie de sondes spécifiques pour l'identification de *Borrelia* sp par RLB, a été conçue par notre laboratoire. Sa spécificité d'hybridation a été testée avec plusieurs isolats et ensuite avec des tiques récoltées au Maroc et en Moldavie (données non publiées). De Michelis *et al* (2000) au Portugal et Younsi *et al* (2005) en Tunisie et au Maroc ont étudié la diversité génétique des différentes souches de *B. lusitaniae* en prenant comme cible la région *rrl-rrf* spacer, l'*ospA* et l'*ospC*. Mais rien n'est connu sur la diversité des souches présentes dans les populations d'*I. ricinus* de nos forêts. Il suffirait d'une légère mutation de la séquence (par exemple, quelques bases différentes) pour manquer son identification au niveau de l'espèce. Une observation similaire a été faite pour *B. garinii* durant notre travail. Ainsi, le fait de produire une deuxième sonde spécifique pour cette espèce (nommée GANE) (Poupon *et al* 2006) nous a permis d'identifier comme *B. garinii* un bon nombre d'échantillons qui n'hybridaient pas avec la sonde GA. Donc, nous espérons que la production de nouvelles sondes pourra améliorer encore l'identification de certaines souches dans l'avenir. D'autres démarches ont aussi été entreprises pour améliorer l'identification de nos échantillons. Nous en avons séquencé certains qui présentaient une hybridation double *B. afzelii* et *B. lusitaniae*, dans le but de clarifier s'il s'agissait réellement d'une infection mixte ou d'une variante de *B. afzelii* qui hybride de manière non spécifique avec la sonde LusiNE. En effet, les séquences obtenues montraient qu'il s'agissait d'une variante de *B. afzelii* avec quelques bases différentes dans la région d'hybridation de la sonde.

La grande variabilité de la densité des tiques dans les populations d'*I. ricinus* liée à une prévalence d'infection par borrelies variable et à une distribution irrégulière des génoespèces, souligne la multiplicité des facteurs impliqués dans le maintien des tiques et des spirochètes dans la nature. L'identification des hôtes incriminés dans le maintien de ces populations de tiques est importante d'un point de vue épidémiologique dans la prévention et le contrôle des zoonoses transmises par les tiques. Traditionnellement, les méthodes choisies pour obtenir des informations sur les vertébrés impliqués dans le cycle de vie des tiques sont le piégeage, la récupération des tiques sur des animaux chassés et l'emploi de la xénodiagnose. Une nouvelle tendance apparaît avec l'essor des techniques de biologie moléculaire qui évite la capture des animaux et leur manipulation au laboratoire. En effet, quelques auteurs ont privilégié cette approche pour l'identification de l'hôte via l'analyse de la source du repas sanguin présent dans l'intestin des tiques en employant le cytochrome b et le 18S rRNA comme gènes cibles pour la RLB (Kirstein et Gray 1996; Pichon *et al* 2003,2005,2006; Estrada Peña *et al* 2005). Nous avons suivi cette démarche pour étudier le rôle des hôtes présents dans nos forêts en adoptant aussi la RLB, mais en employant le gène 12S rDNA comme marqueur génétique (Humair *et al*, *in press*). Un total de 35 sondes nous permet l'identification des principaux groupes de vertébrés (petit rongeurs, moyens et grands mammifères, oiseaux et lézard) et des espèces courantes de la faune suisse. Le succès d'identification de la source du repas sanguin dans les tiques en quête que nous avons examinées atteignait 44% (578/1326), et dans presque trois quarts des cas où l'identification a été possible, le genre ou l'espèce a pu être identifié. Ces résultats sont très intéressants (Morán Cadenas *et al*, *in press a*) car dans les études précédentes sur les tiques récoltées dans la nature (Pichon *et al* 2003,2005,2006; Estrada Peña *et al* 2005) les auteurs ne

parvenaient pas à l'identification jusqu'à l'espèce. Estrada Peña *et al* (2005) emploient simultanément les gènes 18S rRNA et 12S rRNA pour l'identification de l'ADN des hôtes, avec un succès d'identification de 36%. Selon le gène utilisé, l'identification varie. Ainsi la plupart des identifications aboutissent à l'ADN d'oiseaux en utilisant le gène 18S (noyau) tandis que le gène 12S (mitochondrial) permet l'identification d'ADN de suidés, cervidés et *Apodemus*. Une fois de plus, on constate l'influence du protocole appliqué dans les résultats d'identification, confirmant la nécessité de rester prudent pour interpréter les résultats.

Nous avons analysé simultanément l'infection par borrelies et l'identification du repas sanguin chez 1326 tiques récoltées sur les deux versants de Chaumont. La caractérisation de la source du repas sanguin chez *I. ricinus* varie significativement selon les sites de récolte et aussi mensuellement. Sur le versant nord, l'identification des hôtes apparaît comme maximale en mai (93%) et en octobre (73%). Sur le versant sud, c'est en octobre et novembre que le succès d'identification est supérieur (68%). Le succès d'identification dépend de plusieurs facteurs, entre autre le temps écoulé entre le dernier repas, la mue et la nouvelle activité de quête. Ceci laisse penser que sur le versant nord nous avons deux cohortes de tiques nouvellement muées (mai et octobre) et une seule sur le versant sud en automne. Cette dernière observation confirmerait l'hypothèse d'une unique cohorte de tiques qui surgit chaque automne proposée par Randolph *et al* (2002) en Grand Bretagne et confirmée au Danemark par Jensen et Kaufmann (2003). L'ADN le plus souvent identifié, quelque soit le versant, appartient au groupe artiodactyles, dont la population est assez importante dans la région (selon les statistiques fédérales, comme déjà mentionné). Si on considère chaque versant séparément, l'ADN d'insectivores était plus fréquent dans les tiques récoltées sur le versant nord tandis que celui de l'écureuil était plus fréquent dans les tiques récoltées au sud. La contribution des écureuils dans cette forêt au maintien des tiques et à la transmission de *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* est bien connue (Humair et Gern 1998). Le succès d'identification de la source du repas sanguin chez *I. ricinus* est supérieur sur le versant nord de la montagne, certainement dû au fait que nous avons eu deux pics de tiques nouvellement muées, comme nous l'avons vu précédemment. Des tiques à jeun peuvent survivre plus d'un an avant de retrouver un hôte, réduisant au minimum les réserves énergétiques procurées par le repas précédent. Le temps ainsi écoulé influence fortement le succès d'identification du repas sanguin. Des expériences en laboratoire montrent que l'ADN de l'hôte peut être identifié jusqu'à 200 jours après le repas des tiques sur des souris (Kirstein et Gray 1996) et jusqu'à 8 mois après le repas des tiques sur des souris et des lapins (Pichon *et al* 2003). Si ces seuils de détection sont connus, malheureusement nous ne disposons pas de données sur la cinétique de la digestion de l'ADN du sang chez la tique selon l'espèce d'hôte. Par exemple l'effet de la présence de noyaux dans les globules rouges des oiseaux sur cette cinétique est totalement inconnu. Nous ne connaissons pas non plus l'influence des restes des repas précédents pris par les larves ou les nymphes lors de l'examen des adultes.

Dans certaines tiques nous avons identifié un mélange d'ADN appartenant à divers hôtes, ce que nous expliquons par divers repas partiels pris sur des hôtes successifs par *I. ricinus*, ce qui a été déjà décrit chez *I. scapularis* par Piesman (1991). Il est également possible que nous détectons la présence d'ADN sur la surface du corps des tiques s'étant agrippées à des hôtes sans parvenir à

s'attacher. +Dans tous les cas, les résultats obtenus nous apportent des informations précieuses sur la diversité de la faune dans un biotope.

L'identification de l'ADN de l'hôte chez les tiques infectées permet d'apporter des connaissances sur les hôtes réservoirs. On sait aujourd'hui que *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss sont associés avec les micromammifères et l'écureuil et que *B. garinii* et *B. valaisiana* sont associés aux oiseaux (Hu *et al* 1997; Humair et Gern 1998; Humair *et al* 1998,1999; Kurtenbach *et al* 1998b; Hanincová *et al* 2003a,b). Nos résultats confirment cette association: *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss sont identifiés plus fréquemment dans les tiques gorgées sur les rongeurs que sur les oiseaux, de même *B. garinii* et *B. valaisiana* sont plus fréquents dans les tiques gorgées sur les oiseaux que sur les rongeurs. Nous avons détecté également des tiques infectées par *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. valaisiana* qui se sont nourries sur des chevreuils, considérés traditionnellement comme des hôtes zooprophylactiques. Rijpkema *et al* (1996b) ont également identifié ces quatre génoespèces dans des tiques récoltées sur des chevreuils. L'observation de tiques infectées par *B. afzelii* s'étant gorgées sur des sangliers rapportée récemment par Estrada Peña *et al* (2005) est aussi fréquente dans notre étude. En définitif, l'absence d'une association stricte entre *Borrelia* sp et certains hôtes particuliers n'est pas complètement surprenante. Des résultats similaires ont été obtenus auparavant en Suisse et en France (Gern *et al* 1997; Pichon *et al* 2000) ainsi qu'en Russie et en Asie (Nakao *et al* 1994; Gorelova *et al* 1995; Nakao et Miyamoto 1995; Ishiguro *et al* 1996; Sato *et al* 1996; Sato et Nakao 1997). Ces derniers auteurs ont identifié *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss dans les organes internes de petits rongeurs (par mise en culture dans du BSK ou par PCR). Fingerle *et al* (2007) ont examiné l'infection par *Borrelia* dans des biopsies d'oreille d'animaux chassés (chevreuils, cerfs, sanglier et renards) et dans des tiques gorgées récupérées sur eux. Ainsi ils ont identifié *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* chez les chevreuils, les cerfs et les sangliers. En plus, ils signalent aussi le rôle possible des renards comme réservoirs de *B. valaisiana*. *B. garinii*, traditionnellement associé aux oiseaux, peut également être associée aux rongeurs selon le sérotype concerné (Hügli *et al* 2002).

Toutes ces observations suggèrent que des cycles non spécifiques entre les hôtes et *Borrelia* sp peuvent coexister en même temps que des cycles plus stricts entre certains hôtes et des souches spécifiques. Le futur nous permettra d'évaluer l'importance de ces cycles aspécifiques dans la circulation des borrelies dans la nature. D'autres explications plausibles pour l'absence de spécificité sont la transmission transovarienne des spirochètes (Bellet-Edimo *et al* 2005), la transmission par co-feeding (Kimura *et al* 1995; Gern et Rais 1996; Ogden *et al* 1997; Hu *et al* 2003), des repas partiels sur différents hôtes infectés (Piesman 1991) ou la contamination avec de l'ADN externe.

Un des derniers aspects que nous avons considéré dans notre étude concerne les risques de contracter une borréliose de Lyme et leur évolution en fonction des changements climatiques. Nous avons examiné la prévalence d'infection par borrelies chez les tiques en quête et aussi le risque de rencontrer une tique infectée, tout cela dans un contexte de réchauffement climatique. La canicule de l'été 2003 enregistrée dans une grande partie de l'Europe ne constitue pas un fait isolé. Le 4^{ème} rapport du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) de février 2007,

prévoit une augmentation globale moyenne de la température entre 1.8°C et 4°C d'ici la fin du siècle (www.letemps.ch/climat). La Suisse, comme la plus grande partie de l'Europe, va connaître un réchauffement supérieur à la moyenne mondiale et les précipitations vont suivre un régime de type méditerranéen, avec une "saison sèche" en été et une "saison humide" en hiver. Le scénario climatique du XXI^e siècle aborde des changements très importants qui vont, sans doute, modifier la dynamique saisonnière des tiques ainsi que leur densité et leur répartition géographique.

En ce qui concerne les zoonoses les plus fréquentes transmises par les tiques sous nos latitudes, la borréliose de Lyme et l'encéphalite à tiques, une augmentation de leur incidence a été constatée à la fin du XX^e siècle dans plusieurs pays européens, provoquant parfois un problème de santé publique (Randolph 2001,2004a). Des facteurs biotiques et sociopolitiques semblent impliqués dans ce phénomène. Le climat joue, sans doute, un rôle sur la dynamique de ces maladies. Des prévisions faites pour l'encéphalite à tiques en Europe, en considérant les changements climatiques récents, suggèrent qu'en 2020 ce virus disparaîtra des régions situées dans la limite sud de sa distribution actuelle (Slovénie, Croatie, Hongrie) et que sa présence augmentera dans les pays baltes et en 2050, l'encéphalite à tiques sera éradiquée d'Europe centrale (Randolph 2001). Kampen *et al* (2004) montrent une augmentation de l'incidence de la borréliose dans une région endémique en Allemagne au cours de la dernière décennie, peut être à cause de changements climatiques qui ont provoqué une augmentation de la population des tiques ou de la disponibilité des hôtes.

En Suisse, l'année 2003 a été très chaude, 2004 relativement chaude et cette progression thermique est confirmée en 2005 (MétéoSuisse, Bulletin Météorologique 2005), année la plus chaude, la plus ensoleillée et la plus pauvre en précipitations par rapport à la moyenne 1961-1990. Dans la plupart des régions du pays en 2005, l'hiver fut nettement plus froid que la normale, avec des températures minimales enregistrées au début mars. À Neuchâtel, les moyennes mensuelles mesurées pour la période 2003-2005 confirment cette tendance générale avec des hivers et des printemps plus froids et des étés et des automnes plus chauds qu'auparavant (1996-2001). Dans ce contexte climatique, nous avons calculé le risque maximal de rencontrer une tique infectée (PTDi, calculée en multipliant le PTD * prévalence d'infection). Ce risque varie de 3.6 à 78.7 nymphes infectées/100 m² et de 0.6 à 16.9 adultes infectés/100 m² à Chaumont et de 3.2 à 5.8 nymphes infectées/100 m² et de 0.5 à 3.6 adultes infectés/100 m² en Valais. La densité de tiques infectées est supérieure chez les nymphes, étant le stade le plus incriminé dans cette maladie. Les résultats obtenus à Chaumont sur le suivi 2003-2005 dépassent les valeurs signalées préalablement par Jouda *et al* (2004a) sur la période 1999-2001, et ceci dans un contexte d'augmentation significative de la température entre les deux périodes d'étude. Cette tendance doit encore être confirmée à long terme, raison pour laquelle cette étude se poursuit actuellement.

Le risque élevé de contracter la maladie de Lyme dans cette région endémique en Suisse justifie largement le choix de la montagne de Chaumont (Neuchâtel) pour notre étude. C'est une forêt très proche de la ville, avec une population de tiques bien établie à différentes altitudes, reconnue comme foyer de *B. burgdorferi*, et fréquentée régulièrement dans le cadre de diverses activités professionnelles et de loisirs. La longue série de données disponibles pour cette région (de 1996 à

nos jours) est un avantage supplémentaire dans le suivi de l'évolution des populations de tiques et nous incite donc à suivre les recherches dans cette région.

6 BIBLIOGRAPHIE

- AESCHLIMANN, A. 1972.** *Ixodes ricinus*, Linné, 1758 (*Ixodoidea; Ixodidae*). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Trop* 29: 321-340.
- AESCHLIMANN, A., BURGDORFER, W., MATILE, H., PÉTER, O., WYLER, R. 1979.** Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. Note préliminaire. *Acta Trop* 36: 181-191.
- AESCHLIMANN, A., CHAMOT, E., GIGON, F., JEANNERET, J. P., KESSELER, D., WALTHER, C. 1986.** *B. burgdorferi* in Switzerland. *Zbl Bakt Hyg A* 263: 450-458.
- AFZELIUS, A. 1910.** Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. *Arch Dermatol Syph* 101: 404.
- ALEKSEEV, A. N., DUBININA, H. V., VAN DE POL, I., SCHOOLS, L. M. 2001.** Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J Clin Microbiol* 39: 2237-2242.
- ANDERSON, J. F., MAGNARELLI, L. A., LEFEBVRE, R. B., ANDREADIS, T. G., McANINCH, J. B., PERNG, G. C., JOHNSON, R. C. 1989.** Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolated from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. *J Clin Microbiol* 27: 13-20.
- ANDERSON, J. F. 1991.** Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 77: 23-34.
- BANIEWICZ, J. 2002.** Observations météorologiques faites en 2001 à l'observatoire cantonal de Neuchâtel. *Bull Soc Neuchâtel Sci Nat* 125: 155-162.
- BANNWARTH, A. 1941.** Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus." *Arch Psychiatr Nervenkr* 113: 284-376.
- BAPTISTA, S., QUARESMA, A., AIRES, T., KURTENBACH, K., SANTOS-REIS, M., NICHOLSON, M., COLLARES-PEREIRA, M. 2004.** Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 109-116.
- BAPTISTA, S., HENRIQUES, G., AIRES, T., NICHOLSON, M., WALKER, H., KURTENBACH, K., VIEIRA, M., COLLARES-PEREIRA, M. 2005.** *Ixodes ricinus* in Portugal - a five-year study on seasonal dynamics and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a suitable habitat, 31. In 10th International Conference on Lyme borreliosis and other Tick-Borne Diseases, 11-15 Sep 2005. Vienna (Austria).
- BARANTON, G., POSTIC, D., SAINT GIRONS, I., BOERLIN, P., PIFFARETTI, J. C., ASSOUS, M., GRIMONT, P. A. 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.
- BARBOUR, A. G., BURGDORFER, W., HAYES, S. F., PÉTER, O., AESCHLIMANN, A. 1983.** Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol* 8: 123-126.
- BARKER, S. C., MURRELL, A. 2004.** Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129 Suppl: S15-36.
- BARRAL, M., GARCÍA-PÉREZ, A. L., JUSTE, R. A., HURTADO, A., ESCUDERO, R., SELLEK, R. E., ANDA, P. 2002.** Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. *J Med Entomol* 39: 177-184.
- BEKKER, C. P., DE VOS, S., TAOUFIK, A., SPARAGANO, O. A., JONGEJAN, F. 2002.** Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet Microbiol* 89: 223-238.
- 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, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.

