

1356

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

INSTITUT DE ZOOLOGIE

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

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

Par

O. Roger BELLET-EDIMO

Docteur en Pharmacie
(Université de Dakar au Sénégal)

Neuchâtel 1997

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Importance de la transmission transstadiale et transovarienne du spirochète *Borrelia burgdorferi* chez la tique *Ixodes ricinus* dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme

de M. Roger Bellet-Edimo

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

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

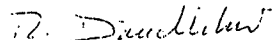
Mmes Lise Gern (co-directrice de thèse),
C. Perez-Eld (Institut Pasteur, Paris)
MM. B. Betschart (directeur de thèse) et
M. Brossard

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 18 juin 1997

Le doyen:

R. Dändliker



Je dédie ce travail
à Hilda, Alice, Cathérine, Calixte et Charles,
à Nicole et Chantal,
à Maurice, Christian, Paul et Martin,
à Henri et Désirée,
à Lydie et Guillaume,
à mes parents, Tathé et Sango'Dimo.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
I. Historique de la maladie de Lyme	1
II. Les vecteurs: des tiques.....	1
II.1. Systématique générale des tiques	2
II.2. La tique <i>Ixodes ricinus</i>	3
II.2.1. Vecteur d'agents pathogènes.....	3
II.2.2. Biologie.....	4
III. Le spirochète <i>Borrelia burgdorferi</i>	7
III.1. L'agent étiologique de la maladie de Lyme	7
III.2. Systématique.....	7
III.3. Souches ou sous-espèces.....	8
III.4. Protéines de surface	9
IV. Transmission du spirochète <i>B. burgdorferi</i>	10
IV.1. Transmission à l'hôte.....	10
IV.2. Cycle naturel de l'infection.....	11
IV.3. Transmission du spirochète chez la tique	12
V. Buts du travail	14
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	16
I. LES TIQUES.....	16
I.1. Stades évolutifs d' <i>Ixodes ricinus</i>	16
I.2. Origine des tiques	16
I.2.1. Les tiques de la nature	16
I.2.2. Les tiques d'élevage	16
II. LES ANIMAUX DE LABORATOIRE	16
II.1. Repas sanguin des stades immatures	16
II.2. Repas sanguin des adultes femelles.....	17
III. RÉCOLTE DES TIQUES.....	17
III.1. La technique du drapeau	17
IV. INFESTATION DES ANIMAUX.....	17
IV.1. Repas sanguin des femelles	17
IV.1.1. Infestation du lapin	17
IV.1.2. Récolte des tiques gorgées.....	17
IV.1.3. Conservation des femelles gorgées.....	18
IV.2. Repas sanguin des larves et des nymphes	18
IV.2.1. Les larves.....	18
IV.2.2. Les nymphes	18
IV.2.3. Récolte et conservation des larves et des nymphes gorgées.....	19
V. MISE EN ÉVIDENCE DE L'INFECTION.....	19
V.1. Détection du spirochète <i>B. burgdorferi</i> chez les tiques.....	19
V.1.1. Test direct d'immunofluorescence	19
V.1.3. Isolement du spirochète <i>B. burgdorferi</i> à partir de tiques par mise en culture dans du milieu BSK-II	24
V.2. Détection de l'infection chez l'hôte	25
V.2.1. Biopsies d'oreilles.....	25
V.2.2. Xénodeiagnose.....	25
V.2.3. Détection du spirochète <i>B. burgdorferi</i> dans le sang de la souris	26
V.2.4. Recherche d'anticorps anti- <i>Borrelia burgdorferi</i>	26
V.2.5. Détection et caractérisation du spirochète par PCR	29
V.2.6. Expérience de cofeeding	30
3.1. RÉCOLTE DE JUIN 1991	32
I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES.....	32
II. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE <i>B. BURGDORFERI</i> AUX OEUFS	33

3.2. RÉCOLTE DE JUIN 1993	34
I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES.....	34
II. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE <i>B. BURGDORFERI</i> AUX OEUFS ET AUX LARVES F ₁	35
II.1. Infection des oeufs	35
II.2. Infection des larves F ₁ à jeun	35
III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE <i>B. BURGDORFERI</i> DES LARVES F ₁ AUX ADULTES	36
III.1. Repas sanguin des larves F ₁	36
III.2. Transmission de <i>B. burgdorferi</i> par les larves F ₁ aux souris.....	36
III.3. Infection des nymphes F ₁ à jeun	37
III.4. Repas sanguin des nymphes F ₁ et transmission de <i>B. burgdorferi</i> aux souris.....	38
III.4.1. Biopsies d'oreilles	38
III.4.2. Xénodiagnose	39
III.5. Infection des adultes mâles et femelles F ₁ à jeun	39
III.6. Localisation histologique de <i>B. burgdorferi</i> chez les femelles F ₁ après repas sanguin et chez les mâles à jeun par la méthode de Dieterle	40
IV. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE <i>B. BURGDORFERI</i> À LA DEUXIÈME GÉNÉRATION D'I. RICINUS	42
IV.1. Infection des oeufs.....	42
3.3. RÉCOLTE DE MAI 1994	43
I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES.....	43
II. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE <i>B. BURGDORFERI</i> AUX OEUFS ET AUX LARVES F ₁	44
II.1. Infection des oeufs	44
II.2. Infection des larves F ₁ à jeun	44
III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE <i>B. BURGDORFERI</i> DES LARVES F ₁ AUX ADULTES	45
III.1. Repas sanguin des larves F ₁	45
III.2. Transmission de <i>B. burgdorferi</i> par les larves F ₁ aux souris.....	45
III.3. Infection des nymphes F ₁ à jeun	47
III.3.1. Isolement du spirochète <i>B. burgdorferi</i> à partir des nymphes F ₁ à jeun.....	48
III.4. Repas sanguin des nymphes F ₁	48
III.5. Transmission de <i>B. burgdorferi</i> par les nymphes F ₁ aux souris.....	48
III.6. Infection des adultes mâles et femelles F ₁ à jeun	49
III.6.1. Examen en immunofluorescence directe.....	49
III.6.2. Localisation histologique de <i>B. burgdorferi</i> par la méthode de Dieterle	50
III.6.3. Isolement du spirochète <i>B. burgdorferi</i> à partir des adultes F ₁ mâles et femelles à jeun	51
III.6.4. Repas sanguin des femelles F ₁	51
IV. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE <i>B. BURGDORFERI</i> À LA DEUXIÈME GÉNÉRATION D'I. RICINUS	53
IV.1. Infection des oeufs.....	53
IV.2. Infection des larves F ₂ à jeun.....	53
3.4. RÉCOLTE DE JUIN 1995	54
I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES.....	54
II. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE <i>B. BURGDORFERI</i> AUX LARVES F ₁	56
III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE LA LARVE F ₁ À L'ADULTE F ₁	56
III.1. Repas sanguin des larves F ₁	56
III.2. Transmission de <i>B. burgdorferi</i> par les larves F ₁ aux souris	57
III.3. Infection des nymphes F ₁ à jeun	58
III.4. Repas sanguin des nymphes F ₁ et transmission de <i>B. burgdorferi</i> aux souris.....	59
III.4.1. Suivi de l'infection par <i>B. burgdorferi</i> chez <i>I. ricinus</i>	59
III.4.2. Cofeeding avec les nymphes F ₁	61
III.4.3. Détection du spirochète dans le sang des souris	63
III.5. Infection des adultes mâles et femelles F ₁ à jeun	63
III.6. Repas sanguin des femelles F ₁	64
IV. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE <i>B. BURGDORFERI</i> À LA DEUXIÈME GÉNÉRATION D'I. RICINUS	66
IV.1. Infection des oeufs.....	66
IV.2. Infection des larves F ₂ à jeun.....	67
IV.3. Repas sanguin des larves F ₂ et transmission de <i>B. burgdorferi</i> aux souris	68

IV.3.1. Mise en évidence du spirochète <i>B. burgdorferi</i> dans le plasma de souris.....	68
IV.3.2. Mise en culture du plasma en milieu BSK-II.....	69
3.5. RÉCOLTE D'OCTOBRE 1995.....	70
I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES.....	70
II. TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DE <i>B. BURGENDORFERI</i> AUX OEUFS ET AUX LARVES F ₁	72
II.1. Infection des oeufs.....	72
II.2. Infection des larves F ₁ à jeun.....	72
III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE <i>B. BURGENDORFERI</i> DES LARVES F ₁ AUX ADULTES F ₁	73
III.1. Repas sanguin des larves F ₁ à jeun et transmission de <i>B. burgdorferi</i> aux souris.....	73
III.1.2. Suivi de l'infection par <i>B. burgdorferi</i> chez <i>I. ricinus</i>	73
III.2.2. Cofeeding avec les larves F ₁ à jeun.....	74
III.3. Infection des nymphes F ₁ à jeun.....	77
III.4. Repas sanguin des nymphes F ₁ et transmission de <i>B. burgdorferi</i> aux souris.....	77
III.5. Détection et caractérisation du spirochète par PCR.....	79
3.6. DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI- <i>B. BURGENDORFERI</i>	80
I. Immunodot-blot des sera.....	80
II. Western-blot des sera.....	81
3.7. RÉCAPITULATION COMPARATIVE DES 5 RÉCOLTES.....	84
4. DISCUSSION.....	88
I. FRÉQUENCE ET TAUX DE TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE.....	88
I.1. Prévalence de l'infection chez les larves sauvages à jeun.....	88
I.2. Fréquence de transmission transovarienne.....	89
I.2.1. Fréquence de transmission par rapport aux oeufs.....	89
I.2.2. Fréquence de transmission par rapport à la descendance larvaire.....	90
I.2.3. Comparaison des fréquences à partir des oeufs et à partir des larves.....	91
I.3. Taux de transmission transovarienne.....	92
II. EFFICACITÉ DE LA TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE.....	94
II.1. Infection des oeufs.....	94
II.2. Infection des larves.....	95
II.3. Passage de l'infection des oeufs aux larves.....	95
III. EFFICACITÉ DE LA TRANSMISSION TRANSSTADIALE.....	96
III.1. Passage des larves aux nymphes.....	96
III.2. Passage des nymphes aux adultes.....	97
IV. TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DE <i>B. BURGENDORFERI</i> DES FEMELLES F ₁ AUX LARVES DE DEUXIÈME GÉNÉRATION.....	100
V. TRANSMISSION À L'HÔTE.....	101
V.2. Détection des anticorps anti- <i>B. burgdorferi</i>	103
V.3. Détection et caractérisation du spirochète par PCR.....	104
VI. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	104
VI.1. Les pourcentages d'infection.....	104
VI.2. Le spirochète et la tique.....	105
VI.3. La transmission à l'hôte.....	107
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	108
6. RÉSUMÉ.....	111
7. BIBLIOGRAPHIE.....	112
8. REMERCIEMENTS.....	123

1. INTRODUCTION

I. Historique de la maladie de Lyme

C'est suite à l'observation d'une plus grande fréquence d'arthrites juvéniles dans la ville de Lyme, petite localité du Connecticut aux États-Unis, que Steere et al. (1977; 1978; 1979) mettent en relation des piqûres de tiques, *Ixodes scapularis* (Oliver et al., 1993), avec les manifestations rhumatologiques dites de Lyme.

La nature bactérienne de cette affection est démontrée avec l'isolement du spirochète *Borrelia burgdorferi*, d'abord de l'intestin d'une tique *I. scapularis* (Burgdorfer et al., 1982), puis de la tique *I. ricinus* (Barbour et al., 1983), et ensuite d'un ECM (Berger et al., 1982; 1983).

Depuis lors, de nombreux autres isolats ont été obtenus chez l'homme, à partir de liquide céphalorachidien (Steere et al., 1983), ou de sang d'animal (Benach et al., 1983).

En fait, l'affection connue sous l'appellation de maladie de Lyme avait déjà été décrite en Europe sous les termes d'«Erythema Migrans» (EM) (Afzelius, 1910) puis d'«Erythema chronicum migrans» (ECM) (Lipschütz, 1913), pour caractériser une lésion cutanée consécutive à une piqûre de tique. De même, Garin et Bujadoux (1922) ont publié en France une observation de méningo-radiculite faisant suite à une morsure de tique et à un érythème.

Ainsi donc, qu'elle se manifeste sous forme d'arthrites ou d'érythème chronique migrant, il s'agit de la même affection provoquée par un spirochète, *B. burgdorferi*, via une piqûre de tique : c'est une maladie à vecteur.

II. Les vecteurs: des tiques

Les tiques sont des arthropodes parasites hématophages dangereux pour l'homme et pour les animaux en tant qu'ectoparasites (lésions mécaniques), et vecteurs de nombreuses maladies (viroses, rickettsioses, spirochétozes, piroplasmoses, etc.) ou d'autres troubles pathologiques (toxicoses, anémies, réactions allergiques). Ceci explique leur importance aussi bien en médecine humaine que vétérinaire.

II.1. Systématique générale des tiques

<input type="checkbox"/> Embranchement	Arthropoda		
<input type="checkbox"/> Classe	Chelicerata		
<input type="checkbox"/> Sous-classe	Arachnida		
<input type="checkbox"/> Ordre	Acari		
<input type="checkbox"/> Sous-ordre	Metastigmata		
<input type="checkbox"/> Famille	<input type="checkbox"/> Sous-famille	<input type="checkbox"/> Genre	
Ixodidae	Ixodinae	<u>Ixodes</u>	
	Amblyomminae	<u>Aponoma</u>	<u>Haemaphysalis</u>
		<u>Amblyomma</u>	<u>Dermacentor</u>
	Rhipicephalinae	<u>Rhipicentor</u>	<u>Rhipicephalus</u>
		<u>Hyalomma</u>	<u>Boophilus</u>
		<u>Cosmiomma</u>	<u>Margaropus</u>
		<u>Nosoma</u>	<u>Anomalohimalaya</u>
Argasidae		<u>Orobius</u>	<u>Ornithodoros</u>
		<u>Argas</u>	<u>Antricola</u>
Nuttalliellidae		<u>Nuttalliella</u>	

Tableau 1: Systématique des tiques (d'après Hoogstraal et Aeschlimann, 1982)

Pour ce qui est des formes cliniques humaines, toutes les tiques considérées comme vecteurs compétents du spirochète *B. burgdorferi*, font partie du complexe *I. ricinus* (Clifford et al., 1973). Il s'agit de *I. ricinus* et de *I. persulcatus* dans la région paléarctique, de *I. scapularis* et de *I. pacificus* dans la région néarctique. Ce sont des tiques dites "dures" qui généralement se nourrissent sur une grande diversité d'animaux sauvages mais piquent tout aussi bien l'homme.

Les stades immatures (larves et nymphes) parasitent préférentiellement les vertébrés de petite taille comme les lézards, les oiseaux descendant au sol, les micromammifères (rongeurs), ou de taille moyenne (hérissons, renards), mais également l'homme.

Les adultes préfèrent les grands animaux tels que les cerfs, les chevreuils, le bétail (bovins, ovins, caprins), et occasionnellement piquent l'homme. Seules les femelles sont en réalité concernées car les mâles se nourrissent très peu ou pas du tout et servent principalement à copuler.

1. Introduction

D'autres espèces de tiques peuvent être considérées comme vecteurs de *B. burgdorferi*, il s'agit de *I. dentatus* aux États-Unis (Telford et al., 1989) et de *I. hexagonus* dans la région paléarctique (Gern et al., 1991).

Tableau 2: Distribution géographique et principaux hôtes des *Ixodes* et réservoirs primaires de *B. burgdorferi* (d'après T.G.T. Jaenson, 1991)

Espèces de tique	Distribution géographique	Hôtes principaux des <i>Ixodes</i>	Hôtes vertébrés principaux de <i>B. burgdorferi</i>
<i>I. ricinus</i>	Europe- Ouest de l'Asie	rongeurs, oiseaux ^a grands mammifères, homme ^b	Apodemus, Clethrionomys
<i>I. persulcatus</i>	Europe orientale-Japon	rongeurs, oiseaux ^a grands mammifères, homme ^b	Apodemus, Clethrionomys
<i>I. pacificus</i>	Ouest de l'Amérique du Nord	lézards, oiseaux, rongeurs ^a cerf, homme ^b , bétail ^c	Peromyscus
<i>I. scapularis</i>	Est des États-Unis	lézards, rongeurs, oiseaux ^a moyens mammifères, homme ^b , bétail, cerf ^c	Peromyscus
<i>I. dentatus</i>	Est de l'Amérique du Nord	oiseaux ^a lapin (<i>Sylvilagus</i>) ^b	Sylvilagus

^alarves et nymphes ^blarves, nymphes et adultes ^cadultes

Par ailleurs le spirochète de Lyme a été isolé à partir d'espèces de tiques en dehors du complexe *I. ricinus*, sans que l'on puisse toutefois affirmer qu'elles sont vectrices de *B. burgdorferi*; nous pouvons citer *Amblyomma americanum* (Schulze et al., 1986), *Dermacentor variabilis* et *Haemaphysalis leporispalustris* (Anderson et al., 1984), ou encore *Rhipicephalus sanguineus* (Rawlings, 1986).