- BELLET-EDIMO, R., BETSCHART, B., GERN, L. 2005.** Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. *Bull Soc Neuchâtel Sci Nat* 128: 117-125.
- BELOZEROV, V. N. 1982.** Diapause and biological rhythms in ticks. Pergamon Press, Oxford.
- BERGSTRÖM, S., NOPPA, L., GYLFE, A., ÖTSBERG, Y. 2002.** Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek [eds.]. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, 47-90. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- BERTOLOTTI, L., TOMASSONE, L., TRAMUTA, C., GREGO, E., AMORE, G., AMBROGI, C., NEBBIA, P., MANNELLI, A. 2006.** *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol* 43: 159-165.
- BROWN, R. N., LANE, R. S. 1992.** Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Science* 256: 1439-1442.
- BUCHWALD, A. 1883.** Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Arch Dermatol Syph* 10: 553-556.
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENACH, J. L., GRUNWALDT, E., DAVIS, J. P. 1982.** Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319.
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., PÉTER, O., AESCHLIMANN, A. 1983.** Erythema chronicum migrans - a tickborne spirochetosis. *Acta Trop* 40: 79-83.
- BURRI, C. 2005.** Densité de populations d'*Ixodes ricinus* et prévalence de *Borrelia burgdorferi* sensu lato le long d'un gradient d'altitude dans le canton du Valais (saison 2004-2005). Travail de Master. Laboratoire d'Éco-épidémiologie des Parasites. Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- BURRI, C., MORÁN CADENAS, F., DOUET, V., MORET, J., GERN, L. 2007.** *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 50-58.
- CAFLISCH, U., TONZ, O., SCHAAD, U. B., AESCHLIMANN, A., BURGDORFER, W. 1984.** [Tick-borne meningoradiculitis - a form of spirochetosis]. *Schweiz Med Wochenschr* 114: 630-634.
- CAMICAS, J. L., HERVY, J. P., ADAM, F., MOREL, P. C. 1998.** The ticks of the world (Acarida, Ixodida). Nomenclature, described stages, hosts, distribution. Editions de l'Orstom, Paris.
- CAMPBELL, J. A. 1948.** The life history and development of the sheep tick *Ixodes ricinus* Linnaeus in Scotland, under natural and controlled conditions. Thèse, University of Edinburgh, Edinburgh.
- CANICA, M. M., NATO, F., DU MERLE, L., MAZIE, J. C., BARANTON, G., POSTIC, D. 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.
- CASATI, S., BERNASCONI, M. V., GERN, L., PIFFARETTI, J. C. 2004.** Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by recA gene sequence. *FEMS Microbiol Lett* 238: 115-123.
- CASJENS, S., PALMER, N., VAN VUGT, R., HUANG, W. M., STEVENSON, B., ROSA, P., LATHIGRA, R., SUTTON, G., PETERSON, J., DODSON, R. J., HAFT, D., HICKEY, E., GWINN, M., WHITE, O., FRASER, C. M. 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.
- CHMELA, J. 1969.** On the developmental cycle of the common tick (*Ixodes ricinus* L.) in the North-Moravian natural focus of tick-borne encephalitis. *Folia Parasitol (Praha)* 16: 313-319.
- CHRISTOVA, I., VAN DE POL, J., YAZAR, S., VELO, E., SCHOULS, L. 2003.** Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 535-542.
- CINCO, M., PADOVAN, D., MURGIA, R., FRUSTERI, L., MAROLI, M., VAN DE POL, I., VERBEEK-DE KRUIF, N., RIJPKEMA, S., TAGGI, F. 1998a.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes ricinus* in central Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 134-135.

- CINCO, M., PADOVAN, D., MURGIA, R., POLDINI, L., FRUSTERI, L., VAN DE POL, I., VERBEEK-DE KRUIF, N., RIJKEMA, S., MAROLI, M. 1998b. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 90-94.
- COLLARES-PEREIRA, M., COUCEIRO, S., FRANCA, I., KURTENBACH, K., SCHAFER, S. M., VITORINO, L., GONCALVES, L., BAPTISTA, S., VIEIRA, M. L., CUNHA, C. 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 42: 1316-1318.
- COTTY, A., AESCHLIMANN, A., SCHNEEBERGER, S. 1986. Distribution et fluctuation de populations d'*Ixodes ricinus* (L.), *Haemaphysalis punctata* (Can. & Fanz) et *Dermacentor marginatus* (Sulzer) (Acarina, Ixodoidea) en Suisse. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 59: 139-150.
- CRAINE, N. G., NUTTALL, P. A., MARRIOTT, A. C., RANDOLPH, S. E. 1997. Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. *Folia Parasitol (Praha)* 44: 155-160.
- CRIPPA, M., RAIS, O., GERN, L. 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 Zoonotic Dis* 2: 3-9.
- DA FRANCA, I., SANTOS, L., MESQUITA, T., COLLARES-PEREIRA, M., BAPTISTA, S., VIEIRA, L., VIANA, I., VALE, E., PRATES, C. 2005. Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wien Klin Wochenschr* 117: 429-432.
- DANIEL, M. 1993. Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* (L.) in central Europe. *Acarologia* XXXIV: 105-113.
- DANIEL, M., DANIELOVÁ, V., KRIZ, B., JIRSA, A., NOZICKA, J. 2003. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 327-328.
- DANIELOVÁ, V., RUDENKO, N., DANIEL, M., HOLUBOVA, J., MATERNA, J., GOLOVCHENKO, M., SCHWARZOVA, L. 2006. Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40: 48-53.
- DE MICHELIS, S., SEWELL, H. S., COLLARES-PEREIRA, M., SANTOS-REIS, M., SCHOOLS, L. M., BENES, V., HOLMES, E. C., KURTENBACH, K. 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 38: 2128-2133.
- DERDÁKOVÁ, M., BEATI, L., PET'KO, B., STANKO, M., FISH, D. 2003. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 69: 509-516.
- DIZIJ, A., KURTENBACH, K. 1995. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol* 17: 177-183.
- DOCHE, B., GILOT, B., DEGEILH, B., PICHOT, J., GUIGEN, C. 1993. Utilisation de l'indicateur végétal pour la cartographie d'une tique exophile à l'échelle de la France: exemple d'*Ixodes ricinus* (Linné, 1758), vecteur de la borréliose de Lyme. *Ann Parasitol Hum Comp* 68: 188-195.
- DSOULI, N., YOUNSI-KABACHII, H., POSTIC, D., NOUIRA, S., GERN, L., BOUATTOUR, A. 2006. Reservoir role of lizard *Psammotromus algirus* in transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Spirochaetaceae) in Tunisia. *J Med Entomol* 43: 737-742.
- EISEN, L., LANE, R. S. 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek [eds.]. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, 91-115. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- EISEN, R. J., EISEN, L., CASTRO, M. B., LANE, R. S. 2003. Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in Northern California: effect of climatic conditions and habitat type. *Environ Entomol* 32: 1010-1018.
- ESTRADA PEÑA, A., OSÁCAR, J. J., PICHON, B., GRAY, J. S. 2005. Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Exp Appl Acarol* 37: 257-268.

- FERQUEL, E., GARNIER, M., MARIE, J., BERNEDE-BAUDUIN, C., BARANTON, G., PÉREZ-EID, C., POSTIC, D. 2006.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl Environ Microbiol* 72: 3074-3078.
- FINGERLE, V., MICHEL, H., SCHULTE-SPECHTEL, U., GÖTTNER, G., HIZO-TEUFEL, C., HOFMANN, H., WEBER, K., WILSKE, B. 2004.** A14S - a new *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies as relevant cause of human disease [abstract]. *Int J Med Microbiol* 294 Suppl 1: 207.
- FINGERLE, V., SCHULTE-SPECHTEL, U. C., HIZO-TEUFEL, C., KÖNING, A., WILSKE, B. 2007.** Game animals in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, 42. In IX International Jena Symposium on tick-borne diseases (IJSTD-IX 2007). "Climate change and tick-borne diseases". 15-17 Mars 2007. Jena (Germany).
- FÖLDVÁRI, G., FARKAS, R., LAKOS, A. 2005.** *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerg Infect Dis* 11: 1794-1795.
- FRASER, C. M., CASJENS, S., HUANG, W. M., SUTTON, G. G., CLAYTON, R., LATHIGRA, R., WHITE, O., KETCHUM, K. A., DODSON, R., HICKEY, E. K., GWINN, M., DOUGHERTY, B., TOMB, J. F., FLEISCHMANN, R. D., RICHARDSON, D., PETERSON, J., KERLAVAGE, A. R., QUACKENBUSH, J., SALZBERG, S., HANSON, M., VAN VUGT, R., PALMER, N., ADAMS, M. D., GOCAYNE, J., WEIDMAN, J., UTTERBACK, T., WATTHEY, L., McDONALD, L., ARTIACH, P., BOWMAN, C., GARLAND, S., FUJI, C., COTTON, M. D., HORST, K., ROBERTS, K., HATCH, B., SMITH, H. O., VENTER, J. C. 1997.** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586.
- GARCÍA-SANMARTÍN, J., NAGORE, D., GARCÍA-PÉREZ, A. L., JUSTE, R. A., HURTADO, A. 2006.** Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet Res* 2: 16.
- GARIN, C., BUJADOUX, R. 1922.** Paralysie par les tiques. *J Med Lyon* 71: 765-767.
- GERN, L., ZHU, Z., AESCHLIMANN, A. 1990.** Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Annals Parasitol Hum Comp* 65: 89-93.
- GERN, L., BURGDORFER, W., AESCHLIMANN, A., KRAMPITZ, H. E. 1993.** The ecology of Lyme borreliosis in Europe. In K. Weber, W. Burgdorfer [eds.]. *Aspects of Lyme borreliosis*, 59-69. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- GERN, L., RAIS, O. 1996.** Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 33: 189-192.
- GERN, L., ROUVINEZ, E., TOUTOUNGI, L. N., GODFROID, E. 1997.** 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 (Praha)* 44: 309-314.
- GERN, L., ESTRADA PEÑA, A., FRANDSEN, F., GRAY, J. S., JAENSON, T. G., JONGEJAN, F., KAHL, O., KORENBERG, E., MEHL, R., NUTTALL, P. A. 1998.** European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl Bakteriol* 287: 196-204.
- GERN, L., HU, C. M., KOCIANOVA, E., VYROSTEKOVA, V., REHACEK, J. 1999.** Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 15: 665-669.
- GERN, L., HUMAIR, P.-F. 2002.** Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek [eds.]. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, 149-174. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- GIGON, F. 1985.** Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le Plateau suisse - une contribution à l'écologie de ce vecteur. Thèse, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- GIL, H., BARRAL, M., ESCUDERO, R., GARCÍA-PÉREZ, A. L., ANDA, P. 2005.** Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in areas of northern Spain where Lyme disease is endemic. *Appl Environ Microbiol* 71: 1336-1345.
- GODFROID, E., HU, C. M., HUMAIR, P.-F., BOLLEN, A., GERN, L. 2003.** PCR-reverse line blot typing method underscores the genomic heterogeneity of *Borrelia valaisiana* species and suggests its potential involvement in Lyme disease. *J Clin Microbiol* 41: 3690-3698.

- GORELOVA, N. B., KORENBERG, E. I., KOVALEVSKII, Y. V., SHCHERBAKOV, S. V. 1995. Small mammals as reservoir hosts for *Borrelia* in Russia. *Zentralbl Bakteriol* 282: 315-322.
- GRAY, J. S. 1984. Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. *Acarologia* 25: 167-178.
- GRAY, J. S. 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol* 79: 323-333.
- GRAY, J. S., KAHL, O., JANETZKI-MITTMAN, C., STEIN, J., GUY, E. 1994. Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. *Exp Appl Acarol* 18: 485-491.
- GRAY, J. S., KAHL, O., JANETZKI, C., STEIN, J., GUY, E. 1995. The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes ricinus* in the Connemara region of County Galway, Ireland. *Exp Appl Acarol* 19: 163-172.
- GRAY, J. S., ROBERTSON, J. N., KEY, S. 2000. Limited role of rodents as reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ireland. *Eur J Epidemiol* 16: 101-103.
- GÜNER, E. S., HASHIMOTO, N., TAKADA, N., KANEDA, K., IMAI, Y., MASUZAWA, T. 2003. First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J Med Microbiol* 52: 807-813.
- GUY, E. C., STANEK, G. 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 44: 610-611.
- HANINCOVÁ, K., SCHAFFER, S. M., ETTI, S., SEWELL, H. S., TARAGELOVA, V., ZIAK, D., LABUDA, M., KURTENBACH, K. 2003a. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 126: 11-20.
- HANINCOVÁ, K., TARAGELOVA, V., KOCI, J., SCHAFFER, S. M., HAILS, R., ULLMANN, A. J., PIESMAN, J., LABUDA, M., KURTENBACH, K. 2003b. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol* 69: 2825-2830.
- HOOGSTRAAL, H., AESCHILMANN, A. 1982. Tick-Host Specificity. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 55: 5-32.
- HORAK, I. G., CAMICAS, J. L., KEIRANS, J. E. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol* 28: 27-54.
- HOVMARK, A., JAENSON, T. G., ASBRINK, E., FORSMAN, A., JANSSON, E. 1988. First isolations of *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in northern Europe. *Apmis* 96: 917-920.
- HU, C. M., HUMAIR, P.-F., WALLICH, R., GERN, L. 1997. *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zentralbl Bakteriol* 285: 558-564.
- HU, C. M., WILSKE, B., FINGERLE, V., LOBET, Y., GERN, L. 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.
- HU, C. M., CHEMINADE, Y., PERRET, J.-L., WEYNANTS, V., LOBET, Y., GERN, L. 2003. Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Med Microbiol* 293: 421-426.
- HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J., JURICOVA, Z. 1991. A comparison of the occurrence of borreliae in nymphal and adult *Ixodes ricinus* ticks. *Zentralbl Bakteriol* 275: 133-137.
- HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J. 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol* 13: 951-957.
- HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J. 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res* 84: 167-172.
- HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J., JURICOVA, Z., SIKUTOVA, S., RUDOLF, I. 2006. Effect of forest clearing on the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. *Med Vet Entomol* 20: 166-172.

- HÜGLI, D., HU, C. M., HUMAIR, P.-F., WILSKÉ, B., GERN, L. 2002. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J Clin Microbiol* 40: 4735-4737.
- HUMAIR, P.-F., TURRIAN, N., AESCHILIMANN, A., GERN, L. 1993. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol (Praha)* 40: 65-70.
- HUMAIR, P.-F., PÉTER, O., WALLICH, R., GERN, L. 1995. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *J Med Entomol* 32: 433-438.
- HUMAIR, P.-F., POSTIC, D., WALLICH, R., GERN, L. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl Bakteriol* 287: 521-538.
- HUMAIR, P.-F., GERN, L. 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop* 69: 213-227.
- HUMAIR, P.-F., RAIS, O., GERN, L. 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.
- HUMAIR, P.-F., DOUET, V., MORÁN CADENAS, F., SCHOULS, L. M., VAN DE POL, I., GERN, L. *In press*. Molecular identification of blood meal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J Med Entomol*.
- ISHIGURO, F., TAKADA, N., NAKATA, K., YANO, Y., SUZUKI, H., MASUZAWA, T., YANAGIHARA, Y. 1996. Reservoir competence of the vole, *Clethrionomys rufocanus bedfordiae*, for *Borrelia garinii* or *Borrelia afzelii*. *Microbiol Immunol* 40: 67-69.
- JAENSON, T. G., TÄLLEKLINT, L. 1992. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. *J Med Entomol* 29: 813-817.
- JAENSON, T. G., TÄLLEKLINT, L. 1996. Lyme borreliosis spirochetes in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) and the varying hare on isolated islands in the Baltic Sea. *J Med Entomol* 33: 339-343.
- JENSEN, P. M. 2000. Host seeking activity of *Ixodes ricinus* ticks based on daily consecutive flagging samples. *Exp Appl Acarol* 24: 695-708.
- JENSEN, P. M., HANSEN, H., FRANDBSEN, F. 2000. Spatial risk assessment for Lyme borreliosis in Denmark. *Scand J Infect Dis* 32: 545-550.
- JENSEN, P. M., KAUFMANN, U. 2003. Seasonal and diel activity of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) subpopulations in Denmark. Aspects of size, physiological age, and malate dehydrogenase genotype in a forest site without any undergrowth. *Exp Appl Acarol* 30: 289-303.
- JOHNSON, R. C., SCHMID, G. P., HYDE, F. W., STEIGERWALT, A. G., BRENNER, D. J. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34: 496-497.
- JOUDA, F., CRIPPA, M., PERRET, J.-L., GERN, L. 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). *Eur J Epidemiol* 18: 907-912.
- JOUDA, F. 2003. Étude écologique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, agent de la borréliose de Lyme en Suisse et au Maroc: distribution et prévalence d'infection chez *Ixodes ricinus*. Thèse, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- JOUDA, F., PERRET, J.-L., GERN, L. 2004a. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J Med Entomol* 41: 162-169.
- JOUDA, F., PERRET, J.-L., GERN, L. 2004b. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4: 23-32.
- KAHL, O., JANETZKI-MITTMANN, C., GRAY, J. S., JONAS, R., STEIN, J., DE BOER, R. 1998a. 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. *Zentralbl Bakteriol* 287: 41-52.

- KAHL, O., GERN, L., GRAY, J. S., GUY, E. C., JONGEJAN, F., KIRSTEIN, F., KURTENBACH, K., RIJKEMA, S. G., STANEK, G. 1998b.** Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks: immunofluorescence assay versus polymerase chain reaction. *Zentralbl Bakteriol* 287: 205-210.
- KAHL, O., GERN, L., EISEN, L., LANE, R. S. 2002.** Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: terminology and some methodological pitfalls. In J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek [eds.]. Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, 29-46. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- KALTENRIEDER, M., HESS, E., AESCHILMANN, A. 1985.** Zum Vorkommen der Zecke *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea, Ixodidae) in der Schweiz. *Revue suisse Zool.* 92: 685-692.
- KAMPEN, H., ROTZEL, D. C., KURTENBACH, K., MAIER, W. A., SEITZ, H. M. 2004.** Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* 70: 1576-1582.
- KEIRANS, J. E. 1992.** Systematics of the Ixodida (*Argasidae*, *Ixodidae*, *Nuttalliellidae*): An overview and some problems. In B. H. Fivay, T. N. Petney, I. G. Horak [eds.]. Tick Vector Biology: Medical and Veterinary aspects 1-21. Springer-Verlag, Berlin.
- KEIRANS, J. E., ROBBINS, R. G. 1999.** A world checklist of genera, subgenera, and species of ticks (Acari: Ixodida) published from 1973-1997. *J Vector Ecol* 24: 115-129.
- KIMURA, K., ISOGAI, E., ISOGAI, H., KAMEWAKA, Y., NISHIKAWA, T., ISHII, N., FUJII, N. 1995.** Detection of Lyme disease spirochetes in the skin of naturally infected wild sika deer (*Cervus nippon yezoensis*) by PCR. *Appl Environ Microbiol* 61: 1641-1642.
- KIRSTEIN, F., GRAY, J. S. 1996.** A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* 62: 4060-4065.
- KIRSTEIN, F., RIJKEMA, S., MOLKENBOER, M., GRAY, J. S. 1997a.** The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *Eur J Epidemiol* 13: 67-72.
- KIRSTEIN, F., RIJKEMA, S., MOLKENBOER, M., GRAY, J. S. 1997b.** Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol* 63: 1102-1106.
- KORENBERG, E. I. 2000.** Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. *Exp Appl Acarol* 24: 665-681.
- KURTENBACH, K., KAMPEN, H., DIZIJ, A., ARNDT, S., SEITZ, H. M., SCHAIBLE, U. E., SIMON, M. M. 1995.** Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *J Med Entomol* 32: 807-817.
- KURTENBACH, K., CAREY, D., HOODLESS, A. N., NUTTALL, P. A., RANDOLPH, S. E. 1998a.** Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol* 35: 77-81.
- KURTENBACH, K., PEACEY, M., RIJKEMA, S. G., HOODLESS, A. N., NUTTALL, P. A., RANDOLPH, S. E. 1998b.** Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol* 64: 1169-1174.
- KURTENBACH, K., SEWELL, H. S., OGDEN, N. H., RANDOLPH, S. E., NUTTALL, P. A. 1998c.** Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun* 66: 1248-1251.
- KURTENBACH, K., DE MICHELIS, S., SEWELL, H. S., ETTI, S., SCHAFFER, S. M., HAILS, R., COLLARES-PEREIRA, M., SANTOS-REIS, M., HANINCOVÁ, K., LABUDA, M., BORMANE, A., DONAGHY, M. 2001.** Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol* 67: 4926-4929.
- KURTENBACH, K., SCHAFFER, S. M., DE MICHELIS, S., ETTI, S., SEWELL, H. S. 2002.** *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host. In J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek [eds.]. Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, 117-148. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.

- LANDBO, A. S., FLONG, P. T. 1992. *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes ricinus* from habitats in Denmark. *Med Vet Entomol* 6: 165-167.
- LE FLÈCHE, A., POSTIC, D., GIRARDET, K., PÉTER, O., BARANTON, G. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 47: 921-925.
- LEBET, N., GERN, L. 1994. Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp Appl Acarol* 18: 177-183.
- LEVINE, J. F., WILSON, M. L., SPIELMAN, A. 1985. Mice as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *Am J Trop Med Hyg* 34: 355-360.
- LINDGREN, E., TÄLLEKLINT, L., POLFELDT, T. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* 108: 119-123.
- LIPSCHÜTZ, B. 1913. Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Arch Dermatol Syph* 118: 349-356.
- LOMMANO, E. 2005. Densité d'*Ixodes ricinus* et prévalence de l'agent de la borréliose de Lyme dans le canton de Fribourg en 2004-2005. Travail de Master. Laboratoire d'Éco-épidémiologie des Parasites. Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- MACLEOD, J. 1934. *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment: the influence of climate on development. 26: 282-305. *Parasitology* 26: 282-305.
- MARASPIN, V., RUZIC-SABLJIC, E., STRLE, F. 2006. Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. *Emerg Infect Dis* 12: 1177.
- MATERNA, J., DANIEL, M., DANIELOVÁ, V. 2005. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* 13: 24-28.
- MATUSCHKA, F. R., FISCHER, P., HEILER, M., RICHTER, D., SPIELMAN, A. 1992. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* 165: 479-483.
- MATUSCHKA, F. R., HEILER, M., EIFFERT, H., FISCHER, P., LOTTER, H., SPIELMAN, A. 1993. Diversionary role of hoofed game in the transmission of Lyme disease spirochetes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 693-699.
- MATUSCHKA, F. R., EIFFERT, H., OHLENBUSCH, A., SPIELMAN, A. 1994. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. *J Infect Dis* 170: 122-127.
- MATUSCHKA, F. R., KLUG, B., SCHINKEL, T. W., SPIELMAN, A., RICHTER, D. 1998. Diversity of European Lyme disease spirochetes at the southern margin of their range. *Appl Environ Microbiol* 64: 1980-1982.
- MATUSCHKA, F. R., ALLGOWER, R., SPIELMAN, A., RICHTER, D. 1999. Characteristics of garden dormice that contribute to their capacity as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *Appl Environ Microbiol* 65: 707-711.
- MEJLON, H. A., JAENSON, T. G. 1993. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. *Scand J Infect Dis* 25: 449-456.
- MEJLON, H. A., JAENSON, T. G. T. 1997. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 21: 747-754.
- MERMOD, C., AESCHLIMANN, A., GRAF, J. F. 1973. Écologie et éthologie d'*Ixodes ricinus* Linné 1758, en Suisse (Acarina, Ixodoidea). Première note: fluctuations numériques. *Acarologia* 15: 197-205.
- MERMOD, C., AESCHLIMANN, A., GRAF, J. F. 1974. Écologie et éthologie d'*Ixodes ricinus* L. en Suisse. Deuxième note: Comparaison des populations 1972 et 1973. *Acarologia* 16: 612-620.
- MICHEL, H., WILSKÉ, B., HETTICHE, G., GOTTFNER, G., HEIMERL, C., REISCHL, U., SCHULTE-SPECHTEL, U., FINGERLE, V. 2003. An *ospA*-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for

- sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and OspA types. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 193: 219-226.
- MISEREZ, V., GERN, L., AESCHLIMANN, A. 1990. *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). *Parasitologia* 32: 293-299.
- MIZAK, B., KROL, J. 2000. Analysis of Polish isolates of *Borrelia burgdorferi* by amplification of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer. *Bull Vet Inst Pulawy* 44: 147-154.
- MONIN, R., GERN, L., AESCHLIMANN, A. 1989. A study of the different modes of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*. *Lyme Borreliosis II, Zentbl Bakt suppl.* 18: 14-20.
- MORÁN CADENAS, F., RAIS, O., JOUDA, F., DOUET, V., HUMAIR, P.-F., MORET, J., GERN, L. 2007. Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J Med Entomol* 44: 683-693.
- MORÁN CADENAS, F., RAIS, O., HUMAIR, P.-F., DOUET, V., MORET, J., GERN, L. *In press a*. Identification of host blood meal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J Med Entomol*.
- MORÁN CADENAS, F., SCHNEIDER, H., LOMMANO, E., BURRI, C., MORET, J., GERN, L. *In press b*. A Comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and Reverse Line Blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
- NAKAO, M., MIYAMOTO, K., FUKUNAGA, M. 1994. Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. *J Infect Dis* 170: 878-882.
- NAKAO, M., MIYAMOTO, K. 1995. Mixed infection of different *Borrelia* species among *Apodemus speciosus* mice in Hokkaido, Japan. *J Clin Microbiol* 33: 490-492.
- NEFEDOVA, V. V., KORENBERG, E. I., ANDREICHUK IU, V., GORELOVA, N. B., MARKOV, A. V., FADEEVA, I. A., EVSTAF'EV, I. L. 2005. [Genetic characterization of pathogenic *Borrelia*, group A14S, isolated in Ukraine]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*: 23-27.
- NUTTALL, P. A., PAESEN, G. C., LAWRIE, C. H., HAJNICKÁ, V., FUCHSBERGER, N., WANG, H. 2001. Tick-host interactions in spirochete transmission. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- OGDEN, N. H., NUTTALL, P. A., RANDOLPH, S. E. 1997. Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitology* 115: 591-599.
- OLIVER, J. H., JR., STALLKNECHT, D., CHANDLER, F. W., JAMES, A. M., MCGUIRE, B. S., HOWERTH, E. 1992. Detection of *Borrelia burgdorferi* in laboratory-reared *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) fed on experimentally inoculated white-tailed deer. *J Med Entomol* 29: 980-984.
- OLSEN, B., JAENSON, T. G., NOPPA, L., BUNIKIS, J., BERGSTRÖM, S. 1993. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* 362: 340-342.
- OLSEN, B., JAENSON, T. G., BERGSTRÖM, S. 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 61: 3082-3087.
- OSTFELD, R. S., SCHAUBER, E. M., CANHAM, C. D., KEESING, F., JONES, C. G., WOLFF, J. O. 2001. Effects of acorn production and mouse abundance on abundance and *Borrelia burgdorferi* infection prevalence of nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 1: 55-63.
- PAL, U., DE SILVA, A. M., MONTGOMERY, R. R., FISH, D., ANGUITA, J., ANDERSON, J. F., LOBET, Y., FIKRIG, E. 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest* 106: 561-569.
- PAROLA, P., RAOULT, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 32: 897-928.
- PERKINS, S. E., CATTADORI, I. M., TAGLIAPIETRA, V., RIZZOLI, A. P., HUDSON, P. J. 2006. Localized deer absence leads to tick amplification. *Ecology* 87: 1981-1986.

- PERRET, J.-L., GUIGOZ, E., RAIS, O., GERN, L. 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res* 86: 554-557.
- PERRET, J.-L. 2003. Computer-assisted laboratory observations and field studies of the host-finding behaviour of the tick *Ixodes ricinus* (Acarina: Ixodidae): ecological implications of climate and light. Thèse, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- PERRET, J.-L., GUERIN, P. M., DIEHL, P. A., VLIMANT, M., GERN, L. 2003. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol* 206: 1809-1815.
- PERRET, J.-L., RAIS, O., GERN, L. 2004. Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *J Med Entomol* 41: 361-365.
- PÉTER, O. 1990. Lyme borreliosis in the state of Valais, Switzerland. *J Int Fed Clin Chem* 2: 121-123.
- PÉTER, O., BRETZ, A. G., BEE, D. 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodid ticks of Valais, Switzerland. *Eur J Epidemiol* 11: 463-467.
- PICHON, B., GILOT, B., PÉREZ-EID, C. 2000. Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. *Eur J Epidemiol* 16: 869-873.
- PICHON, B., EGAN, D., ROGERS, M., GRAY, J. 2003. Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 40: 723-731.
- PICHON, B., ROGERS, M., EGAN, D., GRAY, J. 2005. Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 172-180.
- PICHON, B., KAHL, O., HAMMER, B., GRAY, J. S. 2006. Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6: 382-387.
- PIESMAN, J., MATHER, T. N., SINSKY, R. J., SPIELMAN, A. 1987. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 25: 557-558.
- 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. 1993. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J Infect Dis* 167: 1082-1085.
- PIESMAN, J. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North America. In J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek [eds.]. Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, 223-249. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- PIESMAN, J., GERN, L. 2004. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 129 Suppl: S191-220.
- POSTIC, D., ASSOUS, M. V., GRIMONT, P. A., BARANTON, G. 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., ASSOUS, M., BELFAIZA, J., BARANTON, G. 1996. Genetic diversity of *Borrelia* of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 108: 748-751.
- POSTIC, D., KORENBERG, E., GORELOVA, N., KOVALEVSKI, Y. V., BELLENGER, E., BARANTON, G. 1997. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res Microbiol* 148: 691-702.
- POSTIC, D., RAS, N. M., LANE, R. S., HENDSON, M., BARANTON, G. 1998. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol* 36: 3497-3504.
- POUPON, M.-A., LOMMANO, E., HUMAIR, P.-F., DOUET, V., RAIS, O., SCHAAD, M., JENNI, L., GERN, L. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 72: 976-979.

- QUESSADA, T., MARTIAL-CONVERT, F., ARNAUD, S., LEUDET DE LA VALLEE, H., GILOT, B., PICHOT, J. 2003. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* species and identification of *Borrelia valaisiana* in questing *Ixodes ricinus* in the Lyon region of France as determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 165-173.
- RANDOLPH, S. E., GERN, L., NUTTALL, P. A. 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today* 12: 472-479.
- RANDOLPH, S. E., STOREY, K. 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *J Med Entomol* 36: 741-748.
- RANDOLPH, S. E. 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 1045-1056.
- RANDOLPH, S. E., GREEN, R. M., HOODLESS, A. N., PEACEY, M. F. 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 32: 979-989.
- RANDOLPH, S. E. 2004a. Evidence that climate change has caused 'emergence' of tick-borne diseases in Europe? *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 5-15.
- RANDOLPH, S. E. 2004b. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by Ixodid ticks as vectors. *Parasitology* 129 Suppl: S37-65.
- RAUTER, C., OEHME, R., DITERICH, I., ENGELE, M., HARTUNG, T. 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40: 36-43.
- RAUTER, C., HARTUNG, T. 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 7203-7216.
- REBETEZ, M., MAYER, H., DUPONT, O., SCHINDLER, D., GARTNER, K., KROPP, J. P., MENZEL, A. 2006. Heat and drought in Europe: a climate synthesis. *Ann For Sci* 63: 569-577.
- RIBEIRO, J. M., MATHER, T. N., PIESMAN, J., SPIELMAN, A. 1987. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 24: 201-205.
- RICHTER, D., SCHLEE, D. B., MATUSCHKA, F. R. 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis* 9: 697-701.
- RICHTER, D., SCHLEE, D. B., ALLGOWER, R., MATUSCHKA, F. R. 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 70: 6414-6419.
- RICHTER, D., POSTIC, D., SERTOUR, N., LIVEY, I., MATUSCHKA, F. R., BARANTON, G. 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 873-881.
- RIJPKEMA, S., NIEUWENHUIJS, J., FRANSSEN, F. F., JONGEJAN, F. 1994. Infection rates of *Borrelia burgdorferi* in different instars of *Ixodes ricinus* ticks from the Dutch North Sea Island of Ameland. *Exp Appl Acarol* 18: 531-542.
- RIJPKEMA, S., GOLUBIC, D., MOLKENBOER, M., VERBEEK-DE KRUIF, N., SCHELLEKENS, J. 1996a. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol* 20: 23-30.
- RIJPKEMA, S. G., MOLKENBOER, M. J., SCHOOLS, L. M., JONGEJAN, F., SCHELLEKENS, J. F. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 33: 3091-3095.
- RIJPKEMA, S. G., HERBES, R. G., VERBEEK-DE KRUIF, N., SCHELLEKENS, J. F. 1996b. Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 117: 563-566.