II.2. La tique *Ixodes ricinus*

II.2.1. Vecteur d'agents pathogènes

I. ricinus est l'espèce d'Ixodidé la plus répandue en Europe où elle est responsable de la transmission à l'homme et aux animaux de divers germes pathogènes (Tableau 3) dont le spirochète *B. burgdorferi*, agent étiologique de la maladie de Lyme (Burgdorfer et al., 1983). Parmi ces germes on trouve aussi bien des virus que des bactéries ou des protozoaires (Tableau 3); par ailleurs la tique *I. ricinus* a été trouvée porteuse d'un trypanosome,

Trypanosoma theileri ainsi que d'une filaire de chevreuil, *Dipetalonema rigostcauda*, (Aeschlimann, 1979).

Tableau 3: Principales maladies transmises par *I. ricinus* (d'après J.S. Gray, 1991)

Maladie	Agent	Hôtes affectés	Manifestations principales
Babésiose	<i>Babesia divergens</i> (Protozoaire)	Bétail	Anémie, Fièvre
Louping-ill	Virus	Mouton, Bétail	Encéphalite
Encéphalite à tiques	Virus	Homme	Encéphalite
Fièvre à tiques	<i>Cytoecetes phagocytaphila</i> (Rickettsie)	Mouton, Bétail	Immunosuppression
Maladie de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i> (Spirochète)	Homme, Bétail, Mouton, Chien, Chevaux	Neurologiques, Arthrites, Cardiaques, Cutanées
Pyémie à tiques	<i>Staphylococcus aureus</i> (contamination bactérienne)	Agneaux	Abcès articulaires

II.2.2. Biologie

I. ricinus est une tique triphasique, télotrope et exophile:

Elle a un cycle biologique triphasique: la succession de 3 stades évolutifs (larve, nymphe et adulte), tous alternativement parasites (phase trophique) et libres (recherche de l'hôte, mue ou ponte au sol), entraîne un cycle de développement auquel participent 3 hôtes.

Elle est télotrope: en dehors du stade adulte, la tique ne montre pas de préférence dans le choix de ses hôtes et ainsi la gamme d'hôtes vertébrés parasités est large, des reptiles aux mammifères. Ceci a pour conséquence une très grande distribution géographique; et en Suisse par exemple, les facteurs limitants sont:

- l'altitude (abondance entre 400 et 900 m, rareté au-dessus de 1000 m et absence dès 1500 m);
- l'absence de végétation protectrice (prédilection pour les forêts à riche sous-bois et absence des pâturages à ciel ouvert car très souvent exposés aux fluctuations de température et d'humidité);
- les rigueurs des températures extrêmes (nécessité d'une humidité relative de 80 à 100 %) (Aeschlimann, 1972; 1981).

Elle est exophile: espèce vivant en biotope ouvert, les différents stades se tiennent à "l'affût" immobiles sur la végétation dans l'attente d'un contact éventuel avec un hôte; la recherche de l'hôte est donc passive et les chances de rencontre avec celui-ci dépendent du degré de contact (dimensions du biotope, abondance des vertébrés) (Rhodain & Perez, 1985). La durée du cycle de vie (Tableau 4) et la saisonnalité de l'activité de *I. ricinus* ont été résumées par Gray (1991): chaque stade de développement met environ une année pour donner le stade suivant et le cycle de vie est ainsi bouclé en 3 ans; mais ceci varie en fait d'une région à l'autre et en général il peut se passer de 2 à 6 ans pour passer de l'oeuf à l'adulte via la larve et la nymphe.

Tableau 4: Temps de développement de *I. ricinus*, à partir de différentes sources, d'après Soulsby, 1985 (cité par Gray, 1991).

Préoviposition	7 à 22 jours
Oviposition	30 jours
Éclosion	2 à 36 semaines
Repas sanguin des larves	2 à 6 jours
Mue larvaire	4 à 51 semaines
Repas sanguin des nymphes	3 à 7 jours
Mue nymphale	8 à 28 semaines
Repas sanguin des femelles	5 à 14 jours

Dans la plupart des cas, les tiques deviennent actives et se nourrissent sur différents hôtes dès le printemps et au début de l'été; la durée de leur activité dépend du biotope. On note cependant selon les régions, des variations dans l'activité saisonnière de *I. ricinus* qui seraient dues à des facteurs distincts comme la différence des méthodes utilisées pour déterminer cette activité, la nature de l'habitat, le climat ou la photopériode (Gray, 1991).

On peut résumer ainsi le cycle de vie des tiques du complexe *I. ricinus* (Aeschlimann, 1972; Burgdorfer, 1989b): les femelles gorgées pondent des oeufs desquels émergent des larves. Les larves se nourrissent sur des micromammifères et muent en nymphes; ces nymphes se nourrissent à leur tour sur des micromammifères, des oiseaux ou des vertébrés de taille moyenne puis donnent des adultes, mâles et femelles. Les adultes se fixent sur des grands mammifères sur lesquels ils se nourrissent. Même s'ils peuvent se fixer, les mâles ne se nourrissent pas ou alors n'ingèrent qu'une très faible quantité de sang, recherchant surtout pour la copulation des femelles en train de se gorger; la copulation a lieu également et le plus

souvent sur la végétation avec des femelles libres à jeun (Graf, 1978). Une fois gorgées, les femelles se détachent et tombent au sol où elles pondront des oeufs, puis elles meurent; le cycle continuera avec l'éclosion des larves (Figure 1).

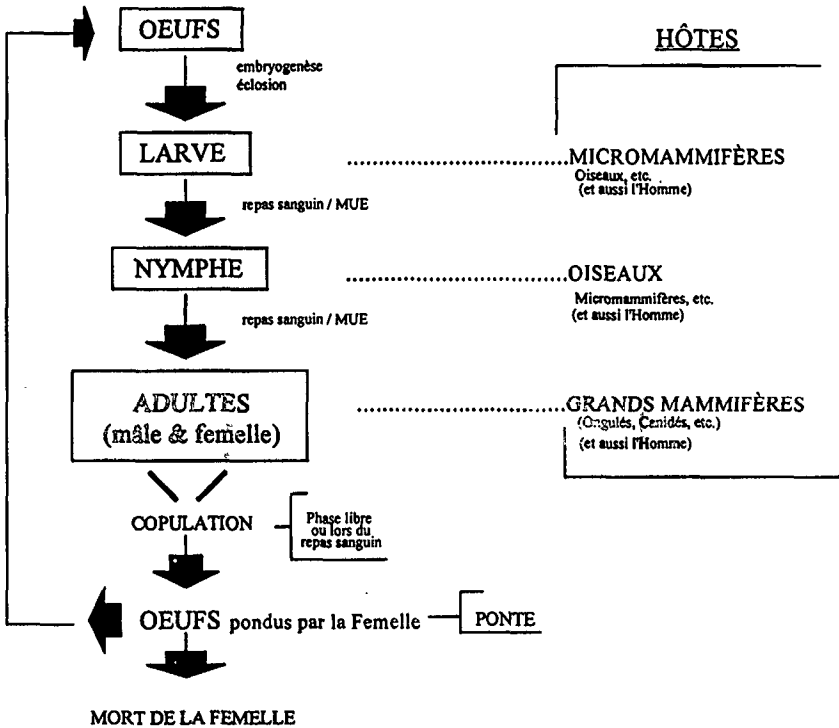


Figure 1: Cycle de développement d'*Ixodes ricinus* (d'après Aeschlimann et al., 1982)

III. Le spirochète *Borrelia burgdorferi*

III.1. L'agent étiologique de la maladie de Lyme

La borréliose de Lyme est une maladie infectieuse que l'on peut diviser en 3 phases chez l'Homme; il faut cependant préciser que les limites de ces phases sont imprécises et que la maladie peut se révéler à l'une ou l'autre car elles ne se suivent pas forcément chronologiquement. Par ailleurs, les manifestations de la maladie, à l'exception de l'érythème migrant et de l'acrodermatitis chronica atrophicans, ne présentent en général pas de spécificité clinique marquée (Dournon, 1988).

□ La phase I, en général localisée au point d'inoculation, est constituée par l'EM ou érythème migrant.

□ La phase II est marquée essentiellement par des manifestations neurologiques qui en sont le mode de révélation le plus fréquent, associées souvent à des atteintes cutanées, cardiaques et articulaires.

□ La phase III est la plus tardive et se caractérise par la chronicité de ses manifestations, qu'elles soient dermatologiques (Acrodermatitis Chronica Atrophicans ou ACA), articulaires et osseuses (de type rhumatismal) ou neurologiques.

Le tableau clinique est pratiquement le même en Europe et aux États-Unis, sauf que parmi les manifestations tardives de la maladie, on observe plus fréquemment des arthrites mais une absence d'ACA aux États-Unis; tandis qu'en Europe elles sont constituées surtout d'atteintes neurologiques et d'ACA (Wilske et al., 1995).

La maladie de Lyme étant de nature bactérienne, elle relève pour l'essentiel d'un traitement antibiotique (Steere, 1989; Weber et al., 1994).

III.2. Systématique

Borrelia burgdorferi est une bactérie microaérophile, Gram négative de 4 à 30 µm de long et d'un diamètre de 0.18 à 0.25 µm; de structure hélicoïdale, elle présente un cylindre protoplasmique entouré d'une paroi enroulée autour de flagelles périplasmiques avec enveloppe externe. Elle est animée de mouvements de rotation et de translation (Johnson et al., 1984).

Dans l'ordre des Spirochaetales (Tableau 5), elle appartient à la famille des Spirochaetaceae qui regroupe outre les borrelies, le genre *Treponema* auquel appartient *Treponema pallidum*, agent de la syphilis dont l'évolution en 3 phases ressemble à celle de la maladie de Lyme chez l'Homme (Åsbrink et al., 1988).

Tableau 5: Systématique des spirochètes (d'après Canale-Parola, 1984; Pavia, 1994)

Ordre	Famille	Genre	Espèces
Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Cristispira</i>	
		<i>Spirochaeta</i>	
		<i>Borrelia</i>	<i>B. burgdorferi</i> <i>B. duttoni</i> <i>B. turicatae</i> <i>B. hermsli</i> <i>B. parkeri</i> <i>B. recurrentis</i>
		<i>Treponema</i>	<i>T pallidum pallidum</i> <i>T pallidum endemicum</i> <i>T pallidum pertenue</i> <i>T carateum</i>
	Leptospiroceae	<i>Leptospira</i>	<i>L. interrogans</i>

III.3. Souches ou sous-espèces

Suite à différents travaux d'analyse phénotypique et génotypique (Baranton et al., 1992; Canica et al., 1993; Hu, 1996), le spirochète *B. burgdorferi* est désormais classé sous 3 espèces distinctes: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* et *B. afzelii*.

Ces 3 espèces seraient responsables de formes cliniques différentes et l'on pourrait ainsi les associer à des symptômes majeurs de la maladie de Lyme (Canica et al., 1993; Van Dam et al., 1993): *B. burgdorferi* sensu stricto avec les arthrites; *B. garinii* avec les manifestations neurologiques; *B. afzelii* avec les manifestations dermatologiques du type ACA.

Outre ces 3 espèces, il faut signaler la présence de 2 autres génotypes dénommés groupe VS116 et groupe PotiB2, transmis également par *I. ricinus* (Baranton et al., 1992; Postic et al., 1994).

III.4. Protéines de surface

Le spirochète *B. burgdorferi* présente des protéines de surface qui sont immunologiquement et génétiquement variables (Hansen et al., 1988; Wilske et al., 1992; Barbour et al., 1993; Saint Girons et al., 1994; Hu, 1996).

En effet l'étude des isolats du spirochète par électrophorèse (SDS-PAGE) a révélé la présence de protéines majeures et l'on distingue ainsi:

- une protéine flagellaire dénommée flagelline, avec un poids moléculaire de 41 kDa;
- trois protéines de surface appelées OspA, OspB et OspC ('OSP', pour 'outer surface protein') qui présentent des poids moléculaires respectifs de 30 à 33.5 kDa, 34 à 35 kDa, et 20 à 23 kDa.
- une protéine cytoplasmique de 60 kDa responsable des réactions croisées avec d'autres bactéries.

D'autres protéines ont été récemment mises en évidence sur des isolats particuliers; il s'agit d'une OspD de 28 kDa (Norris et al., 1992), une OspE de 19 kDa et une OspF de 26 kDa (Lam et al., 1994).

Les protéines de poids moléculaire entre 40 kDa et 90 kDa sont constamment présentes parmi les isolats de *B. burgdorferi*. On observe néanmoins des différences entre les souches isolées aux États-Unis et celles isolées en Europe quant à l'expression de ces protéines de surface, notamment une homogénéité des souches américaines en ce qui concerne l'OspA (31 kDa) et l'OspB (34 kDa); par contre les souches européennes sont plus hétérogènes avec des poids moléculaires variables pour l'OspA (31-33 kDa), l'OspB (34-35 kDa) et l'OspC (21-23 kDa) (Hu et al., 1994).

Cette différence au niveau de l'expression des poids moléculaires expliquerait les divergences observées dans le tableau clinique de la maladie entre l'Amérique du Nord et l'Europe. En effet ces protéines semblent être impliquées dans la pathogénie de la borréliose de Lyme et constitueraient des candidats pour un vaccin contre cette maladie (Wilske et al., 1995).

IV. Transmission du spirochète *B. burgdorferi*

Dans la majorité des tiques infectées, le spirochète *B. burgdorferi* est limité à l'intestin où il s'accumule au niveau des microvillosités de la bordure en brosse et dans les espaces entre les cellules épithéliales (Burgdorfer, 1989a). Néanmoins dans un petit nombre de cas, il y a pénétration de la paroi intestinale puis dissémination dans l'hémolymphe et alors infection de divers organes tels que le synganglion, les tubes de Malpighi, les glandes salivaires ou les organes génitaux (Benach et al., 1987; Burgdorfer et al., 1988; Zung et al., 1989).

IV.1. Transmission à l'hôte

Deux modes de transmission sont généralement évoqués pour la transmission du spirochète *B. burgdorferi* par ses vecteurs à leurs hôtes: ce sont la transmission par la salive et la transmission par régurgitation. Différents travaux ont été réalisés pour étayer l'une ou l'autre de ces hypothèses (Burgdorfer, 1989a; Ribeiro et al., 1987).

La transmission salivariale est commune à de nombreux germes transmis par les arthropodes et parce que les Ixodidés salivent énormément pendant leur repas sanguin, c'est une voie qui a été envisagée et elle suppose l'invasion des glandes salivaires par le spirochète via l'hémolymphe. Selon Ribeiro et al., (1987), la dissémination a lieu suite à la fixation de la tique infectée sur l'hôte puis la migration dans l'hémolymphe est déclenchée après le début de l'ingestion de sang par la tique; les spirochètes apparaissant dans la salive avant que ne commence la phase d'engorgement rapide. Chez les adultes, la dissémination aurait lieu au 4ème jour après fixation alors que les nymphes produiraient une salive contenant des spirochètes dès le 3ème jour après fixation sur l'hôte. D'autres auteurs ont mis en évidence la présence de spirochètes dans les glandes salivaires (Piesman et al., 1987; Zung et al., 1989; Gern et al., 1990), renforçant ainsi l'hypothèse de la voie salivariale dans la transmission de *B. burgdorferi*.

Quoique n'ayant pas observé de spirochète dans les glandes salivaires, Benach et al., (1987), émettent eux aussi l'hypothèse que la multiplication des spirochètes pourrait avoir lieu très tôt après l'ingestion de sang et qu'une dissémination des spirochètes via l'hémolymphe vers les organes surviendrait ainsi d'où une invasion des glandes salivaires; ce qui permettrait une inoculation de ces spirochètes par les pièces buccales.

Néanmoins la transmission du spirochète par régurgitation, c'est-à-dire par reflux du contenu intestinal infectieux de la tique lors de son repas sanguin sur l'hôte, est soutenue

notamment par les faibles taux de tiques adultes présentant une infection systémique dans la nature, environ 5% chez *I. ricinus* (Burgdorfer et al., 1983) et 3% chez *I. scapularis* (Burgdorfer et al., 1988). En effet Burgdorfer (1989a) estime, en se basant sur l'hypothèse de la dissémination du spirochète via l'hémolymphe lors du repas sanguin des nymphes, que celle-ci devrait conduire à observer une prévalence plus grande d'adultes infectées systématiquement; ce qui n'est pas le cas puisque moins de 5% des adultes sauvages *I. scapularis* (Burgdorfer et al., 1988) présentent une infection généralisée.

Burgdorfer émet ainsi l'hypothèse selon laquelle l'infection des glandes salivaires n'est pas obligatoire à la transmission du spirochète par la tique à son hôte d'autant que sur 20 femelles nourries sur 5 lapins puis disséquées après oviposition, seules 2 gorgées sur le même lapin avaient une infection systémique contre 18 présentant une infection limitée à l'intestin. Cependant les 5 lapins se sont révélés infectés et ont présenté des titres élevés en anticorps.

Les 2 voies de transmission par régurgitation ou par la salive sont donc envisageables et quel que soit le mode de transmission prépondérant, la transmission du spirochète *B. burgdorferi* par ses tiques vectrices est démontrée.