- RIJPKEMA, S. G., TAZELAAR, D. J., MOLKENBOER, M. J., NOORDHOEK, G. T., PLANTINGA, G., SCHOOLS, L. M., SCHELLEKENS, J. F. 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 3: 109-116.
- RIZZOLI, A., MERLER, S., FURLANELLO, C., GENCHI, C. 2002. Geographical information systems and bootstrap aggregation (bagging) of tree-based classifiers for Lyme disease risk prediction in Trentino, Italian Alps. *J Med Entomol* 39: 485-492.
- RYFFEL, K., PÉTER, O., RUTTI, B., SUARD, A., DAYER, E. 1999. Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. *J Clin Microbiol* 37: 4086-4092.
- SAINT GIRONS, I., GERN, L., GRAY, J. S., GUY, E. C., KORENBERG, E., NUTTALL, P. A., RIJPKEMA, S. G., SCHONBERG, A., STANEK, G., POSTIC, D. 1998. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zentralbl Bakteriol* 287: 190-195.
- SARIH, M., JOUDA, F., GERN, L., POSTIC, D. 2003. First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3: 133-139.
- SATO, Y., MIYAMOTO, K., IWAKI, A., MASUZAWA, T., YANAGIHARA, Y., KORENBERG, E. I., GORELOVA, N. B., VOLKOV, V. I., IVANOV, L. I., LIBEROVA, R. N. 1996. Prevalence of Lyme disease spirochetes in *Ixodes persulcatus* and wild rodents in far eastern Russia. *Appl Environ Microbiol* 62: 3887-3889.
- SATO, Y., NAKAO, M. 1997. Transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected immature *Ixodes persulcatus* during cofeeding on mice. *J Parasitol* 83: 547-550.
- SCHAUBER, E. M., OSTFELD, R. S., EVANS, A. S. 2005. What is the best predictor of annual Lyme disease incidence: weather, mice, or acorns? *Ecological Applications* 15: 575-586.
- SCHNEIDER, H. 2005. Étude de la population de tiques *Ixodes ricinus* et de la prévalence de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, agent pathogène de la maladie de Lyme, dans le canton du Jura. Travail de Master. Laboratoire d'Éco-épidémiologie des Parasites. Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- SCHOOLS, L. M., VAN DE POL, I., RIJPKEMA, S. G., SCHOT, C. S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 37: 2215-2222.
- SCHULZE, T. L., JORDAN, R. A. 1996. Seasonal and long-term variations in abundance of adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in different coastal plain habitats of New Jersey. *J Med Entomol* 33: 963-970.
- SCHWAN, T. G., BURGDORFER, W. 1987. Antigenic changes of *Borrelia burgdorferi* as a result of in vitro cultivation. *J Infect Dis* 156: 852-853.
- SCHWAN, T. G., PIESMAN, J., GOLDE, W. T., DOLAN, M. C., ROSA, P. A. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2909-2913.
- SCHWAN, T. G., PIESMAN, J. 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 38: 382-388.
- SCHWARTZ, J. J., GAZUMYAN, A., SCHWARTZ, I. 1992. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 174: 3757-3765.
- SINSKY, R. J., PIESMAN, J. 1989. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J Clin Microbiol* 27: 1723-1727.
- STEELE, G. M., RANDOLPH, S. E. 1985. An experimental evaluation of conventional control measures against the sheep tick, *Ixodes ricinus* (L.) (Acari: Ixodidae). I. A unimodal seasonal activity pattern. *Bull Ent Res* 12: 489-499.
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E., SNYDMAN, D. R., SHOPE, R. E., ANDIMAN, W. A., ROSS, M. R., STEELE, F. M. 1977. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20: 7-17.

- STEERE, A. C., BRODERICK, T. F., MALAWISTA, S. E. 1978a. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am J Epidemiol* 108: 312-321.
- STEERE, A. C., HARDIN, J. A., MALAWISTA, S. E. 1978b. Lyme arthritis: a new clinical entity. *Hosp Pract* 13: 143-158.
- STEERE, A. C. 1989. Lyme disease. *N Engl J Med* 321: 586-596.
- TÄLLEKLINT, L., JAENSON, T. G. 1993. Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents. *J Med Entomol* 30: 273-276.
- TÄLLEKLINT, L., JAENSON, T. G. 1994. Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *J Med Entomol* 31: 880-886.
- TÄLLEKLINT, L., JAENSON, T. G. 1995. Is the small mammal (*Clethrionomys glareolus*) or the tick vector (*Ixodes ricinus*) the primary overwintering reservoir for the Lyme borreliosis spirochete in Sweden? *J Wildl Dis* 31: 537-540.
- TÄLLEKLINT, L., JAENSON, T. G. 1996. Seasonal variations in density of questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) nymphs and prevalence of infection with *B. burgdorferi* s.l. in south central Sweden. *J Med Entomol* 33: 592-597.
- TÄLLEKLINT, L., JAENSON, T. G. 1998. Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in central and northern Sweden. *J Med Entomol* 35: 521-526.
- TELFORD 3RD, S. R., MATHER, T. N., MOORE, S. I., WILSON, M. L., SPIELMAN, A. 1988. Incompetence of deer as reservoirs of *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci* 539: 429-430.
- VAN DAM, A. P., KUIPER, H., VOS, K., WIDJOJOKUSUMO, A., DE JONGH, B. M., SPANJAARD, L., RAMSELAAR, A. C., KRAMER, M. D., DANKERT, J. 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 17: 708-717.
- WALKER, A. R. 2001. Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bull Entomol Res* 91: 69-78.
- WALKER, J. B., KEIRANS, J. E., HORAK, I. G. 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world. Cambridge University Press, Cambridge.
- WANG, G., VAN DAM, A. P., LE FLÈCHE, A., POSTIC, D., PÉTER, O., BARANTON, G., DE BOER, R., SPANJAARD, L., DANKERT, J. 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., VAN DAM, A. P., SCHWARTZ, I., DANKERT, J. 1999a. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12: 633-653.
- WANG, G., VAN DAM, A. P., DANKERT, J. 1999b. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 37: 3025-3028.
- WIELINGA, P. R., GAASENBEEK, C., FONVILLE, M., DE BOER, A., DE VRIES, A., DIMMERS, W., AKKERHUIS OP JAGERS, G., SCHOOLS, L. M., BORGSTEEDE, F., VAN DER GIESSEN, J. W. 2006. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 72: 7594-7601.
- WILSKE, B., STEINHUBER, R., BERGMEISTER, H., FINGERLE, V., SCHIERZ, G., PREAC-MURSIC, V., VANEK, E., LORBEER, B. 1987. [Lyme borreliosis in South Germany. Epidemiologic data on the incidence of cases and on the epidemiology of ticks (*Ixodes ricinus*) carrying *Borrelia burgdorferi*]. *Dtsch Med Wochenschr* 112: 1730-1736.
- YOUNSI, H., POSTIC, D., BARANTON, G., BOUATTOR, A. 2001. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *Eur J Epidemiol* 17: 53-56.

- YOUNSI, H., SARIH, M., JOUDA, F., GODFROID, E., GERN, L., BOUATTOR, A., BARANTON, G., POSTIC, D. 2005.** Characterization of *Borrelia lusitaniae* isolates collected in Tunisia and Morocco. *J Clin Microbiol* 43: 1587-1593.
- YOUSFI-MONOD, R., AESCHLIMANN, A. 1986.** Recherches sur les tiques (Acarina, *Ixodidae*), parasites de bovidés dans l'Ouest algérien. I - Inventaire systématique et dynamique saisonnière. *Ann Parasitol Hum Comp* 61: 341-358.
- ZHIOUA, E., AESCHLIMANN, A., GERN, L. 1994.** Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J Med Entomol* 31: 763-766.
- ZHIOUA, E., POSTIC, D., RODHAIN, F., PÉREZ-EID, C. 1996.** Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) by *Borrelia burgdorferi* in Ile de France. *J Med Entomol* 33: 694-697.
- ZHIOUA, E., BOUATTOR, A., HU, C. M., GHARBI, M., AESCHLIMANN, A., GINSBERG, H. S., GERN, L. 1999.** Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. *J Med Entomol* 36: 216-218.

7 REMERCIEMENTS

Un grand merci du fond du cœur à toutes les personnes qui m'ont témoigné leur confiance, leur soutien, leur encouragement et leur amitié ces dernières années et qui ont permis que cette thèse voit le jour.

Tout d'abord je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude au Dr Lise Gern, directrice de cette thèse, qui m'a accueillie dans le "groupe Lyme" et qui m'a soutenue, encouragée et stimulée tout au long de ce chemin que nous avons fait ensemble.

Mille fois merci Lise, pour ton écoute, pour ta proximité, pour ta compréhension, pour ton dévouement, pour ta disponibilité, spécialement dans les moments difficiles, et pour le baume de tes paroles... T'es vraiment *fantas-tique*!

Mes sincères remerciements au Prof. Bruno Betschart pour sa *poli-tique* d'ouverture du laboratoire de parasitologie, qui m'a engagée comme assistante et qui a eu pleinement confiance dans mon travail.

Toute ma reconnaissance au Dr Danièle Postic (Institut Pasteur, Paris) et aux Prof. Peter-Allan Diehl (UniNE) et Jean-Claude Piffaretti (UniGE), qui ont aimablement accepté l'invitation pour faire partie de mon jury de thèse. Merci pour toutes les suggestions et bonnes *cri-tiques* qui ont enrichi ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Arthur Fiechter et les gardes du Service de la Faune de Neuchâtel pour leur cordialité et le support *faunis-tique* ainsi que le Muséum d'Histoire Naturelle de Neuchâtel.

Merci à la commune de Fenin pour l'autorisation de circuler sur les sentiers qui menaient à Chaumont nord.

Merci à MétéoSuisse, pour toutes les données *clima-tiques*.

Mon souvenir à l'ancien préparateur M. Nemitz, pour son caractère affable et son bon travail.

Merci à Brigitte et Natacha, les meilleures secrétaires de l'ex-Institut de Zoologie, qui se sont occupées à merveille de toutes les tâches *bureau-tiques* pour le bon déroulement de mon travail.

Merci à Josiane, notre "*bibliotiquère*" particulière, toujours disponible et efficace pour arriver au bout de nos recherches bibliographiques.

Merci Michèle d'être si *sympa-thique* et serviable, merci pour ton savoir-faire, pour toutes les belles images et ton excellente *op-tique*.

Merci Jacqueline pour toute l'aide *statis-tique*, pour ta disponibilité, pour la bonne musique et la verdure de ton bureau.

Merci Luis pour ta gentillesse et ton bonjour *Iusitaniae* matinal.

Merci Caro pour ton amitié et ta spontanéité, la touche *exo-tique/asia-tique* du labo, le rayon de soleil (valaisan, bien sûr!) quotidien, pour ton magnifique travail qui a séduit les jurys de divers prix, et pour la quantité d'expériences partagées. Merci pour le bon goût de "*La Mia Follia*" et pour le(a) filleul(e) à venir.

Un immense merci à Pitou, le pilier du labo, le plus *charisma-tique*. Merci pour ton grand cœur, ta patience, ton esprit malin et pour ton ardeur dans la récolte des tiques à Chaumont sud. 2094 fois merci, Olivier!

Merci Véronique pour ta facette *didac-tique*, pour les discussions enrichissantes et les nombreux conseils, pour l'initiation dans le mystérieux monde des techniques moléculaires.

Merci Fatima pour être pionnière dans la voie du gradient et pour ta précieuse aide au labo. Chapeau pour ton sourire, ton courage et ta détermination, une *tac-tique* exemplaire.

Merci Hélène et Elena pour vos données du Jura et de Fribourg dans notre projet *journalis-tique*.

Un grand merci à Mara, Steve, Delphine, Violaine et Carine pour toutes les heures partagées avec les étudiants durant les travaux *pra-tiques* du bachelor de Biologie et du master de Parasitologie.

Merci aux colocataires latins du bureau: David, la note *acous-tique* et Gab, la touche *acroba-tique*.

Merci à Romain et Reno, pour tous les (bons ??) moments passés autour de l'*informa-tique*.

Merci aux apprentis du labo, spécialement à l'*énerg(ét-)ique* Ludivine qui m'a aidé avec certaines expériences et à l'*athlé-tique* Nadège, qui m'a accompagnée sur le terrain.

Merci aux collaborateurs de parasitologie (Nico, Mirko, Viktoria, Eva, Emilie, Maude, Nathalie, Jean-Christophe, les deux Christian, Aline, Simon, Aryan, ...), pour la diversité culturelle, la bonne humeur, pour les nombreux cafés "*scienti-tiques*" partagés et aussi pour les discussions moins bêtes.

Merci aux anciens collègues du laboratoire, Jean-Luc, Pierre-François, Susana, Chang Min, qui m'ont apporté énormément de bonnes lectures sur la *théma-tique* de leurs recherches.

Merci aussi à mon cher Javier, le plus *scep-tique* de mes profs, qui m'a motivé à continuer mes études quand j'en avais décidé autrement.

Merci à Irene, Mary, Monchi, Esteban et tous mes amis *cel-tiques*, qui ont été surpris d'apprendre mon engagement auprès des tiques et qui seront contents de fêter la fin de cette histoire.

Le plus tendre et *roman-tique* de mes remerciements est pour José, complice de cette aventure *helvé-tique*, associé, compagnon, collaborateur et témoin de cette réussite, qui m'a supportée, soutenue et encouragée durant toutes ces années, à la maison et aussi sur le terrain. Qui a vu accompli son rêve d'être entouré de nymphes et qui a succombé aux piqûres des femelles. Va por til!

Toute mon affection et tendresse pour ma famille chérie qui me manque autant et qui vit paisiblement dans ce coin de paradis (Asturias) *atlan-tique*. À mon papa et ma maman, à Toni, María, Manoli, Jesús et spécialement à Andrea et Alvaro, mis dos gandules preferidos. Gracias por el inmenso cariño y confianza que me habéis brindado todos estos años.

Et enfin un clin d'œil à la langue française qui m'a permis ce geste *linguis-tique*, impossible autrement en espagnol. Que faire avec des *garrapatas* !

8 ANNEXE 1

8.1 APPAREILS

Mini-thermomètre et thermo-hygromètre mod. 615. Testo AG (Suisse). www.testo.ch

Thermocycleur Biometra TGradient. Biometra, Göttingen (Allemagne). www.biometra.de

Mini-four à hybridation OV1. Biometra, Göttingen (Allemagne). www.biometra.de

Four à hybridation/agitateur. Amersham Pharmacia Biotech. www.gelifesciences.com

Miniblotter MN45. Immunetics, (Cambridge, Mass.). www.immunetics.com

8.2 PRODUITS PCR

Taq DNA Polymerase 1000U. Qiagen, n° de produit 201205. www.qiagen.com

dNTP's 100 mM. Promega, n° de produit U1420. www.promega.com

Amorces 23S Bor, B-5S Bor, 12S 6F et B-12S 9R. Microsynth (Suisse). www.microsynth.ch

H₂O (DEPC-treated). Fluka, n° de produit 95284. www.sigmaaldrich.com

8.3 PRODUITS RLB

Sondes pour l'identification de *Borrelia* sp et de l'ADN des hôtes. Microsynth. www.microsynth.ch

Biodyne C Membrane. VWR International, n° de produit 60314. www.vwr.com

Plastic cushions. Immunetics (DMD AG, Suisse), n° de produit PC 200. www.immunetics.com

20X SSPE buffer. Invitrogen, n° de produit 15591035. www.invitrogen.com

SDS. BDH-Reactolab. www.reactolab.ch

Streptavidine-POD conjugué 500U. Roche, n° de produit 11 089 153 001. www.roche.ch

ECL Detection Reagents. GE Healthcare Europe GmbH, Otelfingen (Suisse), n° de produit RPN2105. www.gelifesciences.com

Hyperfilm ECL 18x24 cm, 25 sh. GE Healthcare Europe GmbH, Otelfingen (Suisse), n° de produit 28906836. www.gelifesciences.com

DNAzap. Ambion, n° de produit AM9890. www.ambion.com

8.4 SOLUTIONS

8.4.1 EDAC 16%

Dissoudre 1,6 g d'EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) dans 10 ml d'eau.

8.4.2 EDTA 20 mM pH=8

Dissoudre 7,4 g d'EDTA dans 800 ml d'eau. Ajuster le pH=8 avec NaOH 100 mM. Ajouter de l'eau jusqu'à un volume final de 1 l. Bouillir 10 min. Stocker à température ambiante au maximum 1 an.

8.4.3 NaHCO₃ 0,5 M pH=8,4

Dissoudre 10,5 g de NaHCO₃ dans 240 ml d'eau. Ajuster le pH=8,4 avec NaOH 2 M. Ajouter de l'eau jusqu'à un volume total de 250 ml. Bouillir 10 min. Stocker à température ambiante au maximum 6 mois.

8.4.4 NaOH 10 M

Dissoudre 10 g de NaOH dans 25 ml d'eau. Stocker à température ambiante au maximum 1 mois.

8.4.5 SDS 10%

Dissoudre 10 g de SDS dans 100 ml d'eau. Chauffer la solution à 65° pour accélérer la réaction. Stocker à température ambiante au maximum 1 mois.

8.4.6 2x SSPE / SDS 0,1%

Produit	Quantité (100 ml)
20X SSPE	10 ml
SDS 10%	1 ml
H ₂ O	89 ml

8.4.7 2x SSPE / SDS 0,5%

Produit	Quantité (100 ml)
20X SSPE	10 ml
SDS 10%	5 ml
H ₂ O	85 ml

8.4.8 2x SSPE

Produit	Quantité (100 ml)
20X SSPE	10 ml
H ₂ O	90 ml

8.4.9 PBS MgCl₂ pH=7,2 – 7,3

Produit	Quantité (1l)
NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,45 g
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1g
H ₂ O	1l

9 ANNEXE 2

9.1 DONNÉES CLIMATIQUES

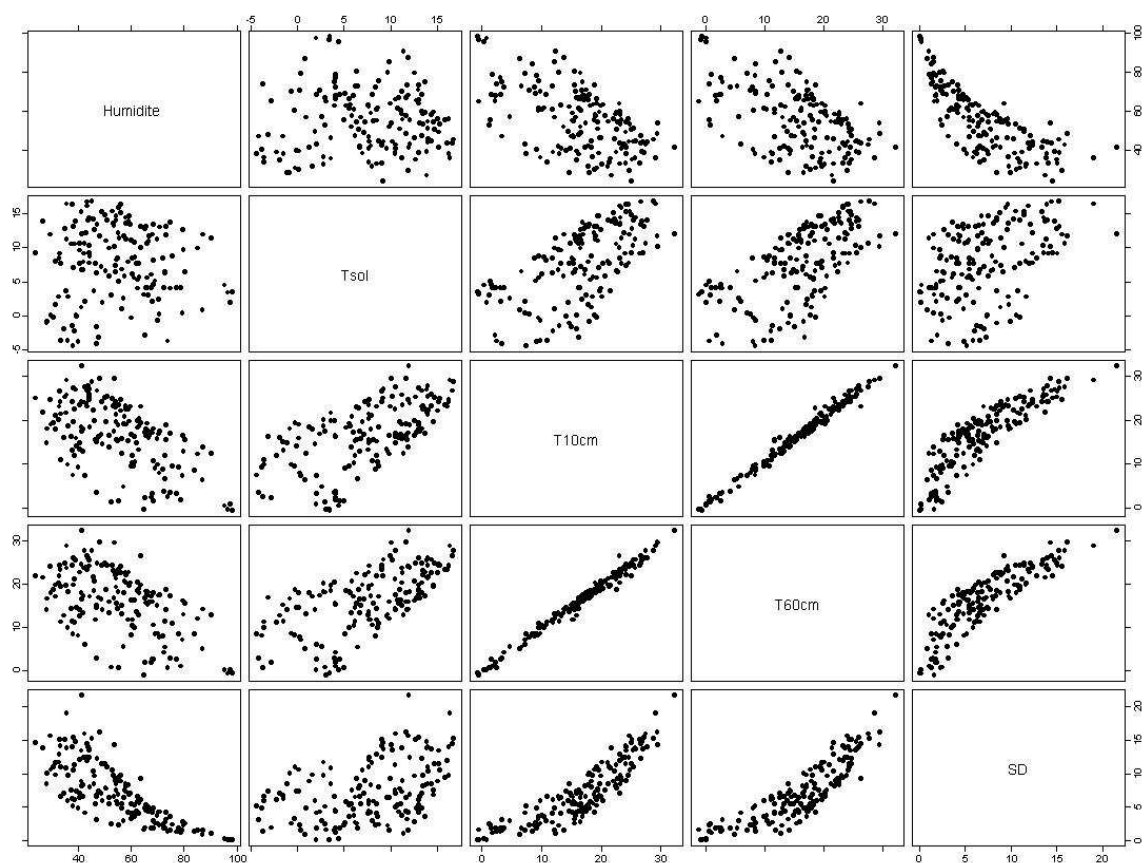


Fig. 1 Diagramme de dispersion des paires de facteurs environnementaux [humidité, température au sol (Tsol), température à 10 cm (T10cm), température à 60 cm (T60cm) et déficit de saturation (SD)] mesurés chaque mois à chaque station de récolte le long des gradients nord et sud de la montagne de Chaumont (NE) pendant la période 2003 à 2005.

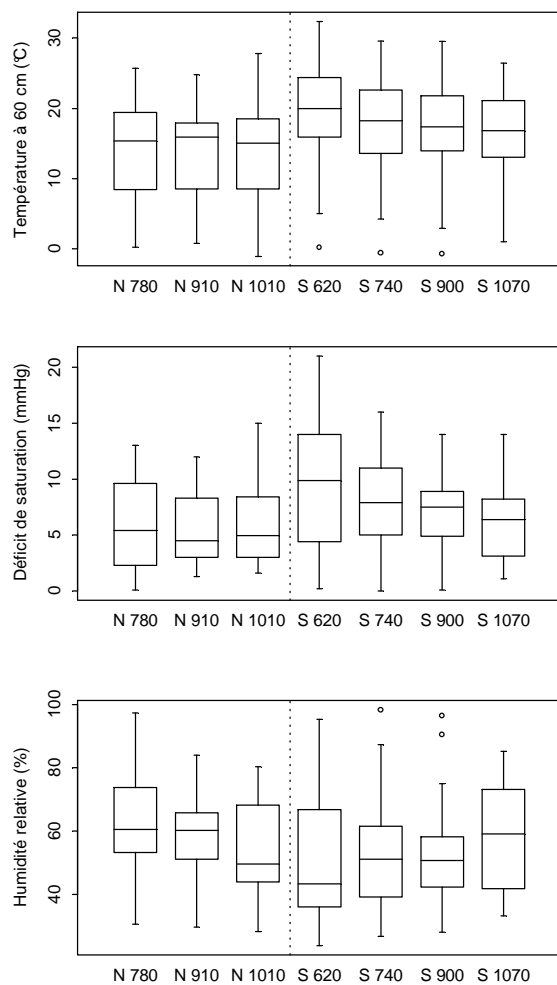


Fig. 2 Boxplots de la température mesurée à 60 cm (°C), du déficit de saturation (mmHg) et de l'humidité relative (%) en fonction des différentes zones d'études sur les gradients nord et sud de la montagne de Chaumont pendant la période 2003-2005.

N, gradient nord de Chaumont (altitudes entre 780 et 1010 m). S, gradient sud de Chaumont (altitudes entre 620 et 1070 m).

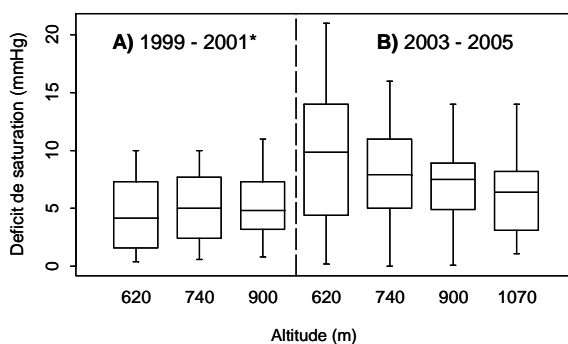


Fig. 3 Boxplot des déficits de saturation (mmHg) obtenus sur le gradient sud de Chaumont entre les deux périodes d'étude: 1999-2001 et 2003-2005.

*1999-2001, valeurs du déficit de saturation calculées à partir des données obtenues de Jouda *et al*/2004a.

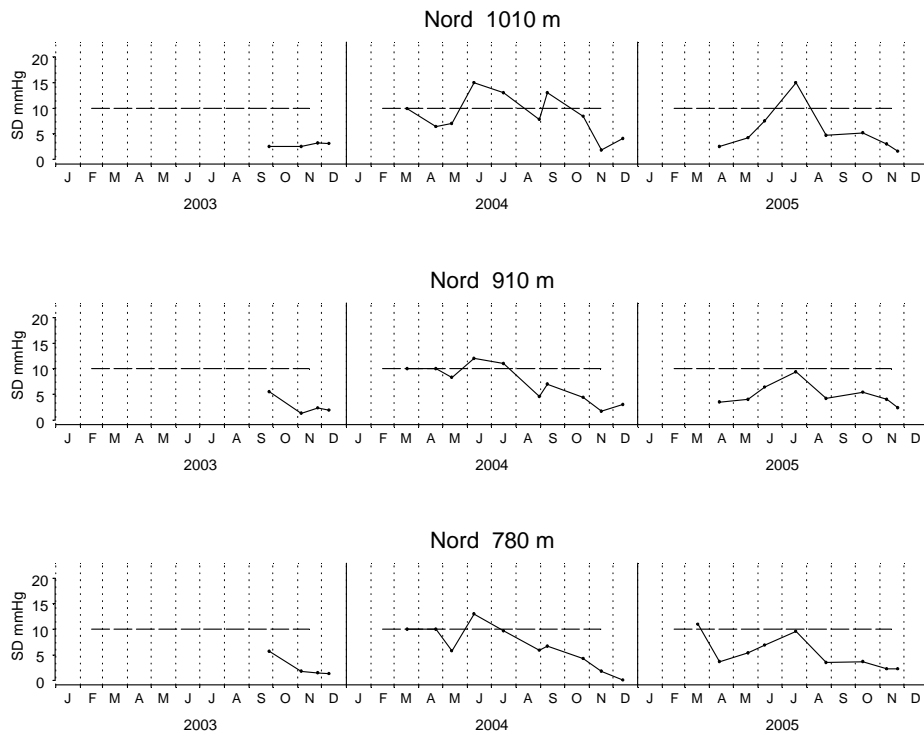


Fig. 4 Evolution saisonnière du déficit de saturation (SD, en mmHg) le long du gradient altitudinal (1010, 910 et 780 m) sur le versant nord de Chaumont pendant la période 2003-2005. La ligne traitillée indique le seuil de 10 mmHg.

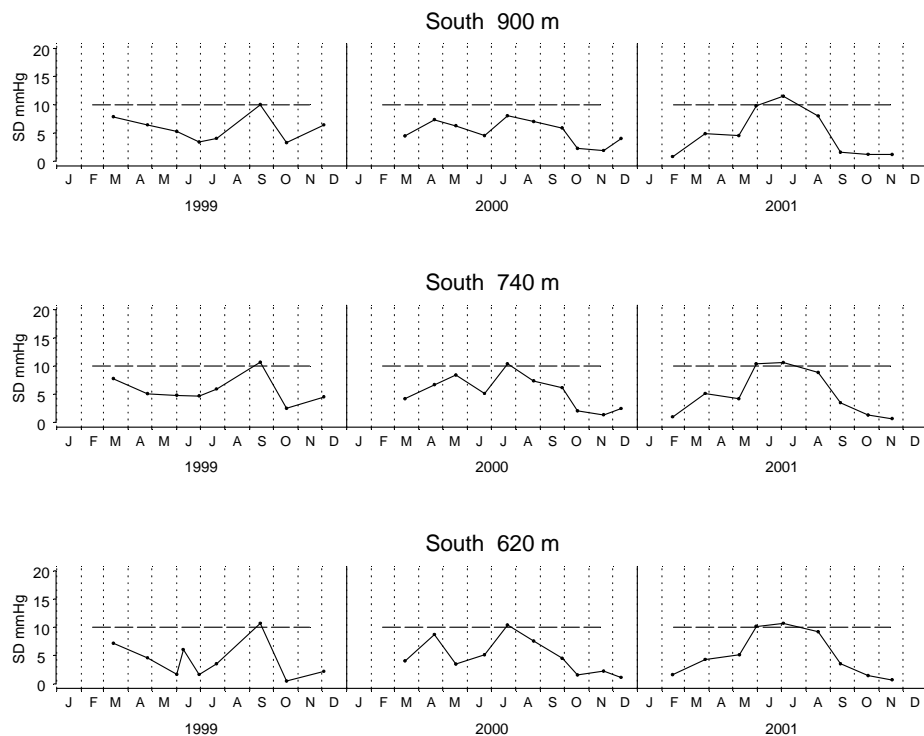


Fig. 5 Evolution saisonnière du déficit de saturation (SD, en mmHg) le long du gradient altitudinal (900, 740 et 620 m) sur le versant sud de Chaumont pendant la période 1999-2001*. La ligne traitillée indique le seuil de 10 mmHg. *1999-2001, valeurs du déficit de saturation calculées à partir des données obtenues de Jouda *et al*/2004a.

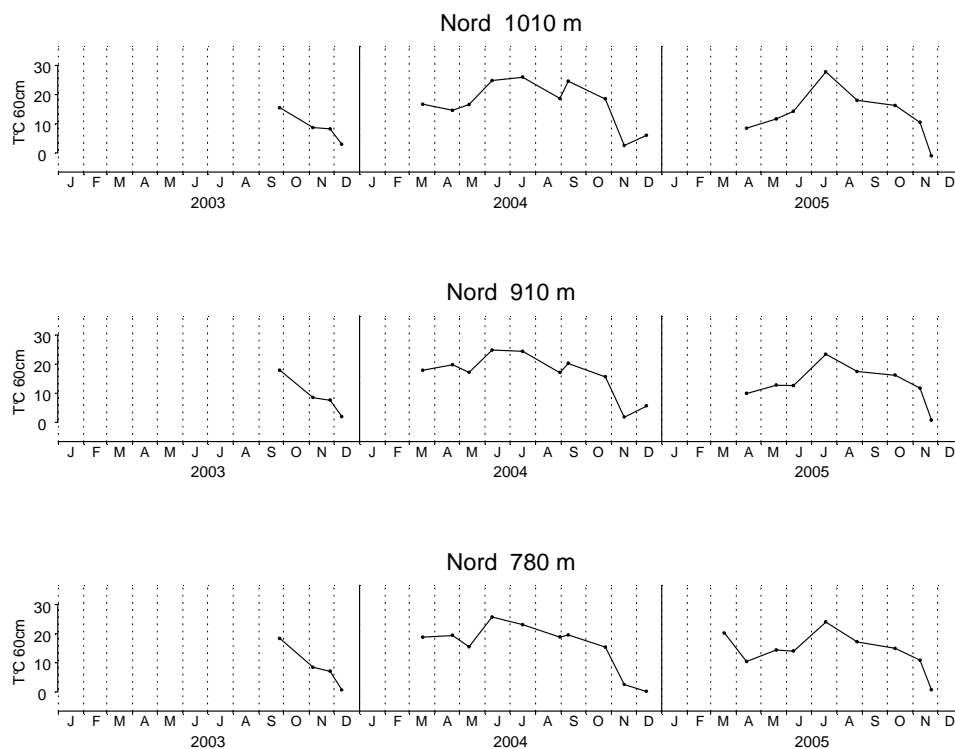


Fig. 6 Evolution saisonnière de la température mesurée à 60 cm (°C) le long du gradient altitudinal (1010, 910 et 780 m) sur le versant nord de Chaumont pendant la période 2003-2005.

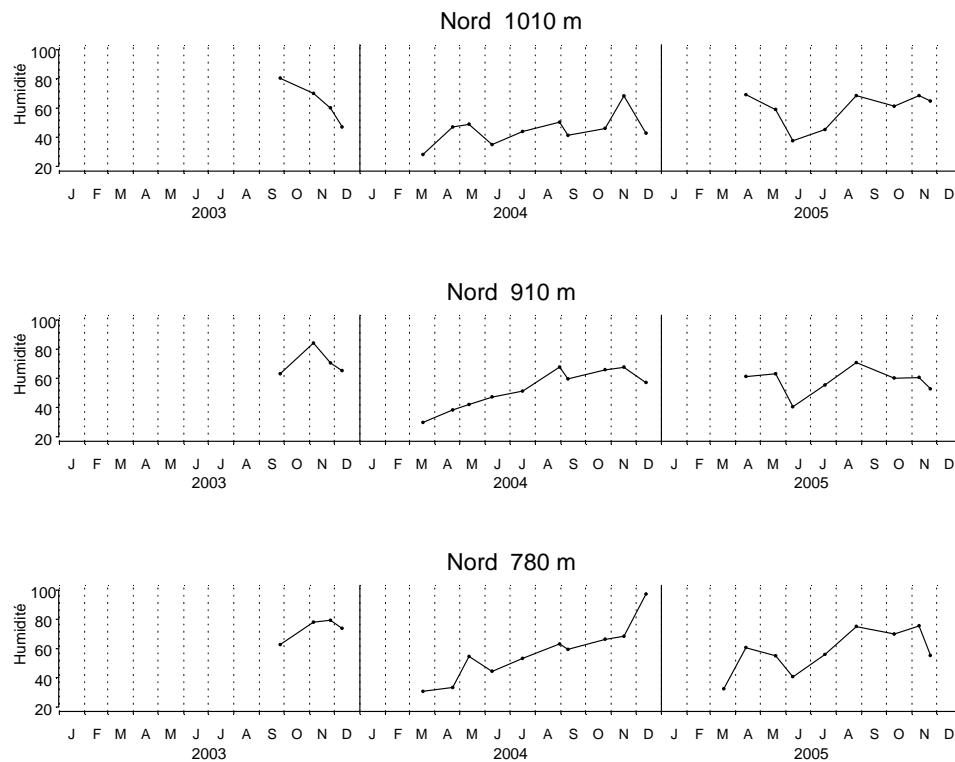


Fig. 7 Evolution saisonnière de l'humidité relative (%) le long du gradient altitudinal (1010, 910 et 780 m) sur le versant nord de Chaumont pendant la période 2003-2005.