IV.2. Cycle naturel de l'infection

Dans les foyers naturels, le spirochète circule entre la tique vectrice et les hôtes vertébrés réservoirs (Burgdorfer, 1989a): la tique s'infecte en se nourrissant sur un hôte spirochétémique, et de même un hôte sain sera infecté à son tour par une tique infectée qui lui transmettra le spirochète lors d'un repas de sang.

Les micromammifères semblent jouer un rôle important comme réservoirs assurant ainsi le maintien de l'infection dans la nature; avec *I. ricinus* en Europe, il s'agit principalement de *Apodemus flavicollis* (mulot à collier), de *A. sylvaticus* (mulot sylvestre) et de *Clethrionomys glareolus* (campagnol roussâtre) qui servent d'hôtes aux larves et nymphes de *I. ricinus* et qui ont été trouvés infectés dans la nature (Aeschlimann et al, 1986; Kessler, 1986; Humair et al., 1993a). Par ailleurs, les oiseaux participeraient à la dissémination du spirochète à d'autres sites dans la mesure où certaines espèces de Turdidae se sont révélées capables d'infecter les stades immatures d'*I. ricinus* (Humair et al., 1993b); ce sont les merles noirs (*Turdus merula*) et les grives musiciennes (*T. philomelos*).

Aux États-Unis, l'espèce de rongeur *Peromyscus leucopus* semble tenir le rôle majeur de réservoir parmi les micromammifères (Anderson, 1984; 1985; 1988; Jaenson, 1991).

Si le spirochète a pu être isolé d'autres animaux plus grands comme le chevreuil (*Capreolus capreolus*) (Kessler, 1986) ou le cerf (Bosler et al., 1983) ceux-ci serviraient plus d'hôtes amplificateurs dans l'abondance et la distribution des populations de tiques que de réservoirs du spirochète (Telford et al., 1988; Jaenson, 1991).

IV.3. Transmission du spirochète chez la tique

Le cycle du spirochète au sein de la tique fait intervenir 2 phénomènes qui sont la transmission transovarienne et la transmission transstadiale.

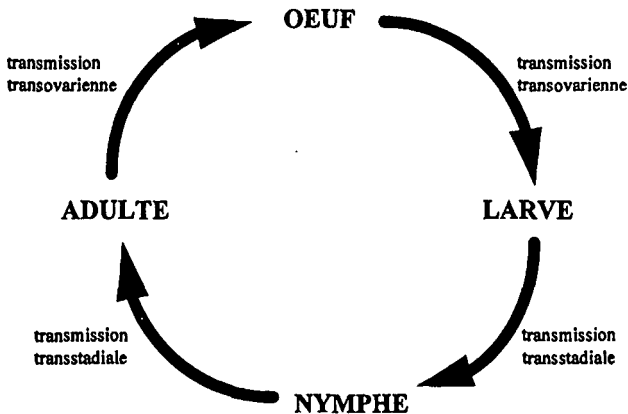


Figure 2: cycle de *B. burgdorferi* chez la tique *I. ricinus*

En effet la transmission d'un parasite, non pas d'un arthropode à un hôte vertébré, mais d'arthropode à arthropode peut survenir de cette manière; l'infection des ovaires et par la suite celle des oeufs permettant le passage du germe de la tique femelle adulte à sa descendance larvaire: c'est la transmission transovarienne ou transmission verticale qui peut se répéter sur plusieurs générations (Brumpt 1949; Aeschlimann 1958).

Il arrive que l'infection héritée par les larves par voie transovarienne ou acquise suite à un repas infectieux, soit maintenue au sein de la tique d'un stade à l'autre, des larves aux nymphes ou des nymphes aux adultes: c'est la transmission transstadiale.

Les cas de transmission par l'ovaire du vecteur ne sont pas courants chez les arthropodes; on l'observe néanmoins avec certains arbovirus, des rickettsies, des borrelies et même certains protozoaires (Tableau 6).

Tableau 6: Exemples de germes transmis par voie transovarienne

GERMES	ARTHROPODES	RÉFÉRENCES
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Ricketts 1907, cité par Fine (1975)
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	<i>Leptotrombidium akamushi</i>	Audy 1968 & Rapmund et al. (1969), cités par Fine (1975)
<i>Nairobi sheep disease virus</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Montgomery (1917), cité par Fine (1985)
<i>Borrelia duttoni</i>	<i>Ornithodoros moubata</i>	Dutton & Todd (1905) et Koch (1905), cités par Fine (1975); Aeschlimann (1958)
<i>Borrelia coriacea</i>	<i>Ornithodoros coriaceus</i>	Lane & Manweiler (1988)
<i>Babesia bigemina</i>	<i>Boophilus annulatus</i>	Smith & Kilborne (1893), cités par Fine (1975)
<i>Babesia divergens</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Donnelly & Pierce (1975)

L'importance des phénomènes de transmissions transovarienne et transstadiale peut s'avérer considérable sur le plan épidémiologique dans la mesure où une population d'arthropode peut assurer la conservation d'un agent pathogène et adjoindre ainsi un rôle de réservoir naturel à son rôle de vecteur (fig.3).

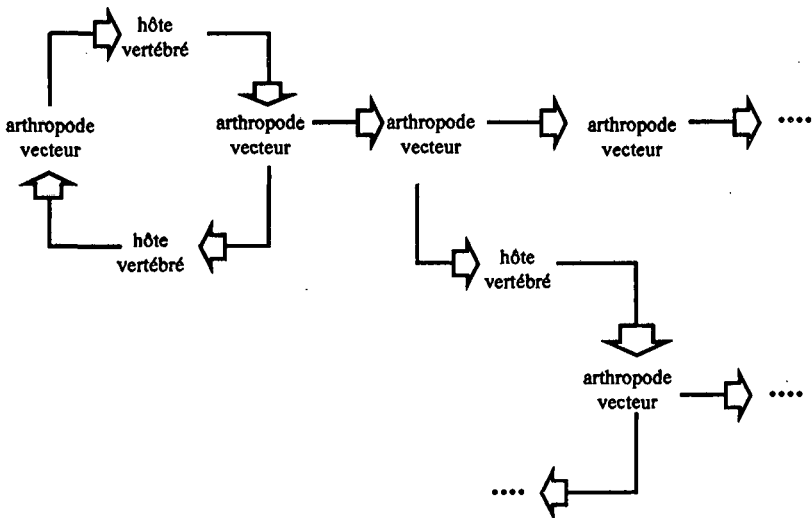


Figure 3: Cycle fondamental de circulation des agents transmis par vecteur en cas de transmission transovarienne (d'après Rodhain & Perez, 1985)

V. Buts du travail

La transmission transovarienne de *B. burgdorferi* chez *I. ricinus* a été décrite au laboratoire (Monin et al., 1989) ainsi que dans la nature (Burgdorfer et al., 1983; Stanek et al., 1986; Zhioua et al., 1994). Elle l'a été aussi chez différentes espèces d'*Ixodes* et notamment *I. scapularis* (Bosler et al., 1983 ; Piesman et al., 1986; Magnarelli et al., 1987; Burgdorfer et al., 1988), *I. pacificus* (Lane et Burgdorfer, 1987; Lane, 1992; Schoeler et Lane, 1993). De même le phénomène a été démontré au laboratoire chez *I. hexagonus* (Gern et al., 1991; Toutoungi et Gern, 1993).

Les différents travaux tendent généralement à en minimiser l'importance sur le plan épidémiologique en raison des faibles taux d'infection observés chez les larves à jeun récoltées dans la nature. Par contre sur la base de modèle mathématique, d'autres auteurs attribuent à la transmission transovarienne une contribution plus importante dans le maintien de l'infection dans la nature (Randolph, 1994; Randolph et Craine, 1995).

Que la transmission transovarienne de *B. burgdorferi* a lieu chez ses tiques vectrices, a été démontré; le phénomène a même été étudié sur plusieurs générations chez *I. pacificus* (Lane et Burgdorfer, 1987; Lane, 1992) ainsi que la relation entre le spirochète et ses tiques vectrices aux États-Unis (Burgdorfer et al., 1988; Lane, 1992; Schoeler et Lane, 1993). Mais en dehors de la mise en évidence de la capacité du spirochète "transovarien" à infecter un hôte (Stanek et al., 1986), peu de travaux ont été faits concernant la transmission transovarienne de *B. burgdorferi* chez son principal vecteur en Europe, *I. ricinus*.

A partir de tiques femelles sauvages d'*I. ricinus* récoltées infectées par *B. burgdorferi* dans la nature, nous avons étudié sur plusieurs années le devenir de l'infection par le spirochète dans leur progéniture à travers la transmission transovarienne et la transmission transstadiale.

L'infection héritée de la femelle sauvage est maintenue au sein de sa descendance, de stade à stade, sans que les tiques aient pris un repas sanguin infectieux: les différents stades évolutifs sont donc nourris sur des hôtes non infectés chez lesquels nous avons par ailleurs recherché une transmission de l'infection.

Il s'agit ainsi d'étudier en laboratoire, d'une part le maintien de l'infection par le spirochète *B. burgdorferi* chez les tiques, et d'autre part la capacité de ces tiques à transmettre

l'infection à des hôtes afin d'évaluer l'importance épidémiologique des transmissions transovarienne et transstadiale dans la nature.

Pour ce faire nous avons tenté respectivement:

- de quantifier la transmission transovarienne et la transmission transstadiale de *B. burgdorferi* chez *I. ricinus*;
- de mettre en évidence la transmission du spirochète à l'hôte;
- d'isoler et de caractériser éventuellement le spirochète "transovarien" à partir de la tique ou à partir de l'hôte.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. LES TIQUES

I.1. Stades évolutifs d'*Ixodes ricinus*

Nous avons utilisé pour les différentes expériences les 3 stades évolutifs d'*I. ricinus* à savoir les larves, les nymphes et les tiques adultes mâles et femelles.

I.2. Origine des tiques

I.2.1. Les tiques de la nature

Les tiques adultes sauvages mâles et femelles ont été récoltées dans la nature en zones d'endémie de *B. burgdorferi* dans les cantons de Berne (BE) et de Neuchâtel (NE):

- la forêt du Staatswald (BE) en Juin 1991 et en Mai 1994;
- la forêt du Bois de l'Hôpital (NE) en Juin 1993 et en Juin 1995;
- la forêt du Bois de l'Ermitage (NE) en Octobre 1995.

I.2.2. Les tiques d'élevage

Des larves et des nymphes d'*I. ricinus* saines de toute infection par *B. burgdorferi* et issues de l'élevage de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel (IZN) (Graf, 1978) sont également utilisées pour infester des souris.

II. LES ANIMAUX DE LABORATOIRE

II.1. Repas sanguin des stades immatures

Les larves et les nymphes sont nourries sur des souris mâles ou femelles; il s'agit de souris 'swiss' et de souris BALB/C issues de l'élevage de l'IZN.

Ces souris servent aussi bien au repas sanguin des larves et des nymphes saines d'élevage que des larves et nymphes infectées issues des femelles sauvages récoltées dans la nature.

II.2. Repas sanguin des adultes femelles

Les femelles sauvages récoltées sur le terrain sont nourries sur des lapins blancs (élevage des Dombes ou IFFA-CREDO, France). Il en est de même pour les tiques femelles issues de la descendance de ces femelles sauvages.

III. RÉCOLTE DES TIQUES

III.1. La technique du drapeau

Les tiques ont été récoltées par la technique du drapeau, c'est-à-dire par passage d'un carré de tissu-éponge sur la végétation basse; ceci permet la capture des différents stades évolutifs d'*I. ricinus* en position d'affût.

Sur le terrain, les tiques adultes mâles et femelles récoltées à l'aide de brucelles sur le drapeau sont stockées séparément dans des tubes de verre puis ramenées au laboratoire.

Tiques mâles et femelles sont alors mélangées en nombre égal, pour la copulation, dans des tubes de verre puis placées en chambre humide (humidité relative de 85% au minimum) et à température ambiante jusqu'à l'infestation du lapin.

IV. INFESTATION DES ANIMAUX

IV.1. Repas sanguin des femelles

IV.1.1. Infestation du lapin

Placé dans une cage de contention, le lapin muni d'un collier est infesté avec les tiques adultes mâles et femelles au niveau de ses oreilles qui sont recouvertes chacune au préalable d'un manchon de tissu ou fourreau fermé à ses 2 extrémités par du ruban adhésif. Le collier sert à empêcher le lapin de se gratter les oreilles et d'éliminer ainsi les tiques.

IV.1.2. Récolte des tiques gorgées

Une fois gorgées, soit 7 à 10 jours après infestation, les femelles se détachent du lapin et tombent dans le fourreau où elles sont récupérées à l'aide de pinces entomologiques.

IV.1.3. Conservation des femelles gorgées

Les femelles gorgées sont pesées après avoir été récoltées du lapin puis conservées individuellement jusqu'à la ponte dans des tubes en verre, en chambre humide et à la température ambiante.

IV.2. Repas sanguin des larves et des nymphes

La souris est endormie par injection au niveau d'une patte postérieure de 0.03 à 0.04 ml d'un mélange anesthésique (0.5 ml de ketaminum/0.8 ml de xylazinum) (Narketan[®] / Xylasol[®]). Elle est ensuite munie d'un collier avant d'être infestée par les larves ou les nymphes.

IV.2.1. Les larves

La souris est infestée sur la tête par les larves qui sont déposées à l'aide d'une paire de brucelles. Après infestation, la cage de la souris est placée dans un bac contenant de l'eau pour la récolte des larves gorgées.

IV.2.2. Les nymphes

IV.2.2.1. Préparation de la colle

Un mélange collant à base de colophonium (4 parts) et de cire d'abeille (1 part) (Mbow et al., 1994) est utilisé pour fixer les capsules sur les flancs de la souris.

Le colophonium en morceaux est chauffé dans un bain-marie jusqu'à la fusion puis les écailles de cire sont rajoutées dans le récipient. Le mélange est remué à l'aide d'une baguette jusqu'à obtention d'un fluide homogène et il s'utilise chaud.

IV.2.2.2. Infestation des souris

L'infestation des souris avec les nymphes se fait dans des capsules en plastique, de 18 mm de diamètre, placées sur les flancs préalablement rasés (Mbow et al., 1994). Les capsules sont fixées sur l'animal à l'aide d'une colle à base de colophonium et de cire blanche (voir ci-dessus).

La capsule est munie d'une ouverture par laquelle les tiques sont déposées sur la souris et par laquelle elles s'échapperont une fois gorgées. Cette ouverture est fermée immédiatement après l'infestation avec une toile adhésive, toile qui est retirée 3 jours après infestation, une fois que les nymphes se sont fixées.

La cage de la souris est placée ensuite dans un bac contenant de l'eau pour la récolte des nymphes gorgées.

IV.2.3. Récolte et conservation des larves et des nymphes gorgées

Les larves et les nymphes gorgées après leur détachement de la souris quittent la cage et tombent dans l'eau du bac où elles sont récupérées.

Les tiques sont séchées sur du papier buvard puis stockées dans des tubes en verre dans une chambre humide et à la température ambiante, jusqu'à la mue.

V. MISE EN ÉVIDENCE DE L'INFECTION

V.1. Détection du spirochète *B. burgdorferi* chez les tiques

V.1.1. Test direct d'immunofluorescence

V.1.1.1. Principe

Le test direct d'immunofluorescence (IFD) permet la mise en évidence et la localisation d'antigènes en microscopie à fluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique rendu fluorescent par couplage à un colorant fluorescent: l'immun-sérum spécifique combiné à la molécule fluorescente est appliqué directement sur l'antigène.

Nous utilisons cette méthode pour détecter le spirochète *B. burgdorferi* sur des étalements d'oeufs, de tiques à jeun in toto (larves, nymphes ou adultes mâles et femelles) ou sur des étalements d'organes de tiques après dissection (adultes mâles et femelles à jeun ou adultes femelles gorgées).

Les étalements sont réalisés sur des lames de verre préalablement dégraissées dans un mélange d'éther et d'alcool (2/3 d'éther pour 1/3 d'alcool absolu).

V.1.1.2. Étalements des tiques *In toto*

Les échantillons de tiques sont écrasés individuellement sur une lame dégraissée dans une goutte de tampon PBS (0.15M, pH 7.35) puis étalés afin d'obtenir un étalement mince. Les lames avec les étalements sont séchées à l'étuve à 34°C pendant 12h à 24h.

Pour éviter des étalements épais, les tiques gorgées et les adultes à jeun sont chacune étalées sur plusieurs spots.

V.1.1.3. Dissection des tiques adultes

Les tiques adultes mâles et femelles à jeun sont disséquées dans une goutte de tampon PBS puis l'intestin est prélevé et étalé sur une lame.

Les femelles gorgées sont également disséquées après oviposition puis l'ovaire et l'intestin sont prélevés et étalés sur une lame. L'intestin des femelles gorgées est lavé par passage dans plusieurs gouttes de tampon PBS pour en éliminer les restes de repas sanguin.

Les étalements sont séchés à l'étuve à 34°C pendant 12h à 24h.

V.1.1.4. Exécution de la réaction d'immunofluorescence directe

Après fixation à l'acétone, les préparations sont testées à l'aide d'un conjugué fluorescent constitué d'un anticorps anti-*B. burgdorferi* obtenu à partir de lapin (Gern et al., 1991) puis couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine selon la méthode décrite par Peacock et al., (1971); la fluorescéine émet une lumière vert-jaune. Les préparations sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Olympus B-H2).