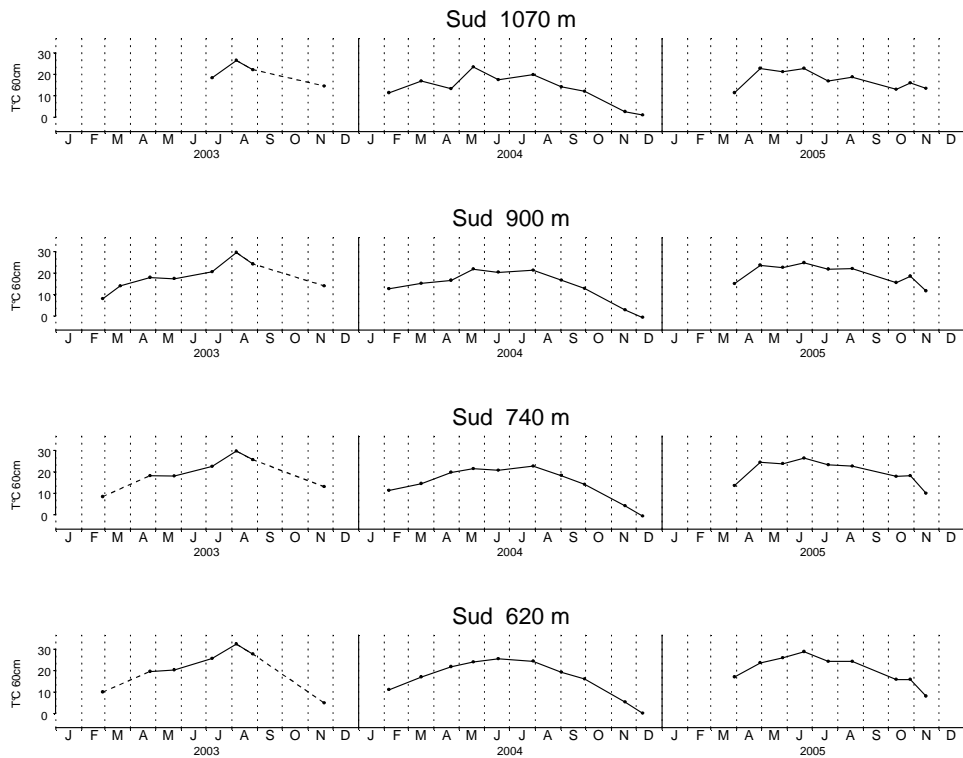


Fig. 8 Evolution saisonnière de la température mesurée à 60 cm (°C) le long du gradient altitudinal (1070, 900, 740 et 620 m) sur le versant sud de Chaumont pendant la période 2003-2005.

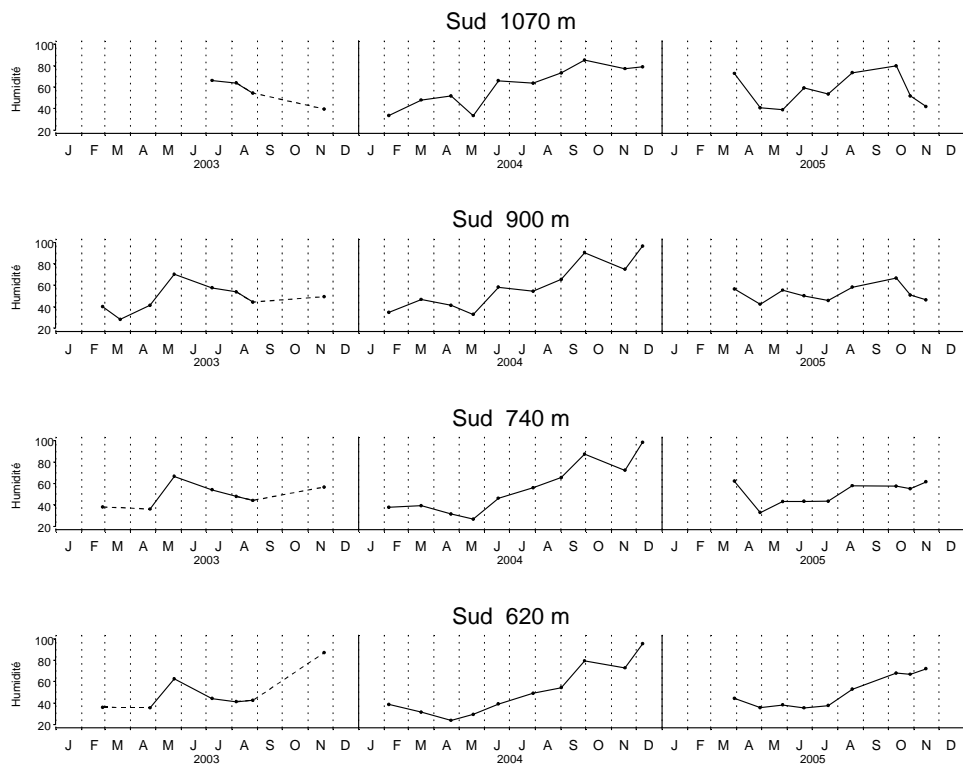


Fig. 9 Evolution saisonnière de l'humidité relative (%) le long du gradient altitudinal (1070, 900, 740 et 620 m) sur le versant sud de Chaumont pendant la période 2003-2005.

9.2 DENSITÉ ET PHÉNOLOGIE DES TIQUES

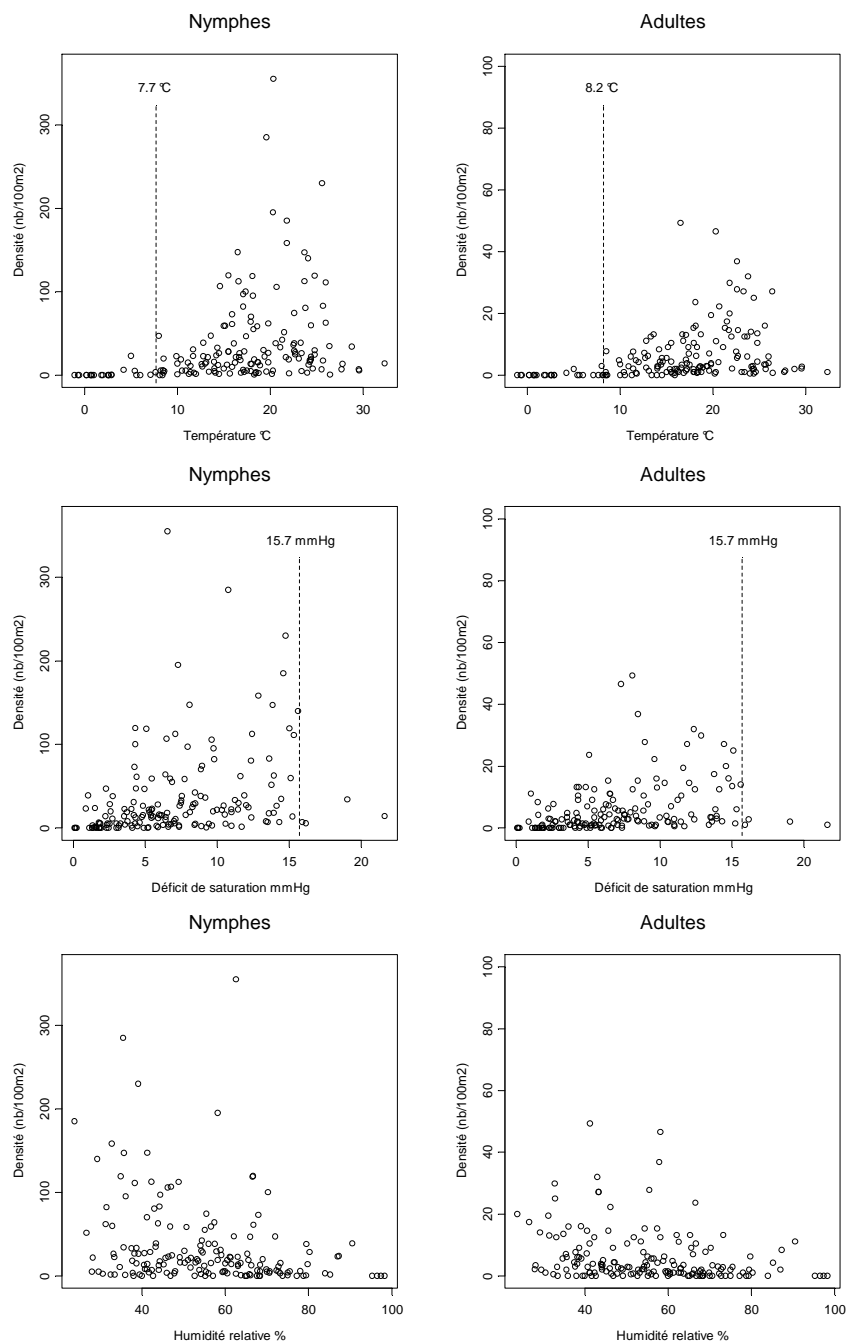


Fig. 10 Activité de quête des nymphes et des adultes (densité exprimée en nombre d'individus / 100 m²) sur l'ensemble des gradients nord et sud de la montagne de Chaumont pendant la période 2003-2005, en fonction de la température, du déficit de saturation et de l'humidité relative.

Les lignes pointillées à 7.7°C et 8.2°C indiquent les températures à partir desquelles la plupart de l'activité de quête des nymphes et des adultes, respectivement, a été observée.

Les lignes pointillées à 15.7 mmHg indiquent les valeurs du déficit de saturation à partir desquelles la plupart des nymphes et des adultes interrompent leur activité de quête.

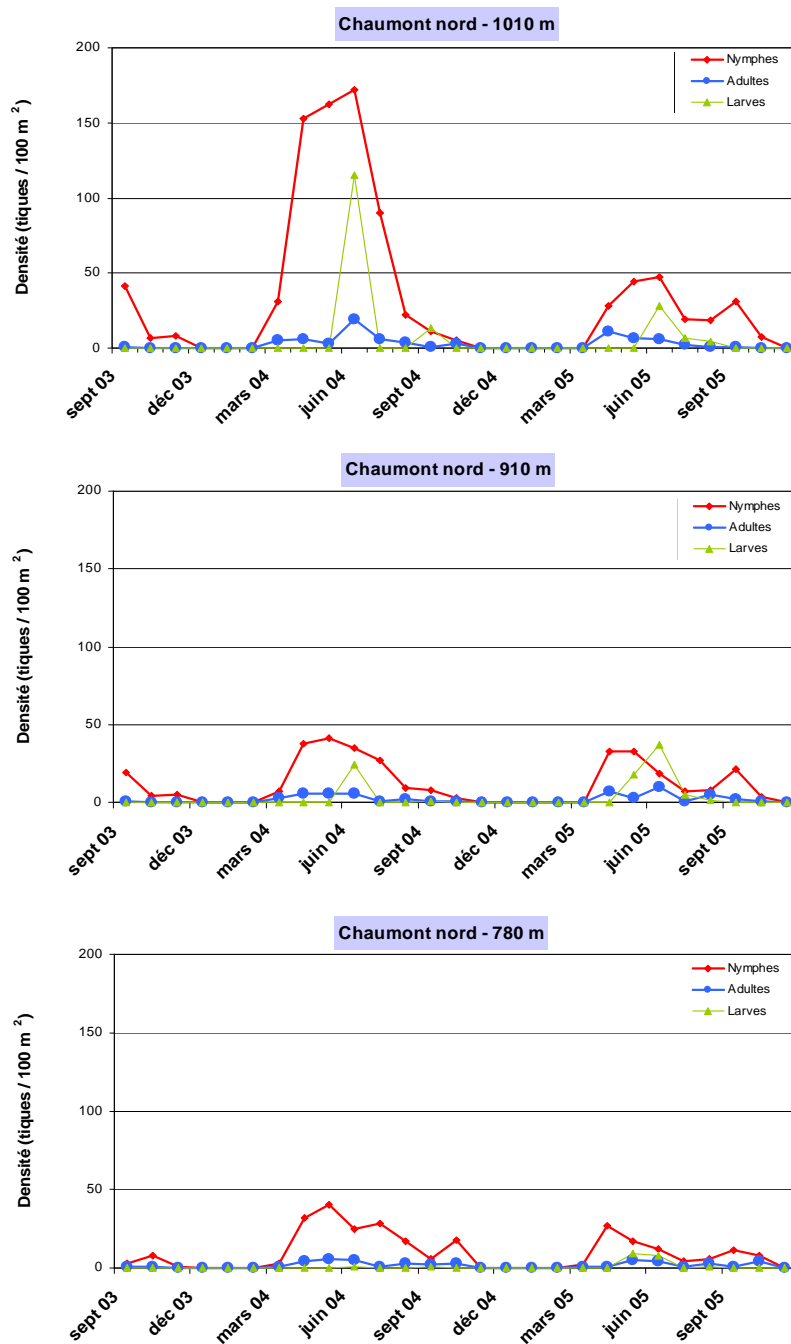
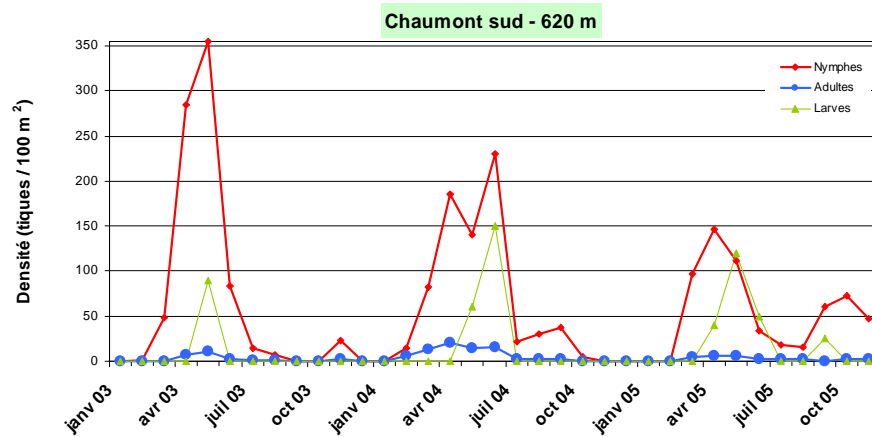
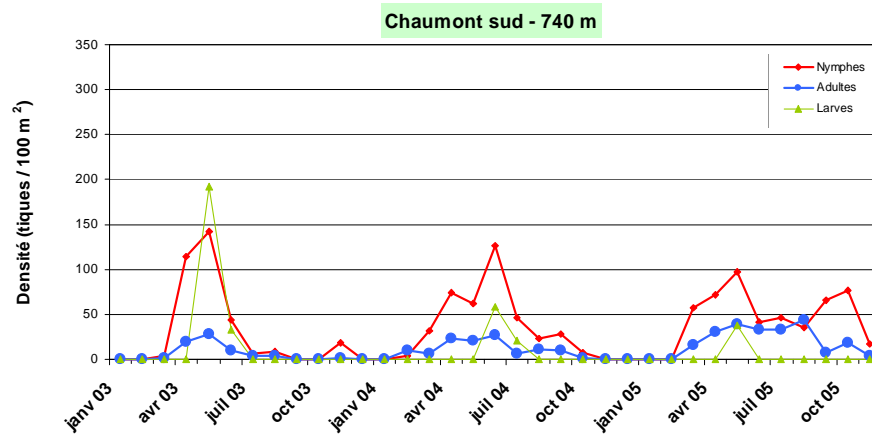
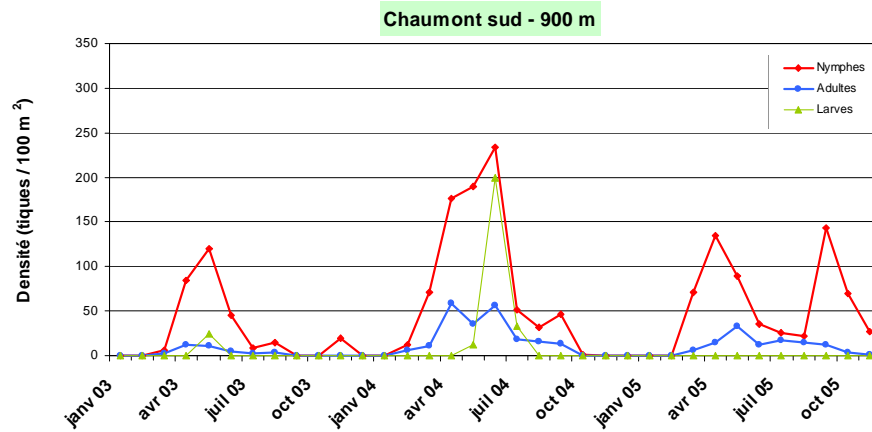
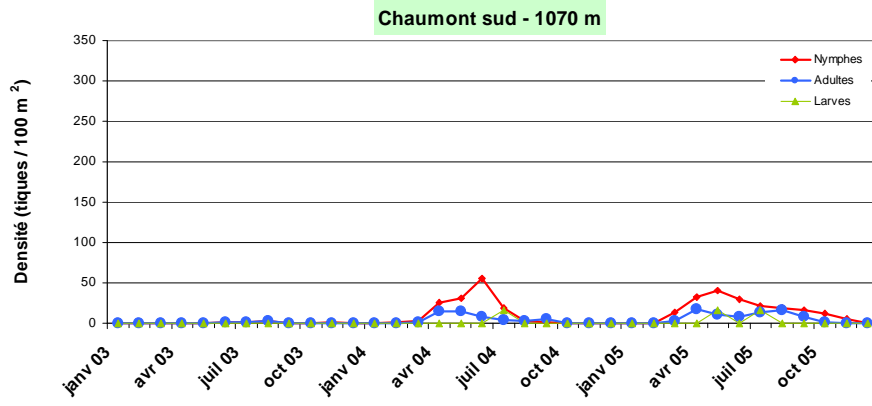


Fig. 11 Evolution mensuelle de la densité des larves, des nymphes et des adultes en quête (nombre de tiques / 100 m²) le long du gradient altitudinal (1010, 910 et 780 m) sur le versant nord de Chaumont de septembre 2003 à décembre 2005.