Dans la pratique, on trempe la lame dans un bain d'acétone pure pendant 10 mn puis on la retire et laisse évaporer l'acétone. On dépose ensuite sur l'étalement une goutte de conjugué fluorescent dilué avec du tampon PBS au taux donné par un titrage préalable. La goutte doit recouvrir la totalité de l'étalement.

On laisse en contact pendant 30 minutes dans une chambre humide à 37°C. On rejette l'excès du conjugué, puis on réalise 2 lavages de 5 minutes chacun par immersion de la lame dans le tampon PBS contenu dans un bac à lame.

Après un rinçage à l'eau déminéralisée, on laisse sécher la lame à la température ambiante ou sous ventilation. Enfin on dépose une petite goutte de glycérine tamponnée (9 volumes de glycérine pure pour 1 volume de PBS) sur l'étalement et on recouvre avec une lamelle.

- | | |
|------------------|-----------------------|
| - éthanol à 70% | 15 mn à 4°C |
| - éthanol à 80% | 20 mn à 4°C |
| - éthanol à 95% | 20 mn à 20°C (2 fois) |
| - éthanol à 100% | 20 mn à 20°C (3 fois) |

Infiltration

La tique est imprégnée par le chloroforme, un solvant de la paraffine:

- | | |
|--|--------------------|
| - mélange à parts égales d'alcool absolu et de chloroforme | 1h à 20°C |
| - chloroforme pur | 1h à 20°C (2 fois) |

Inclusion

La tique est baignée dans la paraffine avant l'inclusion:

- | | |
|----------------------------------|---|
| - paraffine I | 2h à 57°C |
| - paraffine II | 2h à 57°C |
| - paraffine III pour l'inclusion | la tique est incluse dans un moule en papier qui est ensuite refroidi dans un bain d'eau. |

V.1.2.2. Coupes au microtome

On réalise des coupes de 8 μm d'épaisseur au microtome (E. Leitz, Wetzlar) et on les dépose sur des lames préalablement dégraissées à l'acide chlorhydrique (HCl 32%) puis recouvertes d'une fine pellicule d'albumine glycinée (mélange 1:1 de glycérine pure et d'albumine, additionné de thymol pour la conservation).

V.1.2.3. Coloration de Dieterle

Nous utilisons la technique modifiée selon Van Orden et Greer (1977).

Les coupes sont déparaffinées puis amenées à l'eau par passages successifs dans des bains de xylène puis d'alcool éthylique de concentration progressivement décroissante:

- | | |
|---|------------|
| - xylène | 10 à 15 mn |
| - mélange à parts égales de xylène et d'alcool absolu | 2 mn |
| - éthanol à 100% | 2 mn |
| - éthanol à 95% | 2 mn |
| - éthanol à 80% | 2 mn |
| - éthanol à 70% | 2 mn |

2. Matériel et méthodes

On procède ensuite à la coloration proprement dite des coupes qui sont trempées dans différents bains de réactifs et d'eau puis montées:

- solution alcoolique de nitrate d'uranyle à 5% 1h à 55-58°C à l'étuve

La solution de nitrate d'uranyle est préalablement chauffée à 55-58°C pendant au moins 30 minutes.

- eau distillée 30 secondes
- éthanol à 95% 30 secondes
- solution alcoolique de gomme mastic à 10% (Sigma) 10 mn
- éthanol à 95% 30 secondes
- eau distillée 1 mn, ensuite bien sécher la lame (15-20 mn)
- solution de nitrate d'argent à 1% 4h à 55-58°C à l'étuve et à l'obscurité

La solution de nitrate d'argent est préalablement chauffée à 55-58°C pendant au moins 30 minutes.

- eau distillée 30 secondes (2 fois)
- solution de développement environ 8 mn, jusqu'à obtention d'une teinte jaune pâle à ocre ou brun roux
- eau distillée 30 secondes (2 fois)
- éthanol à 95% 30 secondes (2 fois)
- acétone 1 mn (2 fois)
- xylène 3 mn (2 fois)

Monter les lames (résine et lamelle) (plaque chauffante à 52°C).

Les coupes sont observées au microscope à un grossissement de 1000X et à immersion (Olympus). Les spirochètes apparaissent sous la forme de filaments de couleur noire sur fond jaune à brun.

V.1.3. Isolement du spirochète *B. burgdorferi* à partir de tiques par mise en culture dans du milieu BSK-II

V.1.3.1. Préparation du milieu BSK-II pour la culture des spirochètes

Le milieu de culture que nous avons utilisé est dérivé du milieu décrit par Barbour et al. (1984).

A)

100 ml CMRL 1066 sans glutamine (10x)	(Gibco)
5 g Neopeptone	(Difco)
50 g Albumine Bovine (Fraction V)	(Boehringer)

Bien mélanger à l'agitateur

B)

Ajouter dans A:

2 g Yeastolate	(Difco)
6 g HEPES (acide)	(Sigma)
5 g Glucose	(Merck)
0.7 g Citrate de sodium	(Merck)
0.8 g Pyruvate de sodium	(Merck)
0.4 g N-acetyl glucosamine	(Sigma)
2.2 g Bicarbonate de sodium	(Merck)

Bien mélanger à l'agitateur

C)

14 g Gélatine	(Difco)
dans 200 ml d'eau distillée préchauffée	

Bien mélanger et ajouter au mélange A+B

D)

Ajuster le pH à 7.6-7.65 avec du NaOH 1N	
Ajouter 6% de serum décomplémenté de lapin	(Difco)

E)

Antibiotiques:

50 g/ml de Fosfocin	(Boehringer)
50 g /ml de Rimactan	(Ciba-Geigy)

F)

Filtrer avec des filtres VacuCap 90 / 0.2 microns	(Gelman Sciences)
---	-------------------

V.1.3.2. Mise en culture des tiques

Les tiques sont désinfectées à l'alcool à 70°, elles sont soit incisées soit disséquées pour le prélèvement d'organes et la mise en culture se fait dans des tubes contenant 4 ml de milieu BSK-II avec antibiotiques. Les cultures sont gardées à l'étuve à 34°C et sont examinées au microscope à fond noir 10 jours après, puis tous les 7 jours pendant 1 à 2 mois; les tubes contaminés sont éliminés.

Les larves et les nymphes à jeun sont coupées en 2 tandis que les larves gorgées sont triturées dans 50 µl de milieu BSK-II puis inoculées dans un tube contenant du milieu de culture.

Les tiques adultes mâles et femelles à jeun sont soit coupées en 2 soit disséquées dans une goutte de milieu BSK-II et l'intestin prélevé est mis en culture.

Les femelles gorgées sont disséquées après oviposition dans du tampon PBS (0.15M, pH 7.35) puis des morceaux d'ovaire et d'intestin sont prélevés et également mis en culture.

V.2. Détection de l'infection chez l'hôte

V.2.1. Biopsies d'oreilles

Les souris sont endormies comme décrit au IV.2; les oreilles sont désinfectées à l'alcool à 70°C puis à l'aide de fins ciseaux on prélève de chaque oreille 2 morceaux que l'on place dans des tubes contenant du milieu de culture BSK-II avec antibiotiques.

Les tubes de culture contenant les biopsies d'oreilles sont gardés à l'étuve à 34°C puis contrôlés 10 jours après puis tous les 7 jours environ au microscope à fond noir pendant un à deux mois. Les tubes de culture contaminés sont éliminés.

V.2.2. Xénodiagnose

Les souris sur lesquelles se sont nourries des tiques infectées par *B. burgdorferi* (larves ou nymphes) sont infestées par des tiques saines d'élevage qui après seront examinées en IFD soit gorgées soit après mue pour la recherche de spirochètes. La présence de spirochètes chez les tiques de xénodiagnose indique que les souris sont infectées.

Généralement on utilise des larves saines d'élevage pour le test de xénodiagnose, mais nous nous sommes servis également de nymphes saines d'élevage.

V.2.3. Détection du spirochète *B. burgdorferi* dans le sang de la souris

Le plasma de souris ayant servi à nourrir des tiques infectées par *B. burgdorferi* est examiné au microscope à fond noir pour la recherche de spirochètes.

Le sang de souris est prélevé au niveau de l'oeil dans la région du plexus rétro-orbitaire à différents moments après l'infestation des souris par des tiques infectées, et il est recueilli dans des flacons contenant un anticoagulant (EDTA-K, 1.6 mg/ml de sang) puis il est centrifugé à 2000 tours/mn pendant 10 minutes. Le plasma est récupéré et observé au microscope à fond noir au grossissement 500X.

Cette méthode a été utilisée pour mettre en évidence le spirochète dans le plasma de souris infestées soit par des nymphes infectées par voie transstadiale à partir de larves ayant hérité l'infection d'une femelle sauvage suite à une transmission transovarienne, soit par des larves infectées de deuxième génération.

Dans le cas des nymphes infectées, le plasma a été examiné aux jours J₇, J₁₅ et J₂₂; et aux jours J₅, J₁₃, J₁₈ et J₂₂ pour les larves infectées.

Par ailleurs le plasma de souris infectées a été mis en culture dans du milieu BSK-II avec ou sans antibiotique et 125 µl à 300 µl de plasma ont été inoculés dans des tubes contenant 2 ml de milieu.

V.2.4. Recherche d'anticorps anti-*Borrelia burgdorferi*

V.2.4.1. Prise de sang aux souris

La souris est endormie comme décrit au IV.2, puis à l'aide de pipettes Pasteur stérilisées le sang est recueilli au niveau de l'oeil dans la région du plexus rétro-orbitaire et transféré dans des tubes eppendorf. Il est conservé à 4°C pendant 12h puis centrifugé 10 mn à 3000 rpm. Le serum est ensuite congelé à -20°C.

V.2.4.2. Préparation des antigènes solubles et figurés

Les spirochètes sont mis en culture dans du milieu BSK-II à 34°C pendant 7 à 10 jours puis centrifugés à 21.000 g pendant 30 mn à 15-20°C. Le culot obtenu est utilisé pour préparer soit de l'antigène soluble pour le test d'immunodot-blot soit de l'antigène pour le SDS-PAGE / Western-blot.

V.2.4.2.1. L'antigène soluble pour l'immunodot-blot

Le culot est lavé 2 fois dans du PBS (0.01M, pH 7.2) puis il est repris dans un mélange à parts égales de PBS 0.01M (pH 7.2) et de NaCl 2M dans du PBS; il est ensuite soniqué (sonde: 3 mm) dans un bain de glace et d'alcool pendant 10 mn à 60% de l'intensité maximale (sonicateur: vibra cell, Sonics & Materials, Inc. Danbury, et U.S.A.). On centrifuge à 21.000 g à 4°C pendant 30 mn et le culot est remis en suspension dans du NaCl 1M et de nouveau centrifugé.

Les surnageants sont mélangés puis dialysés contre de l'eau distillée puis du PBS et enfin le dialysat est centrifugé dans les mêmes conditions.

Le culot est repris dans du PBS puis soumis à une digestion dans un tampon de digestion (1% SDS, 10% mercapto-éthanol, 0.125M Tris-HCl pH 6.8) et chauffé 2 mn à 100°C; laisser incuber quelques heures à température ambiante puis centrifuger à 21.000 g à 4°C et dialyser comme précédemment.

Les protéines sont dosées au spectrophotomètre et l'antigène est congelé à -20°C; la formule suivante est appliquée pour la détermination de la concentration des échantillons en antigènes (Stoscheck, 1990):

Concentration en protéines (mg/ml) = $(1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260})$ (où A est l'absorbance).

V.2.4.2.2. L'antigène pour le SDS-PAGE/WESTERN-BLOT

Le culot est lavé 2 fois dans du PBS+5mM MgCl₂ à 20°C pendant 20 mn par centrifugation à 10.000 g puis repris dans le même tampon; il est homogénéisé et la concentration en protéines est déterminée au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance selon la formule indiquée au V.2.4.2.1.

V.2.4.3. SDS-PAGE / Western-blot

Les antigènes sont séparés par électrophorèse, selon leur poids moléculaire, par migration à travers un gel d'acrylamide et en présence de SDS; ils sont ensuite transférés électriquement sur une feuille de nitrocellulose. L'incubation de la feuille avec un immun-sérum permet la formation d'un complexe antigène-anticorps qui sera ensuite révélé par une dernière incubation en présence d'une anti-immunoglobuline conjuguée à une enzyme. L'adjonction d'un substrat adéquat permet alors de visualiser l'antigène recherché grâce à la transformation du substrat en produit coloré.

On mélange 15 µl d'échantillon contenant 30µg d'antigène avec 15 µl de tampon d'échantillon et le mélange bouilli est séparé par électrophorèse sur un gel de 12.5% d'acrylamide (Bio.Rad Laboratories) à 30 mA.

Les protéines sont ensuite transférées sur un papier de nitrocellulose pendant 1h avec un courant électrique d'intensité correspondant à 0.8 mA/cm² de gel dans une cuve (2117-250 Nova Blot Electrophoretic Transfert Kit, LKB AB Bromma, Sweden).

Après transfert, la feuille est colorée au rouge Ponceau 5 à 10 mn puis décolorée à l'eau distillée. On la découpe ensuite en bandes que l'on rince avec du TBS (0.02M Tris-HCl, pH 7.5) et qu'on sature avec du TBS-Lait 5% (lait écrémé, Rapilait, Migros, en solution dans du TBS) pendant 15 mn (2 fois) puis 2h sous agitation.

Les bandes sont lavées avec du TBS puis incubées toute une nuit à température ambiante et sous agitation avec les sera de souris dilués 100X dans du TBS-Lait 1%.

On rince plusieurs fois avec du TBS-Lait 5% pendant 15 mn puis on lave dans du TBS. Les bandes sont alors incubées avec des anti-immunoglobulines marquées à la peroxydase (anti-mouse IgG, Nordic Immunological laboratories, Tilburg, The Netherlands) et diluées 1000X dans du TBS-Lait 1% pendant 1h sous agitation.

Après 3 rinçages avec du TBS-Lait 5% pendant 10 mn, les bandes sont lavées dans du TB (10 mM Tris-HCl, pH 6.8) et révélées par incubation de 10 à 20 mn dans un mélange de 4 chloro-1-naphthol dilué 5X dans du TB et d'eau oxygénée à 30% (0.33 µl par mélange).

Les bandes sont rincées à l'eau distillée puis séchées et gardées à l'abri de la lumière.

V.2.4.4. Immunodot-blot

La feuille de nitrocellulose est lavée 5 mn sous agitation dans de l'eau distillée puis séchée à température ambiante.

Les antigènes sont ensuite déposés dans un volume de 1 µl sous forme de spots à 2 concentrations (0.5 µg et 1 µg) puis on laisse sécher 5 à 10 mn à 4°C.

On lave pendant 5 mn avec du TBS (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.4) et l'on découpe en bandes la feuille encore humide.

On sature les sites actifs libres sur la nitrocellulose par une solution concentrée en protéines immunologiquement inertes, le TBS-Lait 3% dans lequel les bandes de papier sont incubées 15 mn sous agitation.

Après un lavage avec du TBS, les antigènes sont incubés toute une nuit à 4°C sous agitation avec les sera de souris à tester dilués 100X dans la solution de TBS-Lait 3%.

On lave les bandes dans plusieurs bains de TBS pendant 30 mn et on les sature de nouveau avec du TBS-Lait 3% pendant 15 mn.

Après un lavage avec du TBS, les bandes sont incubées sous agitation et à température ambiante pendant 2h avec les anti-immunoglobulines marquées à la peroxydase (anti-mouse IgG, Nordic Immunological laboratories, Tilburg, The Netherlands) dilués 1000X.

On lave pendant 30 mn dans plusieurs bains de TBS puis on révèle en incubant les bandes dans une solution de 4-chloro-naphtol diluée 5 fois dans du TBS additionnée d'eau oxygénée à 30% (0.01% v/v). Les spots positifs donnent une teinte bleue au bout de 2 à 15 mn.

Les bandes sont rincées à l'eau distillée puis séchées et conservées à l'obscurité.

V.2.5. Détection et caractérisation du spirochète par PCR

Nous avons utilisé une technique de PCR pour essayer de détecter puis de caractériser le spirochète à partir de biopsies d'oreilles et de tiques en culture dans le milieu BSK-II, et à partir d'étalements de tiques sur lames.

V.2.5.1. Étalements de tiques sur lames

Les tiques sont écrasées sur une lame dégraissée et récupérées à partir des différents spots par grattage dans 30 µl d'une solution de 0.01M Tris-HCl pH 7.8 / EDTA 0.005M. On rajoute 300 µg/ml de protéinase K et on laisse incuber à 50°C toute une nuit. Les échantillons sont bouillis ensuite à 100°C pendant 15 mn et testés par PCR (Demaerschalck, 1995).

Cette technique ne permet que la caractérisation du genre *Borrelia* mais pas de l'espèce. Nous l'avons utilisée sur des étalements de larves F₁ à jeun et de nymphes F₁ à jeun infectées et positives à l'examen par IFD.

V.2.5.2. Cultures de tiques et de biopsies d'oreilles

Les cultures sont centrifugées à 10.000 tours/mn pendant 20 mn à 20°C et le culot obtenu est ensuite lavé 2 fois avec 1 ml de PBS+5mM MgCl₂ par centrifugation dans les mêmes conditions. On reprend le culot dans 50 µl d'eau ultrafiltrée et après homogénéisation, on centrifuge 30 secondes; on chauffe ensuite pendant 10 mn à 95°C et centrifuge de nouveau 30 secondes. Les échantillons sont entreposés dans la glace et soumis à un test de PCR (Postic et al., 1994).

Cette technique a été utilisée pour essayer de détecter puis de caractériser au niveau de l'espèce les spirochètes des tiques infectées (larves, nymphes, adultes mâles et femelles) mises en culture dans du milieu BSK-II et dans les cultures de biopsies d'oreilles de souris infestées par ces tiques. Toutes ces cultures n'ont pas présenté de spirochètes à l'examen au microscope à fond noir au cours des différents contrôles.

V.2.6. Expérience de cofeeding

V.2.6.1. Principe

La technique de 'cofeeding' est utilisée pour essayer de mettre en évidence une transmission du spirochète *B. burgdorferi* de tiques infectées à tiques non infectées se nourrissant sur un même hôte non infecté (Gern et Rais, 1996). Les tiques non infectées sont examinées après la mue en IFD pour la recherche de spirochètes c'est-à-dire pour vérifier s'il y a eu transmission.

L'infestation de l'hôte se fait dans une capsule afin de circonscrire le site d'infestation des tiques saines et des tiques infectées.

V.2.6.2. Protocole d'infestation

Nous avons utilisé pour ces expériences d'une part des nymphes de première génération infectées transstadialement et issues de larves infectées par voie transovarienne, et d'autre part des larves infectées de deuxième génération. Nous cherchions à savoir s'il y avait transmission du spirochète *B. burgdorferi* par ces tiques infectées suivie ou non d'une dissémination de l'infection.

Dans le cas des larves infectées, la souris est infestée dans un premier temps avec des nymphes saines au jour J_0 puis au jour J_1 avec des larves infectées par *B. burgdorferi* afin que nymphes saines et larves infectées se nourrissent en même temps et sur le même site d'infestation.

Dans le cas des nymphes infectées, on infeste d'abord la souris avec ces nymphes au jour J_0 puis au jour J_2 avec des larves saines.

Ensuite à différents intervalles de temps après l'infestation par les tiques infectées, on réalise une série de xénodiagnoses soit au site d'infestation pour détecter une infection localisée, soit au niveau de la tête en même temps que des biopsies d'oreilles pour déceler une dissémination de l'infection chez l'hôte.

Les biopsies d'oreilles sont mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques et examinées au microscope à fond noir. Les tiques de xénodiagnose sont examinées après mue en IFD.

3.1. RÉCOLTE DE JUIN 1991

I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES

Notre première récolte a eu lieu dans la forêt du Staatswald dans le Canton de Berne au mois de Juin 1991 et pour cette récolte, un total de 55 femelles ont été obtenues.

Un lapin a servi d'hôte à 50 des tiques sauvages récoltées et au total 42 tiques gorgées ont été récupérées. Finalement 34 de ces femelles gorgées ont donné une ponte, soit 80.95% des femelles gorgées.

Chaque tique gorgée a été pesée après détachement du lapin et les poids de ces femelles sont figurés sur le tableau 1. L'examen du poids des femelles gorgées a montré une moyenne de poids de 219.45 mg (écart-type de 93.12).

Après oviposition, 34 femelles moribondes ont été disséquées et l'examen en IFD de chacune d'elles a montré des spirochètes pour une seule, la tique no. 10 (Tableau 1). Le poids de cette femelle ayant donné une ponte positive était de 218.77 mg.

Tique (no.)	Poids en mg	Infection des organes		Nb d'oeufs infectés / nb d'oeufs examinés	Tique (no.)	Poids en mg	Infection des organes		Nb d'oeufs infectés / nb d'oeufs examinés
		intestin	ovaire				intestin	ovaire	
1	266.54	négatif	négatif	0/55	18	202.75	négatif	négatif	0/55
2	154.45	négatif	négatif	0/55	19	253.64	négatif	négatif	0/55
3	229.45	négatif	négatif	0/55	20	121.48	négatif	négatif	0/55
4	286.10	négatif	négatif	0/55	21	263.82	négatif	négatif	0/55
5	110.50	négatif	négatif	0/55	22	203.68	négatif	négatif	0/55
6	100.50	négatif	négatif	0/55	23	323.41	négatif	négatif	0/55
7	137.94	négatif	négatif	0/55	24	232.41	négatif	négatif	0/55
8	311.44	négatif	négatif	0/55	25	55.99	négatif	négatif	0/55
9	266.39	négatif	négatif	0/55	26	83.68	négatif	négatif	0/55
10*	218.77	positif	positif	24/55	27	47.94	négatif	négatif	0/55
11	410.70	négatif	négatif	0/55	28	39.23	négatif	négatif	0/55
12	266.39	négatif	négatif	0/55	29	340.71	négatif	négatif	0/55
13	323.91	négatif	négatif	0/55	30	302.32	négatif	négatif	0/55
14	377.15	négatif	négatif	0/55	31	219.41	négatif	négatif	0/55
15	258.19	négatif	négatif	0/55	32	294.42	négatif	négatif	0/55
16	193.19	négatif	négatif	0/55	33	150.52	négatif	négatif	0/55
17	196.09	négatif	négatif	0/55	34	218.52	négatif	négatif	0/55

* femelle avec ponte positive

Tableau 1: Poids des femelles sauvages gorgées et infection des organes et des pontes.

II. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE *B. BURGDORFERI* AUX OEUFS

Nous avons écrasé 55 oeufs de chacune des 34 pontes, soit au total 1870 oeufs examinés en IFD pour la recherche de spirochètes, et seule une ponte a présenté des oeufs infectés, elle correspond à celle de la femelle no. 10 (Tableau 1): ceci donne une fréquence de transmission transovarienne de 2.9%.

Les oeufs de cette ponte examinés en IFD se sont révélés positifs à 43.6%, soit 24/55 oeufs infectés. L'observation en IFD d'ovocytes prélevés au moment de la dissection dans l'appareil génital de la femelle no. 10 a montré la présence de spirochètes fluorescents.

Les oeufs de cette ponte positive n'ont malheureusement pas éclos en larves et nous n'avons pas pu aller plus loin dans nos analyses avec cette première récolte.

Par ailleurs, des tentatives d'isolement du spirochète ont été faites à partir des organes de la femelle no.10 (ovaire et intestin) après dissection mais aussi à partir des oeufs de sa ponte positive; 20 oeufs écrasés dans du milieu BSK-II avec antibiotiques ont ainsi été mis en culture par tube et un total de 80 oeufs ont servi à ces tentatives. La mise en culture de l'intestin, de l'ovaire et des oeufs n'a pas permis d'isoler le moindre spirochète.

3.2. RÉCOLTE DE JUIN 1993

I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES

La deuxième récolte a eu lieu à Neuchâtel dans le Bois de l'Hôpital au mois de Juin 1993 et nous avons récolté 138 femelles.

De cette récolte nous avons utilisé 78 femelles pour infester un lapin et 76 femelles gorgées ont été récupérées dont 71 ont donné une ponte (soit 93.42%). Chaque tique gorgée a été pesée après détachement du lapin (Tableau 1). L'examen du poids des femelles gorgées a donné une moyenne de poids de 297.88 mg (écart-type 65.19).

Contrairement à la récolte précédente, les femelles gorgées n'ont pas été systématiquement disséquées après oviposition mais seule la femelle no. 32 ayant donné une ponte positive l'a été. Le poids de cette femelle était de 325.45 mg et l'examen de ses organes après dissection a montré des spirochètes dans l'ovaire et dans l'intestin en IFD.

Tique (no.)	Poids en mg	Nbre d'oeufs infectés / nbre d'oeufs examinés	Tique (no.)	Poids en mg	Nbre d'oeufs infectés / nbre d'oeufs examinés	Tique (no.)	Poids en mg	Nbre d'oeufs infectés / nbre d'oeufs examinés
1	331.50	0/60	27	264.25	0/60	53	375.26	0/60
2	329.38	0/60	28	320.45	0/60	54	259.31	0/60
3	241.73	0/60	29	352.44	0/60	55	306.49	0/60
4	161.45	0/60	30	268.31	0/60	56	392.78	0/60
5	259.34	0/60	31	273.31	0/60	57	310.70	0/60
6	218.36	0/60	32*	325.45	39/60	58	427.70	0/60
7	259.71	0/60	33	325.45	0/60	59	374.84	0/60
8	290.93	0/60	34	297.31	0/60	60	212.08	0/60
9	348.30	0/60	35	311.74	0/60	61	376.00	0/60
10	423.11	0/60	36	360.21	0/60	62	242.22	0/60
11	413.85	0/60	37	290.00	0/60	63	339.11	0/60
12	296.06	0/60	38	419.85	0/60	64	327.00	0/60
13	274.34	0/60	39	249.34	0/60	65	183.51	0/60
14	198.49	0/60	40	282.90	0/60	66	114.99	0/60
15	306.26	0/60	41	377.68	0/60	67	306.81	0/60
16	279.26	0/60	42	255.31	0/60	68	253.49	0/60
17	378.79	0/60	43	307.78	0/60	69	238.16	0/60
18	218.62	0/60	44	291.15	0/60	70	227.00	0/60
19	371.82	0/60	45	235.91	0/60	71	327.53	0/60
20	271.83	0/60	46	285.21	0/60	72	416.34	**
21	347.51	0/60	47	300.35	0/60	73	301.34	**
22	297.15	0/60	48	378.60	0/60	74	281.89	**
23	249.15	0/60	49	290.80	0/60	75	194.00	**
24	253.50	0/60	50	197.80	0/60	76	249.00	**
25	270.79	0/60	51	411.81	0/60			
26	280.46	0/60	52	356.70	0/60			

* femelle avec ponte positive

** absence de ponte

Tableau 1: Poids des femelles sauvages gorgées et infection des oeufs des pontes obtenues.

II. TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DE *B. BURGDORFERI* AUX OEUFES ET AUX LARVES F₁

II.1. Infection des oeufs

Pour chacune des 71 pontes, nous avons examiné 60 oeufs en IFD, soit au total 4260 oeufs, et une seule ponte a montré des oeufs infectés (Tableau 1): ceci donne une fréquence de transmission transovarienne de 1.4%. Cette ponte s'est révélée positive à 65%, soit 39/60 oeufs infectés.

II.2. Infection des larves F₁ à jeun

La ponte positive de la femelle no. 32 nous a permis d'obtenir une descendance larvaire qui a été examinée en IFD et s'est révélée également positive: un total de 17/36 larves à jeun étaient infectées, soit un pourcentage de 47.22%. Par rapport aux oeufs, aucune différence significative n'est observée quant à l'infection des larves ($P=0.13392$; test exact de Fischer avec seuil de significativité pour $P<0.05$).

Comme pour les oeufs, nous ne nous sommes pas intéressé au décompte des larves à jeun; mais nous pouvons en estimer le nombre par rapport au total de larves utilisées pour les expériences d'infestation des souris ou de mise en culture de ces larves. Dans le cas de cette ponte, très peu de larves ont été utilisées pour les différentes expériences et un total de 1583 larves a été dénombré.

Les tentatives d'isolement du spirochète par mise en culture des larves dans du milieu BSK-II avec antibiotiques ont été faites avec un total de 23 larves à jeun. Ainsi 13 tiques ont été mises en culture individuellement et un broyat de 10 tiques a été inoculé dans un tube contenant du milieu de culture.

L'examen périodique des différents tubes de culture n'a pas révélé de spirochète au microscope à fond noir.

III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE *B. BURGDORFERI* DES LARVES F₁ AUX ADULTES

III.1. Repas sanguin des larves F₁

Nous avons utilisé 300 larves pour infester une souris afin d'obtenir des nymphes après mue dans le but de suivre l'évolution de l'infection par *B. burgdorferi* sensu lato au stade nymphal. Un total de 210 larves ont été récoltées et conservées jusqu'à la mue.

III.2. Transmission de *B. burgdorferi* par les larves F₁ aux souris

Les tentatives de mise en évidence d'une transmission du spirochète par la larve à son hôte ont été faites à partir de biopsies d'oreilles des souris mises en culture, de tiques de xénodiagnose examinées par IFD, et indirectement par détection d'anticorps dans le serum des souris par immunodot-blot (ou western-blot).

Un total de 4 biopsies successives ont été faites sur la souris, respectivement 3 semaines (J₂₄ = groupe I), 8 semaines (J₆₀ = groupe II), 17 semaines (J₁₂₇ = groupe III) et 5 mois (J₁₅₀ = groupe IV) après son infestation par des larves infectées. Les différents contrôles des milieux de culture contenant les différentes biopsies au microscope à fond noir se sont révélés négatifs.

Quatre xénodiagnoses successives ont été faites sur la souris dont trois avec des larves saines et une quatrième avec des nymphes saines (Tableau 2).

Pour la 1ère xénodiagnose ayant eu lieu 4 mois (J₁₂₇) après l'infestation par les larves infectées, 60 larves saines ont été utilisées: 6 larves gorgées ont été examinées en IFD ainsi que 8 nymphes à jeun après mue; aucune des tiques gorgées ou à jeun n'a montré de spirochètes.

La 2ème xénodiagnose a été faite 5 mois après infestation avec 20 nymphes saines. Huit nymphes gorgées ont été examinées en IFD et se sont révélées négatives.

Pour la 3ème xénodiagnose qui a eu lieu 6 mois (J₁₈₃) après infestation, 85 larves saines ont été utilisées et 16 larves gorgées ont été examinées en IFD ainsi que 8 nymphes à

jeun après mue. La 4^{ème} xénodiagnose s'est faite 15 mois après infestation avec 20 larves saines et 8 larves gorgées ont été examinées en IFD.

Xénodiagnose (no.) (nb de tiques saines utilisées)	I (60 larves saines)	II (20 nymphes saines)	III (85 larves saines)	IV (20 larves saines)
Nb de larves gorgées infectées / nb de larves gorgées examinées	0/6	—	0/16	0/8
Nbre de nymphes à jeun infectées / nb de nymphes à jeun examinées	0/8	—	0/8	—
nb de nymphes gorgées infectées / nb de nymphes gorgées examinées	—	0/8	—	—

Tableau 2: Résultat des xénodiagnoses effectuées sur la souris no. 12 infestée par des larves F₁ infectées.

L'examen des tiques des xénodiagnoses n'a donc pas permis l'observation de spirochètes aussi bien chez les tiques gorgées (n=38), que chez les tiques à jeun (n=16).

III.3. Infection des nymphes F₁ à jeun

Après la mue larvaire, 18 nymphes F₁ à jeun ont été examinées en IFD et 12 ont présenté des spirochètes, soit un pourcentage de 66.6%.

Aucune différence significative n'est observée entre l'infection des larves (47.2%) et celle des nymphes (66.6%) (P=0.16574; test exact de Fischer pour un seuil de significativité de P<0.05).

Par ailleurs 10 nymphes à jeun ont été incluses dans la paraffine. Les coupes ont été examinées au microscope après coloration à l'argent afin de visualiser l'infection au niveau des différents organes (Tableau 3). Ainsi, 2/10 nymphes (20%) ont présenté des spirochètes au niveau de l'intestin. Le pourcentage d'infection (20%) est plus faible que pour les nymphes examinées en IFD (66.6%) et il pourrait s'expliquer par la difficulté de réaliser des coupes de nymphes à la paraffine; d'où une grande perte de matériel et par conséquent l'obtention de coupes partielles.

Nymphe (no.)	Intestin	Glandes salivaires	Muscle
1	négatif	négatif	négatif
2	négatif	négatif	négatif
3	négatif	négatif	négatif
4	négatif	négatif	négatif
5	négatif	négatif	négatif
6	négatif	négatif	négatif
7	positif	négatif	négatif
8	négatif	négatif	négatif
9	négatif	négatif	négatif
10	positif	négatif	négatif

Tableau 3: Infection des nymphes F₁ à jeun après coloration à l'argent.

Les tentatives d'isolement du spirochète par mise en culture des nymphes dans du milieu BSK-II avec antibiotiques ont été faites avec un total de 29 nymphes à jeun. Ainsi 20 tubes ont été mis individuellement en culture, de même que 6 autres à raison de 2 nymphes par tube, et 3 nymphes dans un tube. Le contrôle périodique des 24 tubes de culture n'a pas révélé de spirochète au microscope à fond noir.

III.4. Repas sanguin des nymphes F₁ et transmission de *B. burgdorferi* aux souris

Un total de 80 nymphes F₁ ont servi à infester 4 souris (nos. 28, 29, 30 et 31) à une densité de 20 nymphes par souris dans une capsule. Un total de 56 nymphes gorgées ont pu être récoltées et conservées jusqu'à la mue.