Fig. 12 Evolution mensuelle de la densité des larves, des nymphes et des adultes en quête (nombre de tiques / 100 m²) le long du gradient altitudinal (1070, 900, 740 et 620 m) sur le versant sud de Chaumont de février 2003 à décembre 2005. [Page suivante].



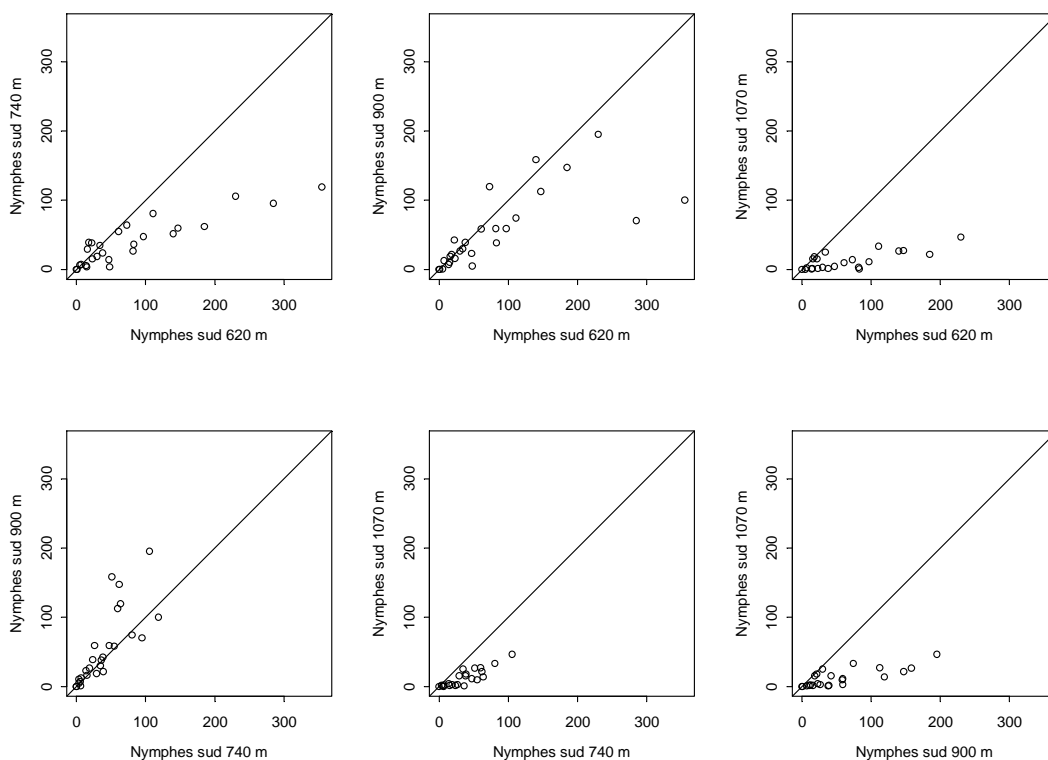


Fig. 13 Comparaison par paires de la densité de nymphes obtenue le long du gradient altitudinal (1070, 900, 740 et 620 m) sur le versant sud de Chaumont pendant la période 2003-2005.

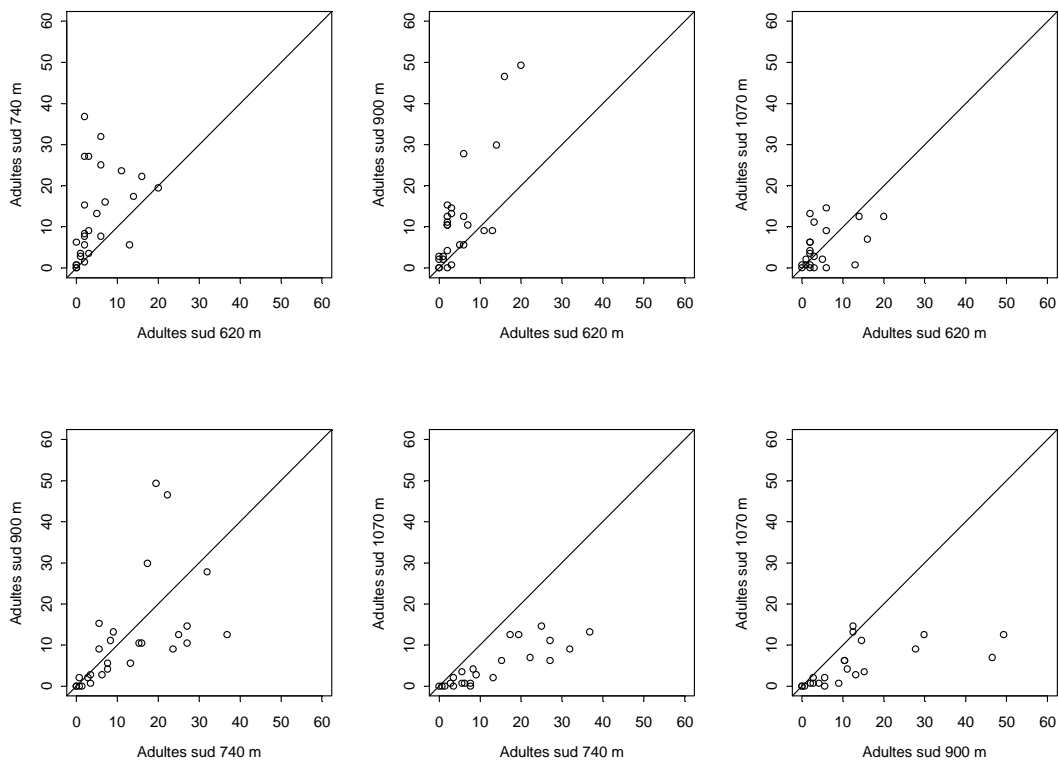


Fig. 14 Comparaison par paires de la densité d'adultes obtenue le long du gradient altitudinal (1070, 900, 740 et 620 m) sur le versant sud de Chaumont pendant la période 2003-2005.

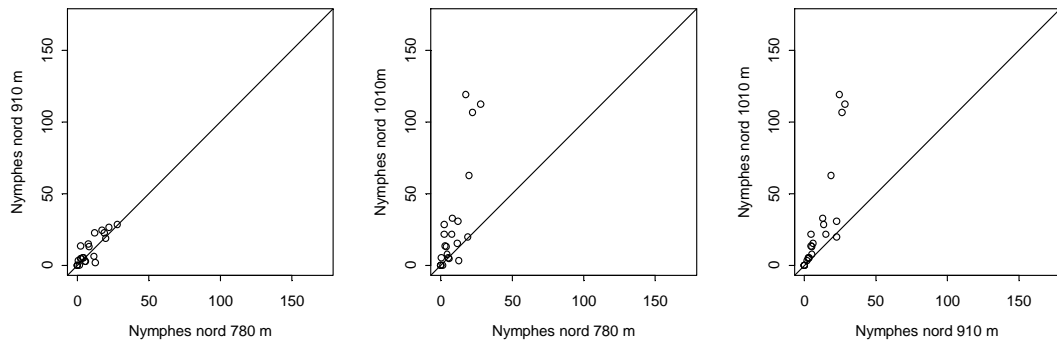


Fig. 15 Comparaison par paires de la densité de nymphes obtenue le long du gradient altitudinal (1010, 910 et 780) sur le versant nord de Chaumont pendant la période 2003-2005.

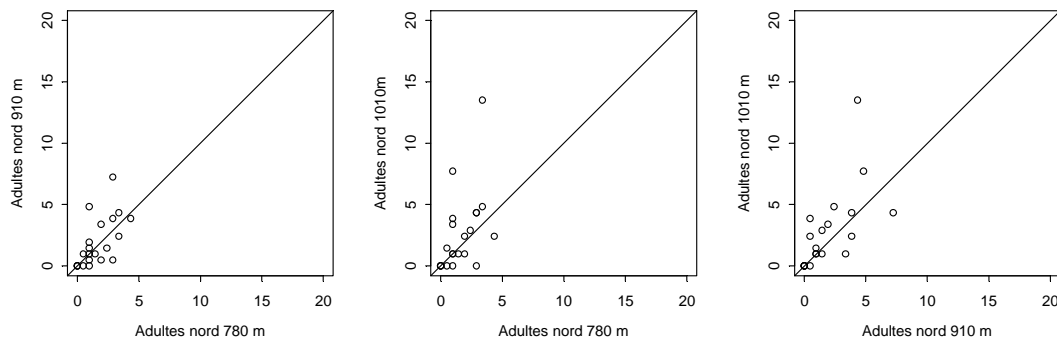


Fig. 16 Comparaison par paires de la densité d'adultes obtenue le long du gradient altitudinal (1010, 910 et 780) sur le versant nord de Chaumont pendant la période 2003-2005.

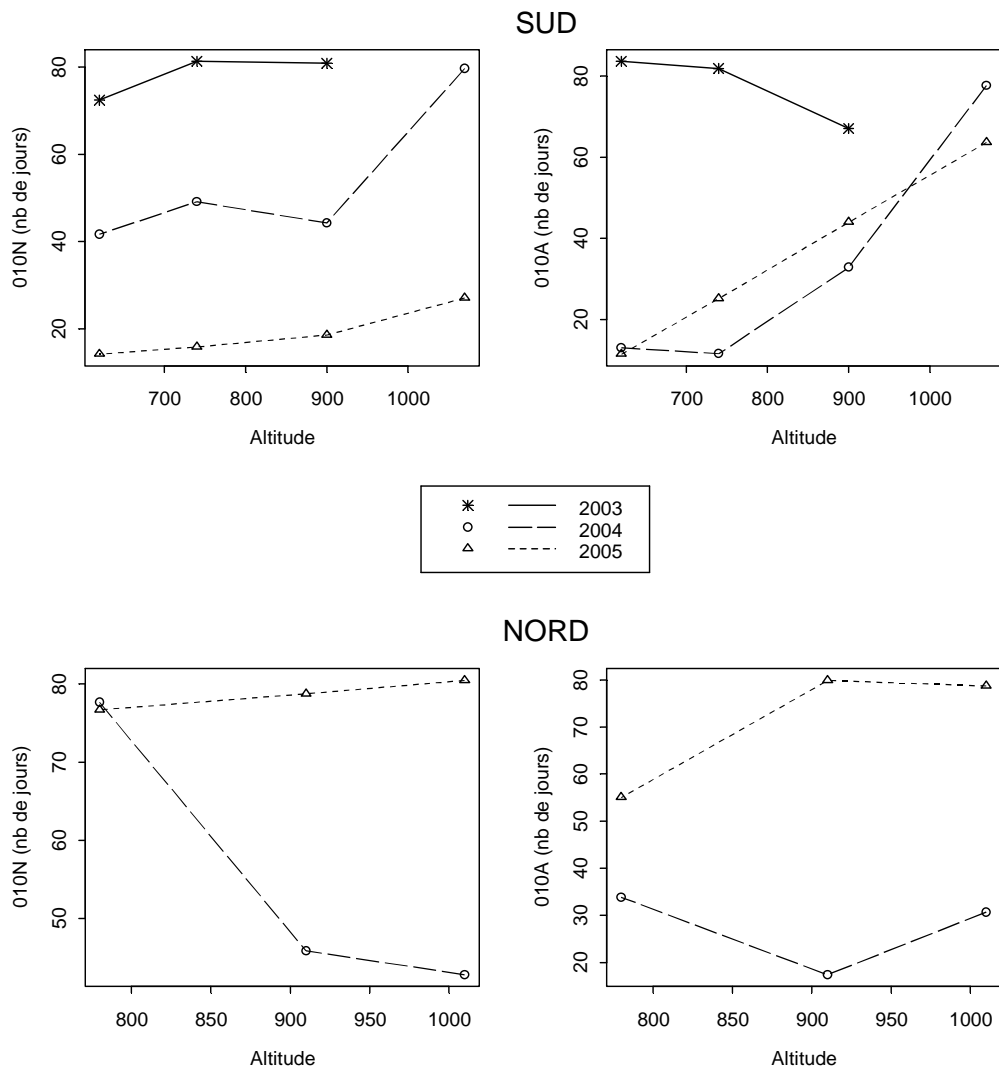


Fig. 17 Début de l'activité des nymphes (O10N) et des adultes (O10A), (nombre de jours depuis le début de l'année), le long des gradients sud et nord de la montagne de Chaumont en fonction de l'altitude pendant la période 2003-2005.

O10, date à laquelle la densité des tiques dépasse le 10% du pic de densité sur l'année.

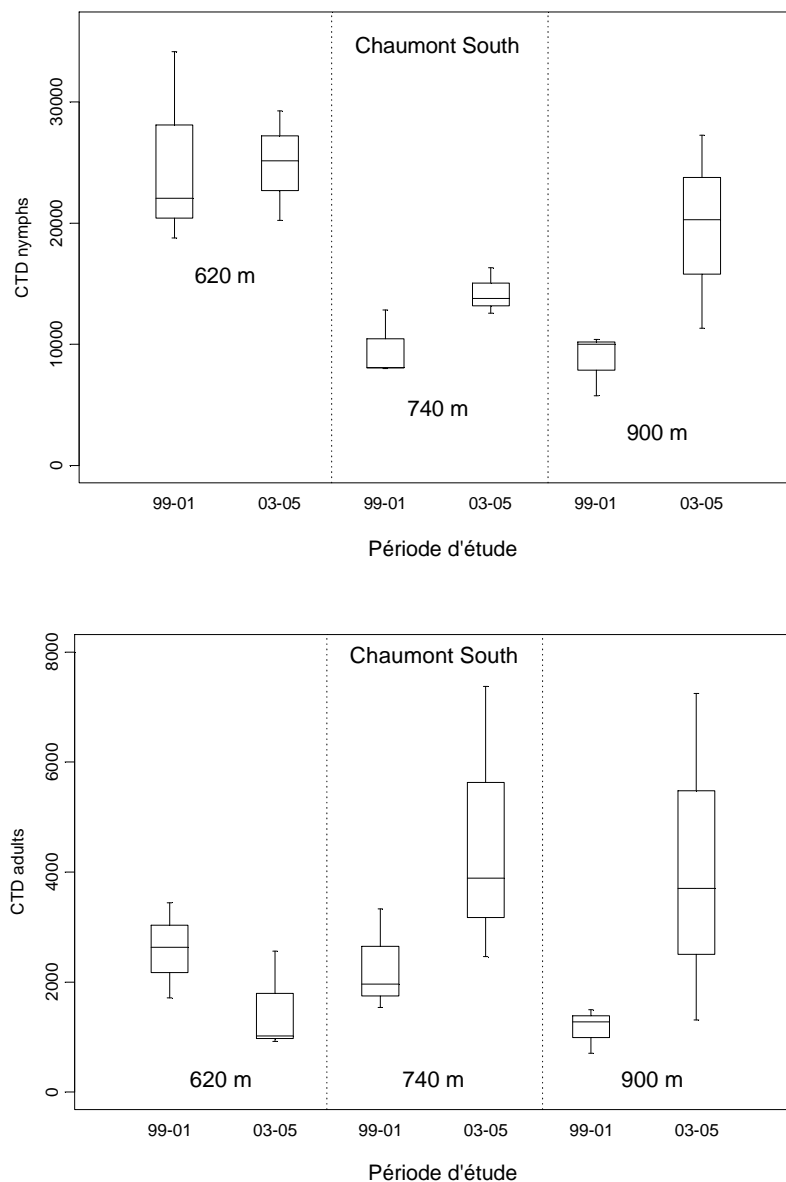


Fig. 18 Comparaison des CTD (Cumulative Tick Density, nb de tiques par 100 m² et par année) des nymphes (CTDN) et des adultes (CTDA) entre les deux périodes d'étude, 1999-2001* et 2003-2005, sur le versant sud de Chaumont en fonction de l'altitude.