III.4.1. Biopsies d'oreilles

Les biopsies d'oreilles ont été faites aux jours J₂₁ (I) et J₄₁ (II) et 6 mois (III) après infestation des souris nos. 28, 29 et 30 par les nymphes infectées. Pour la souris no. 31, les biopsies ont été faites 8 semaines (I) et 4 mois (II) après infestation par les nymphes infectées. Aucune des biopsies effectuées sur ces 4 souris n'a permis d'isoler *B. burgdorferi* (Tableau 4).

III.4.2. Xénodiagnose

Au total 5 xénodiagnoses ont été pratiquées sur les souris nos. 28, 29 et 30 aux jours J₂₁ (I) J₄₁ (II), puis 4 mois (III), 6 mois (IV) et 10 mois (V) après infestation. Pour la souris no.31, les xénodiagnoses ont été effectuées 8 semaines (I), 19 semaines (II) et 21 semaines (III) et 9 mois (IV) après infestation (Tableau 4).

Souris (no.)	Biopsies			Xénodiagnoses				
	I	II	III	I	II	III	IV	V
28	négative	négative	négative	0/8*	0/10**	0/11* 0/8**	0/8*	0/12*
29	négative	négative	négative	0/8*	0/16**	0/11* 0/8**	0/8*	0/12*
30	négative	négative	négative	0/8*	0/6**	0/10* 0/3**	0/8*	0/12*
31	négative	négative	—	0/8* 0/12**	0/8**	0/11* 0/8**	0/12*	—

* larves gorgées

** nymphes à jeun

— pas de biopsie ni xénodiagnose

Tableau 4: Résultat de l'infection des tiques de xénodiagnose et de la mise en culture de biopsies d'oreilles effectuées sur des souris infestées par des nymphes F₁ infectées.

Les tiques de xénodiagnose ont été examinées soit comme larves gorgées, soit comme nymphes à jeun. L'examen de 147 larves gorgées et de 79 nymphes à jeun n'a pas permis de mettre en évidence *B. burgdorferi* chez ces tiques de xénodiagnose.

III.5. Infection des adultes mâles et femelles F₁ à jeun

Vu le faible nombre de tiques adultes obtenues, les femelles F₁ n'ont pas été examinées à jeun mais seulement après gorgement; quant aux tiques mâles, 16 ont été examinées après inclusion à la paraffine et coloration des coupes à l'argent (méthode de Dieterle).

Après la mue nymphale, un total de 36 tiques adultes ont été obtenues dont 21 mâles et 15 femelles. Les 15 femelles ont été mises à gorger sur un lapin et 14 femelles plus ou moins gorgées ont été récoltées dont 6 ont donné une ponte (Tableau 6).

Chaque tique gorgée a été pesée après détachement du lapin (Tableau 5) et l'examen du poids des femelles gorgées a donné une moyenne de poids de 78.92 mg (écart-type 60.82).

Tique (no.)	Poids en mg	Tique (no.)	Poids en mg
1	83.68	8	24.80
2	91.55	9	27.07
3	72.59	10*	75.23
4	43.26	11	175.22
5	42.43	12*	244.17
6	95.50	13	32.37
7	13.34	14	24.91

* femelles avec une ponte positive
 — pas de ponte obtenue

Tableau 5: Poids des femelles F₁ gorgées et infection des pontes obtenues.

III.6. Localisation histologique de *B. burgdorferi* chez les femelles F₁ après repas sanguin et chez les mâles à jeun par la méthode de Dieterle

Toutes les femelles gorgées après oviposition, ainsi que 16 tiques mâles ont été incluses dans la paraffine puis examinées au microscope après coloration à l'argent. Un total de 8/30 tiques examinées se sont révélées infectées, soit 26.66%:

- 6/14 femelles (42.85%) avaient une infection dont 2/6 (soit 33%) avec des spirochètes localisés uniquement à l'intestin, et 4/6 (soit 66%) avec une infection généralisée à différents organes (intestin, ovaire, glandes salivaires, muscles);

- 2/16 mâles (12.5%) présentaient des spirochètes au niveau de l'intestin.

Sur un total de 8 tiques adultes infectées, 4 (50%) présentaient une infection systémique et toutes étaient des femelles (Tableau 6).

Mâle (no.)	Intestin (1)	Gldes saliv. (1)	Muscle (1)	Femelle (no.)	Intestin (1)	Gldes saliv. (1)	Muscle (1)	Ovaire (1)	Nb d'oeufs infectés / nb d'oeufs examinés (2)
1	négatif	négatif	négatif	1	négatif	négatif	négatif	négatif	0/26
2	négatif	négatif	négatif	2	positif	négatif	négatif	négatif	0/39
3	positif	négatif	négatif	3	positif	positif	positif	positif	0/26
4	négatif	négatif	négatif	4	négatif	négatif	négatif	négatif	—
5	négatif	négatif	négatif	5	négatif	négatif	négatif	négatif	—
6	négatif	négatif	négatif	6	positif	positif	positif	positif	—
7	négatif	négatif	négatif	7	positif	négatif	négatif	négatif	—
8	négatif	négatif	négatif	8	négatif	négatif	négatif	négatif	—
9	positif	négatif	négatif	9	négatif	négatif	négatif	négatif	—
10	négatif	négatif	négatif	10	positif	positif	positif	positif	59/65
11	négatif	négatif	négatif	11	négatif	négatif	négatif	négatif	0/65
12	négatif	négatif	négatif	12	positif	positif	positif	positif	25/65
13	négatif	négatif	négatif	13	négatif	négatif	négatif	négatif	—
14	négatif	négatif	négatif	14	négatif	négatif	négatif	négatif	—
15	négatif	négatif	négatif						
16	négatif	négatif	négatif						

(1) organes examinés après coloration à l'argent

(2) oeufs examinés par IFD

— absence de ponte

Tableau 6: Infection des organes des adultes mâles et femelles F₁ et infection des pontes issues des femelles F₁.

IV. TRANSMISSION TRANSOVARIENNE DE *B. BURGENDORFERI* À LA DEUXIÈME GÉNÉRATION D'*I. RICINUS*

IV.1. Infection des oeufs

Des 6 pontes obtenues (femelles nos. 1 , 2, 3, 10, 11 et 12), seulement 2 (femelles nos. 10 et 12) présentaient des oeufs infectés respectivement à 90.7% soit 59/65 oeufs et à 38.46% soit 25/65 oeufs (Tableau 6). Les poids de ces 2 femelles sont respectivement de 75.23 mg pour la femelle no. 10 et de 244.17 mg pour la femelle no. 12. Nous avons observé une faible fluorescence des spirochètes dans le cas des oeufs de la ponte positive no. 12. Nous n'avons pas observé d'éclosion de larves pour l'une et l'autre de ces pontes et nos analyses n'ont par conséquent pas pu aller plus loin.

3.3. RÉCOLTE DE MAI 1994

I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES

La troisième récolte, comme la 1ère, a eu lieu dans la forêt du Staatswald dans le canton de Berne au mois de Mai 1994 et au total 74 femelles ont été récoltées.

Un lapin a servi d'hôte à 60 des femelles récoltées et après repas sanguin 54 femelles gorgées ont été obtenues dont 51 ont donné une ponte.

Chaque tique gorgée a été pesée après détachement du lapin (Tableau 1) et l'examen du poids des femelles gorgées a donné une moyenne de poids de 297.66 mg (écart-type 95.05).

Comme pour la récolte précédente les tiques gorgées n'ont pas été disséquées systématiquement après oviposition et seule la femelle no. 18 ayant donné la ponte positive l'a été; les pontes ont, en effet, été examinées avant la dissection de la femelle. Le poids de la femelle ayant présenté des oeufs infectés dans sa ponte est de 449.42 mg.

L'examen après dissection des organes de cette femelle a montré des spirochètes dans l'ovaire et dans l'intestin en IFD.

Tique (no.)	Poids en mg	Nb d'oeufs infectés/nb d'oeufs examinés	Tique (no.)	Poids en mg	Nb d'oeufs infectés/nb d'oeufs examinés	Tique (no.)	Poids en mg	Nb d'oeufs infectés/nb d'oeufs examinés
1	328.21	0/65	19	330.28	0/65	37	395.17	0/65
2	307.05	0/65	20	381.71	0/65	38	384.85	0/65
3	299.78	0/65	21	324.60	0/65	39	361.04	0/65
4	404.46	0/65	22	319.39	0/65	40	412.08	0/65
5	360.50	0/65	23	253.21	0/65	41	348.38	0/65
6	252.06	0/65	24	361.35	0/65	42	412.08	0/65
7	209.33	0/65	25	354.44	0/65	43	289.67	—
8	218.86	0/65	26	301.55	0/65	44	256.15	0/65
9	275.81	0/65	27	298.17	0/65	45	128.58	0/65
10	331.06	0/65	28	343.70	0/65	46	113.42	0/65
11	325.45	0/65	29	330.98	0/65	47	340.07	0/65
12	324.88	0/65	30	378.71	0/65	48	279.59	0/65
13	279.46	0/65	31	307.95	0/65	49	187.84	0/65
14	222.36	0/65	32	305.21	0/65	50	432.62	0/65
15	273.85	0/65	33	214.61	0/65	51	327.50	0/65
16	264.27	0/65	34	311.72	0/65	52	155.23	0/65
17	322.47	0/65	35	474.67	0/65	53	70.60	—
18*	449.42	74/115	36	294.07	0/65	54	43.64	—

* femelle avec ponte positive

— absence de ponte

Tableau 1: Poids des femelles sauvages gorgées et infection des oeufs obtenus.

II. TRANSMISSION TRANSOVARIENNE DE *B. BURGDORFERI* AUX OEUFS ET AUX LARVES F₁

II.1. Infection des oeufs

De chacune des pontes, 65 oeufs ont été examinés en IFD et une seule ponte a donné des oeufs infectés: soit une fréquence de transmission transovarienne de 1.96%. Un total de 3365 oeufs ont été examinés pour l'ensemble des pontes, 115 oeufs ayant été testés pour la ponte infectée de la femelle no. 18. Un nombre de 74/115 oeufs ont présenté des spirochètes soit un pourcentage de 64.34% (Tableau 1).

II.2. Infection des larves F₁ à jeun

La descendance larvaire de la femelle no. 18 ayant donné la seule ponte positive a été testée en IFD; et 111/135 larves ont montré des spirochètes, soit un taux d'infection de 82.2%.

Sans trop pouvoir l'expliquer, nous constatons que l'infection des larves (82.2%) est plus élevée que celle des oeufs (64.34%) et la différence est significative ($P=0.00148$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

Pour tenter d'isoler le spirochète, un total de 13 larves F₁ à jeun ont été individuellement mises en culture dans des tubes contenant du milieu BSK-II avec antibiotiques; l'examen périodique au microscope à fond noir des 13 tubes n'a pas permis de voir de spirochète.

III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE *B. BURGDORFERI* DES LARVES F₁ AUX ADULTES

III.1. Repas sanguin des larves F₁

Un total de 11 souris blanches ont servi d'hôtes à ces larves F₁ et différentes densités d'infestation ont été utilisées (Tableau 2). Les larves gorgées récoltées ont été conservées jusqu'à la mue pour l'examen des nymphes à jeun.

Souris (no.)	Densité larvaire	Larves gorgées
36	120	64
37	120	77
38	220	122
39	120	69
40	220	126
41	220	114
42	320	231
44	620	328
45	420	227
46	182	81
47	282	155
Total	2844	1594

Tableau 2: Infestation des souris par des larves F₁ infectées.

III.2. Transmission de *B. burgdorferi* par les larves F₁ aux souris

Les souris ayant servi d'hôtes pour le repas sanguin des larves F₁ infectées (Tableau 2) ont été testées par différentes méthodes dans le but de mettre en évidence une transmission du spirochète par les larves à la souris.

Des biopsies d'oreilles ont été faites sur ces souris 4 mois (I) et 17 mois (II) après infestation par les larves F₁ infectées et les biopsies d'oreilles mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques. Le contrôle périodique au microscope à fond noir des tubes contenant les biopsies n'a pas permis l'observation de spirochètes (Tableau 3).

Par ailleurs, un test de xénodiagnose avec 30 larves saines par souris a été pratiqué sur ces souris 4 mois après leur infestation par des larves F₁ infectées et les tiques gorgées récoltées ont été examinées comme larves gorgées (n=88) en IFD et comme nymphes à jeun après mue (n=84). L'examen en IFD des larves gorgées et des nymphes à jeun n'a pas montré de spirochètes fluorescents.

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats du test de xénodiagnose et de l'examen des biopsies d'oreilles pratiquées sur les souris qui ont servi à nourrir les larves F₁ infectées.

Souris (no.)	Xénodiagnose		Biopsie I	Biopsie II
36	0/8 *	0/8**	négative	négative
37	0/8 *	0/12**	négative	négative
38	0/8 *	0/2**	négative	—
39	0/8 *	0/5**	négative	négative
40	0/8 *	0/12**	négative	—
41	0/8 *	0/6**	négative	—
42	0/8 *	0/13**	négative	négative
44	0/8 *	0/2**	négative	négative
45	0/8 *	0/5**	négative	—
46	0/8 *	0/9**	négative	—
47	0/8 *	0/10**	négative	négative
Total	0/88	0/84		

* larves gorgées

** nymphes à jeun

— pas de biopsie

Tableau 3: Résultat de l'infection des tiques de xénodiagnose et de la mise en culture des biopsies d'oreilles effectuées sur les souris infestées par les larves F₁ infectées.

III.3. Infection des nymphes F₁ à jeun

Après la mue larvaire un total de 132 nymphes à jeun ont été examinées en IFD et 112 ont présenté des spirochètes, soit un pourcentage d'infection de 84%; les taux variant de 66% à 100% d'une souris à l'autre (Tableau 4).

Par rapport à l'infection des larves (82.2%), aucune différence significative n'est observée ($P=0.62221$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

Un certain nombre de nymphes à jeun ont été examinées 11 mois après la mue et étaient encore infectées à un pourcentage de 58%, 47/81 nymphes présentant des spirochètes (Tableau 4). On observe une différence significative par rapport à l'infection des nymphes à jeun examinées 4 semaines après la mue (84%) ($P=0.00002$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

Dans le tableau ci-dessous figurent les pourcentages d'infection des nymphes F₁ examinées en IFD 4 mois puis 11 mois après la mue.

Souris (no.)	Nb de nymphes infectées / nb de nymphes examinées	Nb de nymphes infectées / nb de nymphes examinées*
36	11/12 (91%)	1/1
37	9/12 (75%)	6/11 (54.54%)
38	8/12 (66%)	4/10 (40%)
39	10/12 (83%)	9/10 (90%)
40	12/12 (100%)	5/5 (100%)
41	11/12 (91%)	5/10 (50%)
42	9/12 (75%)	—
44	11/12 (91%)	3/4 (75%)
45	9/12 (75%)	5/10 (50%)
46	12/12 (100%)	4/10 (40%)
47	10/12 (83%)	5/10 (50%)
Total	112/132 (84%)	47/81 (58%)

* nymphes à jeun examinées 11 mois après la mue
— pas de nymphes examinées

Tableau 4: Infection des nymphes F₁ à jeun 4 mois et 11 mois après la mue

III.3.1. Isolement du spirochète *B. burgdorferi* à partir des nymphes F₁ à jeun

Un total de 46 nymphes F₁ à jeun ont été utilisées pour tenter d'isoler le spirochète *B. burgdorferi* en culture. Ainsi 6 nymphes à jeun ont été mises en culture à raison de 3 nymphes par tube contenant du milieu BSK-II avec antibiotiques et un broyat de 40 nymphes a été inoculé dans 8 tubes de milieu de culture à raison de 0.25 ml de broyat par tube.

L'examen périodique des 10 tubes contenant les nymphes en culture est resté négatif au microscope à fond noir.

III.4. Repas sanguin des nymphes F₁

Ces nymphes ont servi à infester 8 souris à différentes densités: 4 souris avec 50 nymphes chacune et les 4 autres avec 25 nymphes chacune. Les tiques gorgées récoltées ont été conservées jusqu'à la mue (Tableau 5).

Souris (no.)	Densité nymphale	Nymphes gorgées
48	50	32
49	50	37
50	50	41
51	50	44
52	25	24
53	25	20
54	25	21
55	25	21
Total	300	240

Tableau 5 : Infestation des souris par les nymphes F₁ infectées par *B. burgdorferi*.

III.5. Transmission de *B. burgdorferi* par les nymphes F₁ aux souris

Deux biopsies ont été pratiquées sur ces souris 6 semaines (I) puis 12 mois (54 semaines) (II) après leur infestation par les nymphes F₁ infectées et mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques. Ces biopsies ont été contrôlées périodiquement au microscope à fond noir et n'ont pas permis d'isoler le spirochète (Tableau 6).

Par ailleurs, un test de xénodiagnose a été effectué sur les souris 6 semaines après leur infestation par les nymphes F1 infectées et 25 larves saines ont été utilisées pour infester les souris. Les larves gorgées récoltées (n=56) puis les nymphes à jeun après mue (n=58) ont été examinées en IFD et toutes ces tiques n'ont pas montré de spirochètes fluorescents (Tableau 6).

Souris (no.)	Xénodiagnose		Biopsie I	Biopsie II
48	0/8 *	0/10**	négative	négative
49	0/8 *	0/8**	négative	négative
50	0/8 *	0/11**	négative	négative
51	0/8 *	0/8**	négative	négative
52	↑	↑	—	—
53	0/8 *	0/8**	négative	négative
54	0/8 *	0/7**	négative	—
55	0/8 *	0/6**	négative	négative
Total	0/56	0/58		

* larves gorgées
 ** nymphes à jeun
 — pas de biopsie
 † souris morte

Tableau 6: Résultat de l'infection des tiques de xénodiagnose et de la mise en culture de biopsies d'oreilles effectuées sur les souris infestées par les nymphes F₁ infectées.

III.6. Infection des adultes mâles et femelles F₁ à jeun

III.6.1. Examen en immunofluorescence directe

Un total de 29 tiques adultes à jeun ont été examinées en IFD:

- 15 femelles dont 10 écrasées in toto et 5 qui ont été disséquées puis l'intestin prélevé et observé au microscope à fluorescence;
- 14 tiques mâles dont 9 écrasées in toto et 5 pour lesquelles l'intestin seul a été prélevé puis examiné au microscope.

L'examen de ces adultes mâles et femelles n'a pas permis de voir de spirochètes aussi bien chez les tiques écrasées in toto qu'au niveau de l'intestin seul.

III.6.2. Localisation histologique de *B. burgdorferi* par la méthode de Dieterle

L'examen de 50 autres tiques adultes à jeun, 20 femelles et 30 mâles, s'est fait après inclusion à la paraffine et coloration des coupes à l'argent par la méthode de Dieterle.

L'observation au microscope a montré 5/50 tiques infectées (10%):

- 4/20 femelles (20%) étaient positives dont 3/4 (75%) avec une infection systémique et 1/4 (25%) avec des spirochètes présents uniquement au niveau de l'intestin (Tableau 7);
- 1/30 mâle (3.3%) présentait une infection limitée à l'intestin (Tableau 8).

Au total 3/5 tiques infectées (60%) avaient une infection généralisée à différents organes (intestin, ovaire, glandes salivaires, muscles).

Femelle (no.)	Intestin	Gl. saliv.	Muscles	Ovaire	Femelle (no.)	Intestin	Gl. saliv.	Muscles	Ovaire
1	négatif	négatif	négatif	négatif	11	négatif	négatif	négatif	négatif
2	négatif	négatif	négatif	négatif	12	positif	positif	positif	positif
3	positif	positif	positif	positif	13	négatif	négatif	négatif	négatif
4	négatif	négatif	négatif	négatif	14	négatif	négatif	négatif	négatif
5	négatif	négatif	négatif	négatif	15	négatif	négatif	négatif	négatif
6	négatif	négatif	négatif	négatif	16	positif	négatif	négatif	négatif
7	positif	positif	positif	positif	17	négatif	négatif	négatif	négatif
8	négatif	négatif	négatif	négatif	18	négatif	négatif	négatif	négatif
9	négatif	négatif	négatif	négatif	19	négatif	négatif	négatif	négatif
10	négatif	négatif	négatif	négatif	20	négatif	négatif	négatif	négatif

Tableau 7: Infection des organes des tiques femelles F₁ après coloration à l'argent

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats de l'observation après coloration à l'argent des coupes de tiques mâles incluses à la paraffine.

Mâle (no.)	Intestin	Gl. saliv.	Muscles	Mâle (no.)	Intestin	Gl. saliv.	Muscles
1	négatif	négatif	négatif	16	négatif	négatif	négatif
2	négatif	négatif	négatif	17	négatif	négatif	négatif
3	négatif	négatif	négatif	18	négatif	négatif	négatif
4	négatif	négatif	négatif	19	négatif	négatif	négatif
5	négatif	négatif	négatif	20	négatif	négatif	négatif
6	négatif	négatif	négatif	21	négatif	négatif	négatif
7	négatif	négatif	négatif	22	négatif	négatif	négatif
8	négatif	négatif	négatif	23	négatif	négatif	négatif
9	négatif	négatif	négatif	24	négatif	négatif	négatif
10	négatif	négatif	négatif	25	négatif	négatif	négatif
11	négatif	négatif	négatif	26	négatif	négatif	négatif
12	négatif	négatif	négatif	27	négatif	négatif	négatif
13	négatif	négatif	négatif	28	négatif	négatif	négatif
14	négatif	négatif	négatif	29	négatif	négatif	négatif
15	positif	négatif	négatif	30	négatif	négatif	négatif

Tableau 8: Infection des organes des tiques mâles F₁ après coloration à l'argent.

III.6.3. Isolement du spirochète *B. burgdorferi* à partir des adultes F₁ mâles et femelles à jeun

Un total de 5 tiques adultes F₁ dont 3 mâles et 2 femelles ont été utilisées pour tenter d'isoler le spirochète. L'intestin de chacune d'elles a été mis en culture après dissection et l'examen des 5 tubes de culture contenant ces intestins n'a pas permis de visualiser *B. burgdorferi* à l'examen au microscope à fond noir. Il faut préciser que nous ne savions pas si ces tiques étaient infectées ou non.

III.6.4. Repas sanguin des femelles F₁

Nous avons utilisé 70 femelles pour infester un lapin et 70 femelles gorgées récoltées ont toutes donné une ponte.

Toutes ces femelles gorgées ont été disséquées après oviposition et l'examen des organes (ovaire et intestin) n'a pas montré de spirochète en IFD (Tableau 9).

Dans le tableau ci-dessous, nous avons regroupé les résultats de l'observation en IFD des organes des femelles F₁ gorgées disséquées après oviposition et de l'examen des oeufs pondus par ces femelles.

Tique (no.)	Infection des organes		Nbre d'oeufs infectés / nbre d'oeufs examinés	Tique (no.)	Infection des organes		Nbre d'oeufs infectés / nbre d'oeufs examinés
	intestin	ovaire			intestin	ovaire	
1	négatif	négatif	0/65	36	négatif	négatif	0/65
2	négatif	négatif	0/65	37	négatif	négatif	0/65
3	négatif	négatif	0/65	38	négatif	négatif	0/65
4	négatif	négatif	0/65	39	négatif	négatif	0/65
5	négatif	négatif	0/65	40	négatif	négatif	0/65
6	négatif	négatif	0/65	41	négatif	négatif	0/65
7	négatif	négatif	0/65	42	négatif	négatif	0/65
8	négatif	négatif	0/65	43	négatif	négatif	0/65
9	négatif	négatif	0/65	44	négatif	négatif	0/65
10	négatif	négatif	0/65	45	négatif	négatif	0/65
11	négatif	négatif	0/65	46	négatif	négatif	0/65
12	négatif	négatif	0/65	47	négatif	négatif	0/65
13	négatif	négatif	0/65	48	négatif	négatif	0/65
14	négatif	négatif	0/65	49	négatif	négatif	0/65
15	négatif	négatif	0/65	50	négatif	négatif	0/65
16	négatif	négatif	0/65	51	négatif	négatif	0/65
17	négatif	négatif	0/65	52	négatif	négatif	0/65
18	négatif	négatif	0/65	53	négatif	négatif	0/65
19	négatif	négatif	0/65	54	négatif	négatif	0/65
20	négatif	négatif	0/65	55	négatif	négatif	0/65
21	négatif	négatif	0/65	56	négatif	négatif	0/65
22	négatif	négatif	0/65	57	négatif	négatif	0/65
23	négatif	négatif	0/65	58	négatif	négatif	0/65
24	négatif	négatif	0/65	59	négatif	négatif	0/65
25	négatif	négatif	0/65	60	négatif	négatif	0/65
26	négatif	négatif	0/65	61	négatif	négatif	0/65
27	négatif	négatif	0/65	62	négatif	négatif	0/65
28	négatif	négatif	0/65	63	négatif	négatif	0/65
29	négatif	négatif	0/65	64	négatif	négatif	0/65
30	négatif	négatif	0/65	65	négatif	négatif	0/65
31	négatif	négatif	0/65	66	négatif	négatif	0/65
32	négatif	négatif	0/65	67	négatif	négatif	0/65
33	négatif	négatif	0/65	68	négatif	négatif	0/65
34	négatif	négatif	0/65	69	négatif	négatif	0/65
35	négatif	négatif	0/65	70	négatif	négatif	0/65

Tableau 2: Infection des oeufs et des organes (ovaire et intestin) des femelles F₁ gorgées.

IV. TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DE *B. BURGENDORFERI* À LA DEUXIÈME GÉNÉRATION D'*I. RICINUS*

IV.1. Infection des oeufs

Pour chacune des 70 pontes, 65 oeufs ont été examinés en IFD, soit au total 4550 oeufs, et aucune des pontes n'a montré de spirochètes (Tableau 9).

IV.2. Infection des larves F₂ à jeun

Compte tenu de la négativité de l'examen en IFD des organes des femelles (ovaire et intestin) ainsi que des oeufs obtenus, nous n'avons pas testé les larves issues de ces pontes.

3.4. RÉCOLTE DE JUIN 1995

I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES

Notre quatrième récolte a également eu lieu à Neuchâtel au Bois de l'Hôpital au mois de Juin 1995 et au total 428 femelles ont été obtenues.

Un nombre plus élevé de tiques a été récolté étant donné les faibles taux de transmission transovarienne obtenus pour les 3 récoltes précédentes. En effet nous n'avons pu avoir à chaque fois qu'une seule femelle sauvage donnant une ponte infectée et l'infection de la descendance larvaire n'a pu être recherchée que pour les récoltes de Juin 1993 et de mai 1994.

En augmentant le nombre de femelles sauvages nous escomptions obtenir plus de femelles donnant une ponte infectée, soit 6 femelles pour une récolte de 300 femelles sauvages (proportion de 0.02) (pour un intervalle de confiance à 95% de 0.01 à 0.04; loi binomiale).

Nous avons utilisé 5 lapins pour le repas sanguin des femelles sauvages et 375 femelles ont servi à l'infestation des lapins à raison de 75 femelles par lapin.

Un total de 352 femelles gorgées ont été récoltées dont 288 ont donné une ponte. Mais contrairement aux récoltes précédentes de Juin 91, de Juin 93 et de Mai 94, nous n'avons pas déterminé le poids de ces femelles gorgées.

Après oviposition 288 tiques ont été disséquées et les organes (ovaire et intestin) prélevés puis testés en IFD : un total de 60 tiques (20.83%) se sont révélées infectées par *B. burgdorferi* dont 42 (70%) avec une infection limitée à l'intestin et 18 (30%) avec une infection de l'ovaire et de l'intestin. Dans le tableau 1 ne figure que la localisation des spirochètes observés chez les 60 tiques infectées.

Tique (no.)	INFECTION		
	Intestin	Ovaire	Larves**
1	positif	négatif	0/50
2	positif	négatif	0/50
3	positif	négatif	0/50
4	positif	négatif	0/50
5	positif	négatif	0/50
6	positif	négatif	0/50
7	positif	négatif	0/50
8	positif	négatif	0/50
9	positif	négatif	0/50
10	positif	négatif	0/50
11	positif	négatif	0/50
12	positif	négatif	0/50
13	positif	négatif	0/50
14	positif	négatif	0/50
15	positif	négatif	0/50
16	positif	négatif	0/50
17	positif	négatif	0/50
18	positif	négatif	0/50
19	positif	négatif	0/50
20	positif	négatif	0/50
21	positif	négatif	0/50
22	positif	négatif	0/50
23	positif	négatif	0/50
24	positif	négatif	0/50
25	positif	négatif	0/50
26	positif	négatif	0/50
27	positif	négatif	0/50
28	positif	négatif	0/50
29	positif	négatif	0/50
30	positif	négatif	0/50

Tique (no.)	INFECTION		
	Intestin	Ovaire	Larves**
31	positif	négatif	0/50
32	positif	négatif	0/50
33	positif	négatif	0/50
34	positif	négatif	0/50
35	positif	négatif	0/50
36	positif	négatif	0/50
37	positif	négatif	0/50
38	positif	négatif	0/50
39	positif	négatif	0/50
40	positif	négatif	0/50
41	positif	négatif	0/50
42	positif	négatif	0/50
43*	positif	positif	100/106
44	positif	positif	0/50
45	positif	positif	0/50
46	positif	positif	0/50
47	positif	positif	0/50
48	positif	positif	0/50
49	positif	positif	0/50
50	positif	positif	0/50
51	positif	positif	—
52	positif	positif	0/50
53	positif	positif	0/50
54	positif	positif	0/50
55	positif	positif	0/50
56	positif	positif	0/50
57	positif	positif	0/50
58	positif	positif	0/50
59	positif	positif	0/50
60	positif	positif	0/50

* femelle avec une descendance larvaire infectée

** nombre de larves à jeun infectées / nombre de larves examinées

— pas d'éclosion de larves

Tableau 1: Infection des organes (ovaire et intestin) des femelles sauvages après oviposition et infection de leur descendance larvaire F₁.

II. TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DE *B. BURGENDORFERI* AUX LARVES F₁

En raison de la rapidité avec laquelle les oeufs ont éclos, nous n'avons pas pu examiner les 288 pontes au niveau des oeufs mais seulement au stade larvaire et par conséquent l'infection de ces pontes n'est évaluée qu'à partir de celle des larves.

L'examen en immunofluorescence de la descendance larvaire de 17 des 18 femelles avec infection généralisée a montré une seule descendance larvaire infectée (femelle no. 43), avec un total de 100/106 larves qui étaient infectées, soit un taux d'infection de 94%.

Pour chacune de ces 17 pontes ainsi que pour celles issues des 42 femelles avec une infection limitée à l'intestin, 50 larves ont été testées soit au total 2950 larves (Tableau 1).

Par ailleurs, 18 autres pontes de femelles n'ayant présenté de spirochètes ni au niveau de l'intestin ni au niveau de l'ovaire, ont été également examinées à raison de 30 larves par ponte, soit au total 540 larves testées. Aucune ponte positive supplémentaire n'a été trouvée.

Au total 19 larves F₁ à jeun issues de la ponte positive de la femelle no. 43 ont été mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques. Ainsi 5 larves ont été mises en culture individuellement, 4 larves dans un tube et 10 larves à raison de 5 larves par tube.

L'examen périodique au microscope à fond noir de ces 8 tubes n'a pas montré de spirochète.

III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE LA LARVE F₁ À L'ADULTE F₁

III.1. Repas sanguin des larves F₁

Un total de 5 souris ont été infestées par ces larves F₁ à différentes densités : 3 souris ont été infestées par 150 larves chacune et 2 souris par 200 larves chacune soit au total 900 larves. Les larves gorgées récoltées ont été conservées jusqu'à la mue (Tableau 2).

Souris (no.)	Densité larvaire	Larves gorgées
76	150	106
77	150	90
78	200	126
79	200	154
80	150	157
Total	900	633

Tableau 2: Infestation des souris par les larves F₁ infectées par *B. burgdorferi*.

III.2. Transmission de *B. burgdorferi* par les larves F₁ aux souris

Des biopsies d'oreilles ont été faites 4 semaines (I) puis 6 semaines (II) après infestation des souris par les larves F₁ infectées, et mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques.

L'examen périodique au microscope à fond noir des différents tubes de culture contenant les biopsies d'oreilles n'a pas révélé de spirochète.

En outre une xénodiagnose a été pratiquée sur les souris ayant servi au repas des larves F₁ infectées, 15 jours après infestation; 40 larves saines par souris ont été utilisées pour le test de xénodiagnose et les tiques récoltées ont été examinées en IFD, soit comme larves gorgées soit comme nymphes après mue. Aucun spirochète fluorescent n'a pu être observé chez ces tiques (Tableau 3).

Souris (no.)	Xénodiagnose		Biopsie I	Biopsie II
	nbre de larves gorgées infectées / nbre de larves gorgées examinées	nbre de nymphes gorgées infectées / nbre de nymphes examinées		
76	0/16	0/2	négative	négative
77	0/16	0/8	négative	négative
78	0/16	0/6	négative	négative
79	0/16	0/4	négative	négative
80	0/16	0/7	négative	négative
Total	0/80	0/27		

Tableau 3: Résultat de xénodiagnose et de la mise en culture des biopsies effectuées sur les souris infestées par des larves F₁ infectées.

Nous avons également tenté de détecter puis de caractériser le spirochète à partir des cultures des larves F₁ à jeun, mais aucune amplification n'a pu être décelée par la technique de PCR.

III.3. Infection des nymphes F₁ à jeun

Après la mue larvaire, un total de 60 nymphes F₁ à jeun ont été testées en IFD et 56 nymphes ont présenté des spirochètes, soit un taux d'infection de 93.33%, les pourcentages variant de 83.33% à 100% d'une souris à l'autre (Tableau 4).

Souris (no.)	Nombre de nymphes infectées / nombre de nymphes examinées (%)
76	12/12 (100%)
77	11/12 (91.66%)
78	10/12 (83.33%)
79	11/12 (91.66%)
80	12/12 (100%)
Total	56/60 (93.33%)

Tableau 4: Taux d'infection des nymphes F₁ à jeun examinées en IFD

Par rapport au pourcentage d'infection observée chez les larves (94%), il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne le pourcentage d'infection des nymphes ($P=1.00000$; pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

Nous avons tenté d'isoler le spirochète à partir de ces nymphes F₁ et un total de 10 nymphes à jeun ont été mises individuellement en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques. L'examen au microscope à fond noir des 10 tubes contenant les nymphes en culture n'a pas montré de spirochètes.