*1999-2001, valeurs des CTD calculées à partir des données obtenues de Jouda *et al* 2004a.

9.3 INFECTION PAR *B. BURGDORFERI* SL ET DISTRIBUTION DES GÉNOESPÈCES

Site / Altitude	Nymphes infectées / analysées (%)				Adultes infectés / analysés (%)			
	2003	2004	2005	Total	2003	2004	2005	Total
N 1010 m	3/38	37/140	32/116	72/294 (24.5)	0/2	9/59	3/40	12/101 (11.9)
N 910 m	5/32	12/112	11/101	28/245 (11.4)	2/2	5/34	11/39	18/75 (24.0)
N 780 m	2/15	23/131	21/90	46/236 (19.5)	0/4	8/38	4/28	12/70 (17.1)
Total N	10/85	72/383	64/307	146/775 (18.8)	2/8	22/131	18/107	42/246 (17.1)
S 1070 m	0/5	31/88	25/123	56/216 (25.9)	0/2	12/49	17/69	29/120 (24.2)
S 900 m	14/86	40/140	23/149	77/375 (20.5)	7/30	19/107	25/94	51/231 (22.1)
S 740 m	16/75	46/144	16/164	78/383 (20.4)	11/43	38/91	25/137	74/271 (27.3)
S 620 m	22/100	54/158	36/154	112/412 (27.2)	0/5	21/59	3/22	24/86 (27.9)
Total S	52/266	171/530	100/590	323/1386 (23.3)	18/80	90/306	70/322	178/708 (25.1)
Total N & S	62/351	243/913	164/897	469/2161 (21.7)	20/88	112/437	88/429	220/954 (23.1)

Fig. 19 Prévalence d'infection (%) des nymphes et des adultes analysés sur les versants nord et sud de la montagne de Chaumont en fonction de l'altitude pendant la période 2003-2005.

N, gradient nord de Chaumont. S, gradient sud de Chaumont.

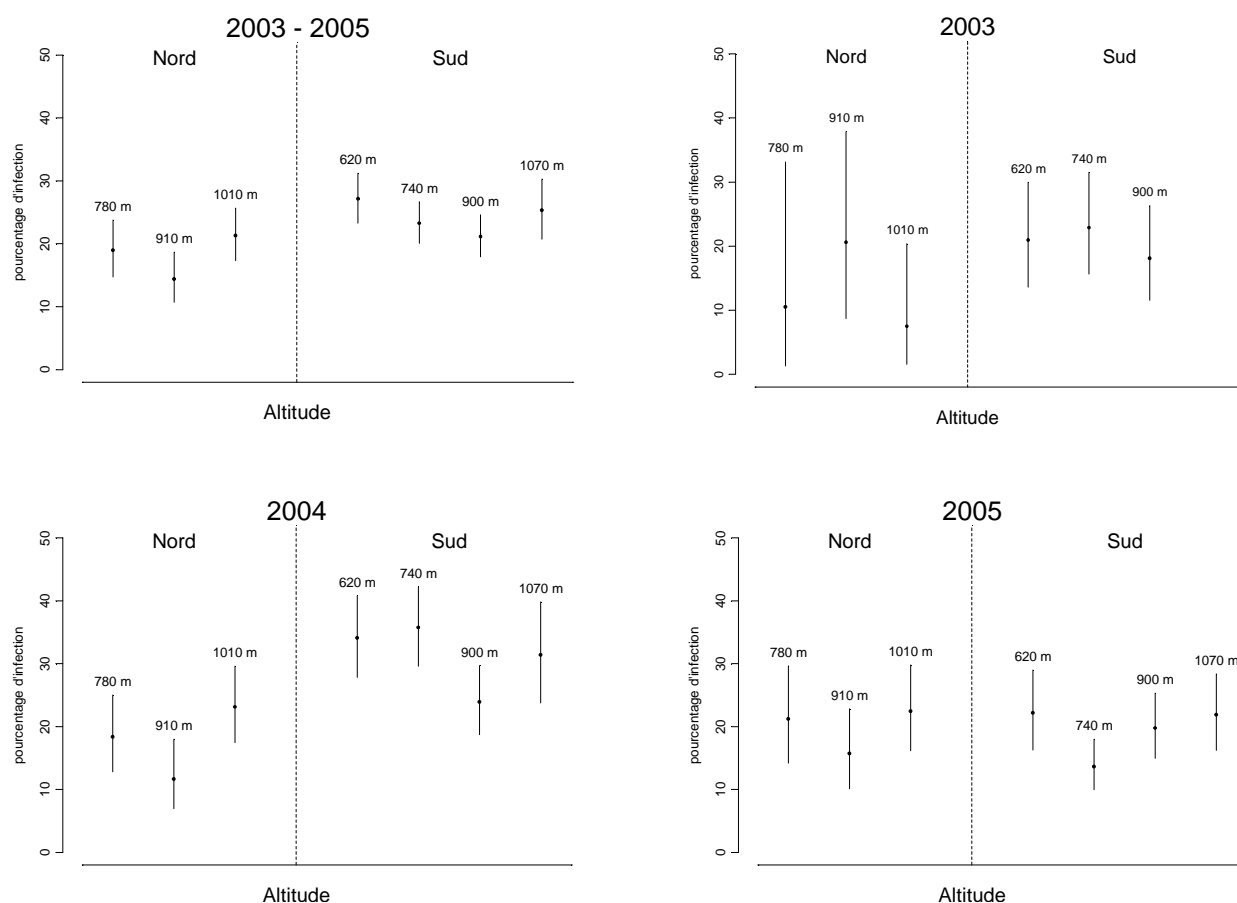


Fig. 20 Variation annuelle de la prévalence d'infection (%) des tiques analysées sur les versants nord et sud de la montagne de Chaumont en fonction de l'altitude pendant la période 2003-2005. Nymphes et adultes ont été considérés ensemble.

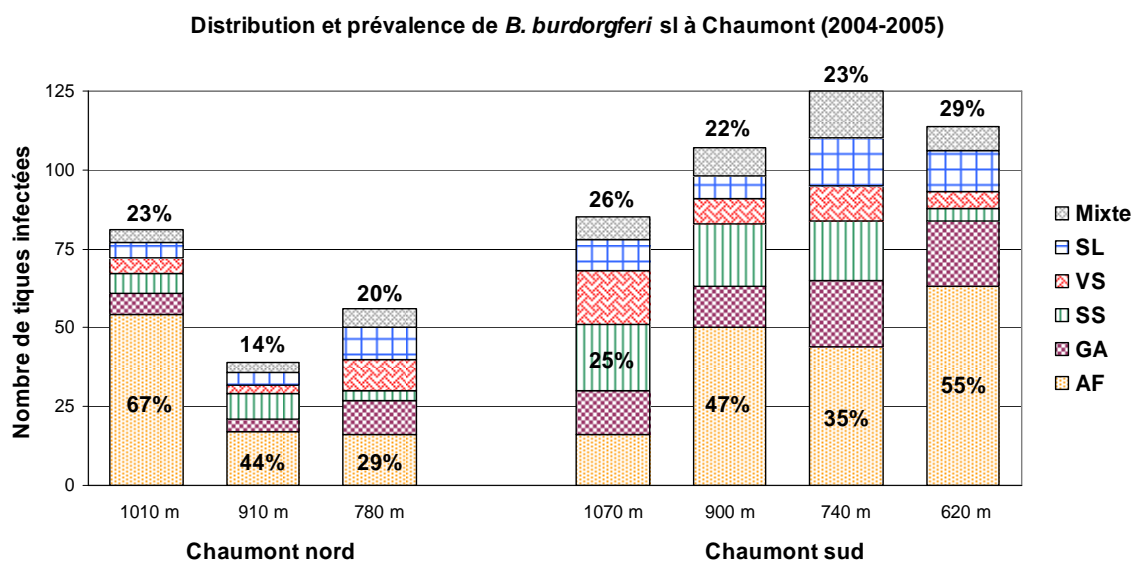


Fig. 21 Prévalence d'infection et distribution des génoespèces de *B. burgdorferi* sl en fonction de l'altitude chez les tiques analysées sur les versants nord et sud de la montagne de Chaumont pendant la période 2004-2005 (février 2004 à novembre 2005).

Les pourcentages en-dessus des colonnes indiquent la prévalence moyenne d'infection des tiques analysées par altitude.

Les pourcentages à l'intérieur des colonnes indiquent la prévalence de la génoespèce la plus fréquente dans les tiques infectées par altitude.

AF, *B. afzelii*; GA, *B. garinii*; SS, *B. burgdorferi* ss; VS, *B. valaisiana*; SL, *B. burgdorferi* sl; Mixte, infection mixte avec diverses génoespèces.

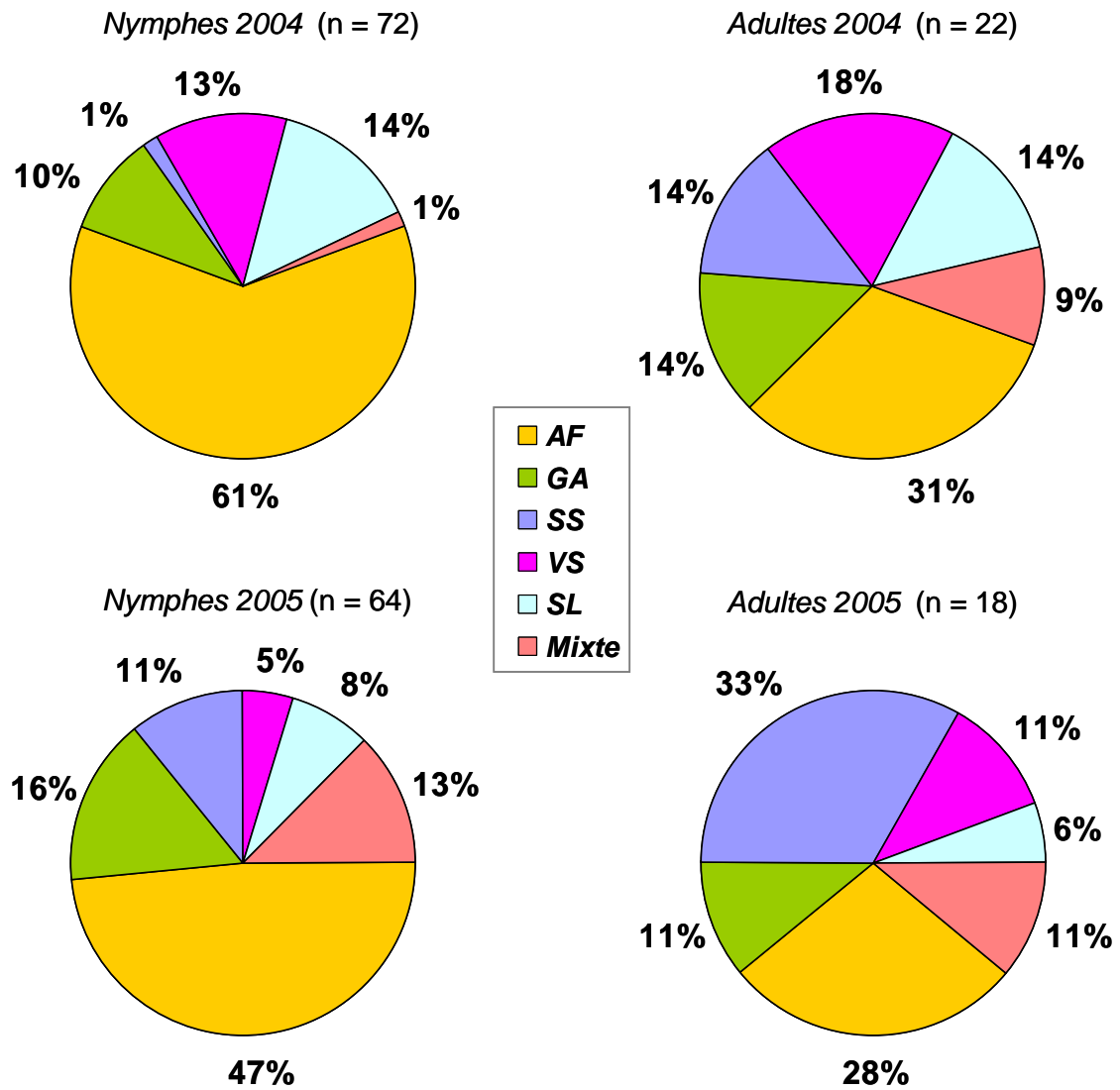


Fig. 22 Distribution des génoespèces de *B. burgdorferi* sl chez les nymphes et les adultes infectés sur le versant nord de la montagne de Chaumont en 2004 et 2005 (février 2004 à novembre 2005).

AF, *B. afzelii*; GA, *B. garinii*; SS, *B. burgdorferi* ss; VS, *B. valaisiana*; SL, *B. burgdorferi* sl; Mixte, infection mixte avec diverses génoespèces.

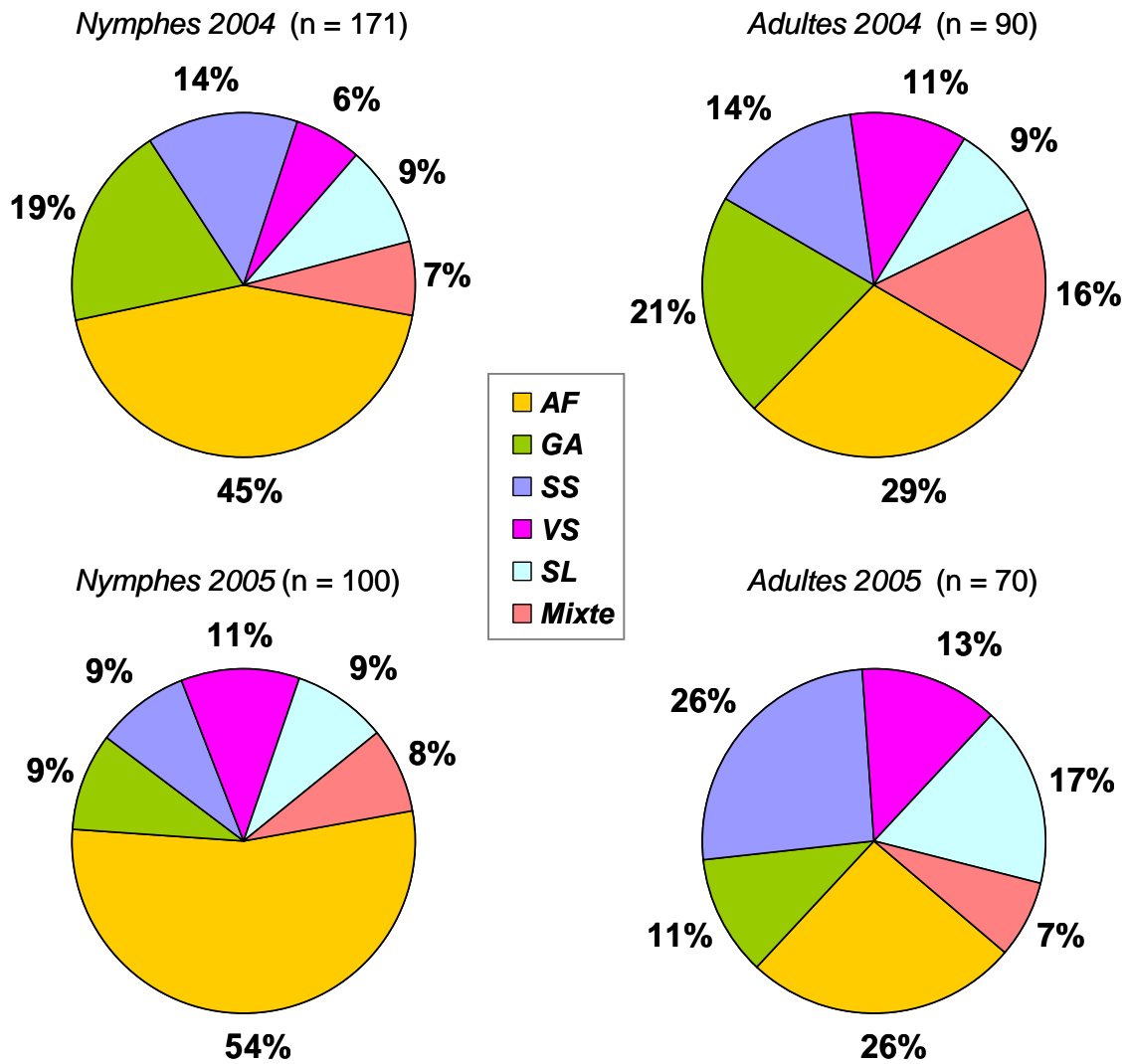


Fig. 23 Distribution de génoespèces de *B. burgdorferi* sl chez les nymphes et les adultes infectés sur le versant sud de la montagne de Chaumont en 2004 et 2005 (février 2004 à novembre 2005).

AF, *B. afzelii*; GA, *B. garinii*; SS, *B. burgdorferi* ss; VS, *B. valaisiana*; SL, *B. burgdorferi* sl; Mixte, infection mixte avec diverses génoespèces.