En outre un test de PCR pratiqué sur ces cultures des nymphes F₁ à jeun n'a pas permis de détecter la présence de spirochète.

III.4. Repas sanguin des nymphes F_1 et transmission de *B. burgdorferi* aux souris

Les nymphes F_1 ont été utilisées pour 3 groupes d'expériences:

- le suivi de l'infection par *B. burgdorferi* chez *I. ricinus*,
- le 'cofeeding' avec des larves saines,
- la détection du spirochète dans le sang des souris.

III.4.1. Suivi de l'infection par *B. burgdorferi* chez *I. ricinus*

Nous avons infesté 7 souris 'swiss' mâles avec les nymphes F_1 à 2 densités nymphales: d'une part 25 nymphes dans une capsule pour 3 souris (souris nos. 86, 88, 90) et d'autre part 50 nymphes dans 2 capsules à raison de 25 nymphes par capsule pour 4 souris (souris nos. 87, 89, 91, 92).

Par ailleurs 2 souris (nos. 113 et 114) ont subi chacune des infestations successives avec des nymphes F_1 : 40 nymphes au jour J_0 , puis 30 nymphes au jour J_7 ; une infestation supplémentaire a été réalisée au jour J_{16} avec 40 nymphes pour la souris no. 114.

Toutes les nymphes gorgées ont été conservées jusqu'à la mue (Tableau 5).

Souris (no.)	86	87	88	89	90	91	92	113	114	Total
Densité nymphale	25	50	25	50	25	50	50	40 puis 30	40 puis 30 et 40	455
Nombre de nymphes gorgées récoltées	21	0*	18	0*	18	0*	43	61	86	247

* souris morte

Tableau 5: Infestation des souris par des nymphes F_1 infectées par *B. burgdorferi*.

III.4.1.1. Biopsies d'oreilles

Une série de 4 biopsies d'oreilles ont été faites aux jours J_{28} (I), J_{35} (II), J_{72} (III) et J_{96} (IV) après infestation sur les souris ayant servi au repas sanguin des nymphes F_1 infectées; les biopsies ont été mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques.

Le contrôle au microscope à fond noir des différents tubes contenant les biopsies n'a pas permis d'observer de spirochète (Tableau 6).

III.4.1.2. Xénodiagnose

Un test de xénodiagnose a été pratiqué sur les souris aux jours J₉ (I), J₁₉ (II) et J₉₆ (III) après leur infestation avec des nymphes F₁ infectées, et 25 à 30 larves saines par souris ont été utilisées chaque fois.

Au jour J₉ les larves saines ont été placées dans les capsules, c'est-à-dire au site d'infestation des nymphes F₁ infectées, ceci dans le but de déceler des spirochètes localisés au point d'inoculation; tandis qu'aux jours J₁₉ et J₉₆, elles l'ont été sur la tête pour détecter la dissémination d'une infection éventuelle.

Toutes les larves gorgées de xénodiagnose ont été conservées jusqu'à la mue puis examinées comme nymphes à jeun. Un total de 137 nymphes à jeun ont ainsi été examinées en IFD et aucun spirochète fluorescent n'a pu être observé. (Tableau 6).

Souris (no.)	Biopsies d'oreilles d'oreilles (examinées au microscope à fond noir)				Xénodiagnoses (nb de nymphes à jeun infectées / nb de nymphes à jeun examinées)		
	I	II	III	IV	I	II	III
86	*	*	*	*	0/18	0/11	**
87	*	*	*	*	**	**	**
88	négative	négative	négative	négative	0/18	0/13	0/7
89	*	*	*	*	**	**	**
90	négative	négative	négative	négative	0/18	0/15	0/19
91	*	*	*	*	**	**	**
92	*	*	*	*	0/18	**	**
Total					0/72	0/39	0/26

* pas de biopsie

** pas de xénodiagnose

Tableau 6: Résultat de xénodiagnoses et de la mise en culture des biopsies d'oreilles effectuées sur des souris infestées par les nymphes F₁.

III.4.2. Cofeeding avec les nymphes F₁

Lors de cette expérience, nous avons tenté de voir si une transmission par "cofeeding" (Gem et Rais, 1996), c'est-à-dire, dans ce cas, une transmission de *B. burgdorferi* de nymphes infectées transstadialement suite à une infection transovarienne à des larves saines, pouvait avoir lieu.

Quatre souris ont été utilisées lors de cette expérience: 2 souris 'swiss' mâles (nos. 94 et 95) et 2 souris BALB/C mâles (nos. 96 et 97). Elles ont été infestées chacune dans une capsule par 15 nymphes F₁ infectées au jour J₀, puis au jour J₂ par 25 à 30 larves saines. Ces larves peuvent ainsi se fixer et se nourrir dans la capsule pendant que les nymphes infectées prennent leur repas sanguin. Les nymphes gorgées ont été récoltées du jour J₃ au jour J₇ et conservées jusqu'à la mue; de même les larves gorgées sont conservées jusqu'à la mue et examinées comme nymphes (Tableau 7).

Souris (no.)	Densité nymphale (nymphes F ₁)	Nbre de nymphes F ₁ gorgées récoltées	Nbre de nymphes infectées / nbre de nymphes examinées*
94	15	14	0/18
95	15	11	0/18
96	15	13	0/18
97	15	12	0/12
Total	60	50	0/66

* nymphes issues des larves saines du jour J₂

Tableau 7: Infestation des souris par des nymphes F₁ infectées par *B. burgdorferi* et résultat de l'examen en IFD des nymphes à jeun issues des larves saines du jour J₂ de l'expérience de "cofeeding".

III.4.2.1. Biopsies d'oreilles

Des biopsies d'oreilles ont en outre été effectuées aux jours J₁₄ (I), J₂₁ (II), J₂₈ (III) et J₆₃ (IV) pour essayer d'isoler le spirochète après sa dissémination éventuelle dans les organes de l'hôte.

Les biopsies ont été examinées au microscope à fond noir et le contrôle périodique des tubes de culture contenant les biopsies d'oreilles n'a pas permis la visualisation de spirochète (Tableau 8).

III.4.2.2. Xénodiagnose

Aux jours J₅ (I) et J₉ (II) après leur infestation par les nymphes F₁, toutes les souris ont été infestées par 25 à 30 larves saines chacune dans la capsule afin de détecter une infection localisée au site de fixation des nymphes F₁ infectées.

Ensuite pour essayer de mettre en évidence une dissémination de l'infection chez l'hôte, toutes les souris ont été infestées au niveau de la tête par 20 larves saines chacune aux jours J₁₄ (III), J₂₁ (IV), J₂₈ (V) et J₈₇ (VI).

Les larves gorgées ont été conservées jusqu'à la mue puis examinées au stade de nymphes à jeun en IFD; et l'observation des nymphes à jeun (n=360) n'a pas permis de voir de spirochète fluorescent (Tableau 8).

Souris (no.)	Xénodiagnoses (nombre de nymphes infectées / nombre de nymphes examinées)						Biopsies d'oreilles (examinées au microscope à fond noir)			
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV
94	0/18	0/9	0/14	0/3	0/6	—	négative	négative	négative	négative
95	0/18	0/15	0/18	0/9	0/12	0/18	négative	négative	négative	négative
96	0/18	0/11	0/18	0/11	0/3	0/14	négative	négative	négative	négative
97	0/18	0/17	0/18	0/4	0/18	0/13	négative	négative	négative	négative
Total	0/72	0/42	0/68	0/27	0/39	0/45				

— tiques non examinées

Tableau 8: Résultat des xénodiagnoses et de la mise en culture de biopsie d'oreilles effectuées sur des souris infestées par des nymphes F₁ infectées dans le cadre de l'expérience de "cofeeding".

III.4.3. Détection du spirochète dans le sang des souris

Nous avons par ailleurs utilisé 2 souris 'swiss' mâles (nos. 115 et 116) pour essayer de mettre en évidence des spirochètes dans leur plasma après leur infestation par des nymphes F_1 infectées (Stanek et al., 1985).

Chacune des 2 souris a été infestée par 25 nymphes F_1 dans une capsule et les nymphes gorgées récoltées ont été conservées jusqu'à la mue (Tableau 9).

L'observation du plasma de ces souris au microscope à fond noir n'a pas permis de voir de spirochète aux jours J_7 , J_{15} et J_{22} après infestation par les nymphes F_1 infectées.

Souris (no.)	Densité nymphe utilisée	Nymphes gorgées récoltées	Examen du plasma au microscope à fond noir		
			J_7	J_{15}	J_{22}
115	25	19	négatif	négatif	négatif
116	25	18	négatif	négatif	négatif
Total	50	37			

Tableau 9: Résultat de l'observation au microscope à fond noir du plasma de souris infestées par les nymphes F_1 infectées par *B. burgdorferi*.

III.5. Infection des adultes mâles et femelles F_1 à jeun

Après la mue nymphale, un total de 277 tiques adultes ont été dénombrées, dont 128 femelles et 149 mâles (Tableau 10).

Souris (no.)	Adultes			Souris (no.)	Adultes		
	mâles (M)	femelles (F)	M+F		mâles (M)	femelles (F)	M+F
86	12	9	21	94	8	6	14
88	5	13	18	95	7	4	11
90	7	10	17	96	11	2	13
92	23	19	42	97	5	6	11
113	25	23	48	115	8	9	17
114	31	16	47	116	7	11	18
Total	103	90	193	Total	46	38	84

Tableau 10: Nombre de tiques adultes mâles et femelles obtenues à partir des nymphes F_1 gorgées.

Nous avons prélevé 24 adultes, soit 12 mâles et 12 femelles, et chaque tique a été sectionnée transversalement en 2 parties: l'une a été étalée sur lame puis examinée en IFD et l'autre a été mise en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques.

L'examen en immunofluorescence des étalements a permis de voir des spirochètes chez 3 tiques mâles. Par contre le contrôle des tubes de culture contenant les tiques n'a pas montré de spirochètes au microscope à fond noir (Tableau 11).

Femelle (no.)	Examen en IFD	Culture	Mâle (no.)	Examen en IFD	Culture
1	négatif	négatif	1	négatif	négatif
2	négatif	négatif	2	négatif	négatif
3	négatif	négatif	3	négatif	négatif
4	négatif	négatif	4	négatif	négatif
5	négatif	négatif	5	positif	négatif
6	négatif	négatif	6	négatif	négatif
7	négatif	négatif	7	positif	négatif
8	négatif	négatif	8	positif	négatif
9	négatif	négatif	9	négatif	négatif
10	négatif	négatif	10	négatif	négatif
11	négatif	négatif	11	négatif	négatif
12	négatif	négatif	12	négatif	négatif

Tableau 11: Résultat de l'infection des tiques adultes F_1 mâles et femelles examinées par IFD et mises en culture dans du milieu BSK-II.

III.6. Repas sanguin des femelles F_1

Un lapin a été utilisé pour le repas sanguin de 60 femelles et nous avons récolté 56 femelles gorgées qui ont été conservées jusqu'à la ponte. Un total de 25 pontes ont pu être obtenues.

Au total 32 femelles ont été disséquées, les 25 ayant donné une ponte ainsi que 7 autres qui n'ont pas pondu. L'examen en immunofluorescence de l'ovaire et de l'intestin de ces tiques a donné les résultats suivants:

- 9/25 femelles ayant pondu présentaient à la fois une infection de l'ovaire et de l'intestin;
- 2/7 femelles sans ponte étaient positives dont l'une avec une infection limitée à l'intestin et l'autre avec une infection mixte de l'ovaire et de l'intestin (Tableau 12).

Femelle (no.)	Infection des organes		Ponte	Éclosion de larves
	Intestin	Ovaire		
1	négatif	négatif	Oui	Oui*
2	négatif	négatif	Oui	Oui*
3	négatif	négatif	Oui	Oui*
4	négatif	négatif	Oui	Oui*
5	positif	positif	Oui	Oui
6	négatif	négatif	Oui	Oui*
7	positif	positif	Oui	Oui
8	négatif	négatif	Oui	Oui*
9	négatif	négatif	Oui	Oui*
10	négatif	négatif	Oui	Oui*
11	négatif	négatif	Oui	Oui*
12	négatif	négatif	Oui	Oui*
13	positif	positif	Oui	Oui
14	négatif	négatif	Oui	Oui*
15	négatif	négatif	Oui	Oui*
16	positif	positif	Oui	Oui
17	positif	positif	Oui	Oui
18	positif	positif	Oui	Oui
19	négatif	négatif	Oui	Oui*
20	positif	positif	Oui	Oui
21	positif	positif	Oui	Non
22	positif	positif	Oui	Non
23	négatif	négatif	Oui	Oui*
24	négatif	négatif	Oui	Oui*
25	négatif	négatif	Oui	Oui*
26	négatif	négatif	Non	Non
27	négatif	négatif	Non	Non
28	positif	négatif	Non	Non
29	négatif	négatif	Non	Non
30	négatif	négatif	Non	Non
31	négatif	négatif	Non	Non
32	positif	positif	Non	Non

*larves non examinées

Tableau 12: Infection des organes des femelles F₁, ponte des oeufs F₁ et éclosion des larves F₂.

IV. TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DE *B. BURGENDORFERI* À LA DEUXIÈME GÉNÉRATION D'*I. RICINUS*

IV.1. Infection des oeufs

Les pontes obtenues des 9 femelles dont l'ovaire et l'intestin avaient montré des spirochètes fluorescents, ont été testées en IFD et 8 ont présenté des oeufs infectés: sur un total de 520 oeufs examinés, 452 étaient positifs soit 86.92%; l'infection des différentes pontes variant de 70.16% à 100% (Tableau 13).

Une tique sur les 9 ayant pondu, la femelle no. 13, n'a pas donné d'oeufs infectés malgré une infection de l'ovaire et de l'intestin; de même les larves issues de cette ponte se sont également révélées négatives en IFD.

Femelle (no.)	Nbre d'oeufs infectés / nbre d'oeufs examinés (%)	Nbre de larves infectées / nbre de larves examinées (%)
5	60/65 (92.3%)	59/65 (90.76%)
7	56/65 (86.15%)	61/65 (93.84%)
13	0/65 (0%)	0/65 (0%)
16	56/65 (86.15%)	13/16 (81.25%)
17	46/65 (70.76%)	20/20 (100%)
18	52/65 (80%)	65/65 (100%)
20	55/65 (84.61%)	26/33 (78.78%)
21	65/65 (100%)	—
22	62/65 (95.38%)	—

— absence d'éclosion de larves

Tableau 13: Infection des oeufs et des larves des femelles F_1 ayant présenté des spirochètes dans l'ovaire et l'intestin.

IV.2. Infection des larves F₂ à jeun

Nous avons obtenu des larves de 6/8 femelles ayant donné une ponte; un total de 264 larves ont été testées et 244 larves se sont montrées infectées, soit 92.42%. Le pourcentage d'infection variant de 78.78% à 100% d'une ponte à l'autre (Tableau 13).

Par ailleurs 2 pontes positives n'ont pas éclos en larves dont une, positive à 100%, était massivement infectée.

La comparaison des pourcentages d'infection entre les oeufs et les larves des différentes pontes montre pour la plupart une absence de différence significative (Tableau 14). C'est le cas de 4/6 pontes ayant donné des larves (femelles nos. 5, 7, 16 et 20) alors que les 2 restantes (femelles nos. 17 et 18) en présentent une; il s'agit pour ces 2 dernières de taux d'infection larvaire de 100%.

De même l'infection cumulée des oeufs de ces pontes montre une différence significative par rapport à celle des larves subséquentes.

Femelle (no.)	Nbre d'oeufs infectés / nbre d'oeufs examinés (%)	Nbre de larves infectées / nbre de larves examinées (%)	Test de Fischer (P)*	
5	60/65 (92.3%)	59/65 (90.76%)	1.00000	non
7	56/65 (86.15%)	61/65 (93.84%)	0.24161	non
16	56/65 (86.15%)	13/16 (81.25%)	0.69626	non
17	46/65 (70.76%)	20/20 (100%)	0.01157	oui
18	52/65 (80%)	65/65 (100%)	0.00013	oui
20	55/65 (84.61%)	26/33 (78.78%)	0.57407	non
Total	325/390 (83.33%)	244/264 (92.42%)	0.00082	oui

* seuil de significativité pour P<0.05

Tableau 14: Comparaison des pourcentages d'infection des oeufs et des larves F₂.

IV.3. Repas sanguin des larves F₂ et transmission de *B. burgdorferi* aux souris

Les larves infectées de deuxième génération ont été utilisées pour tenter de mettre en évidence le spirochète *B. burgdorferi* dans le plasma des souris à différents intervalles de temps après infestation (Stanek et al., 1985).

IV.3.1. Mise en évidence du spirochète *B. burgdorferi* dans le plasma de souris

Nous avons infesté 6 souris avec 60 larves chacune (nos. 126, 127, 128, 129, 130 et 131); le plasma des souris a été contrôlé aux jours J₅, J₁₃, J₁₈ et J₂₂ au microscope à fond noir: les souris étaient toutes positives au jour J₁₃ et une seule l'était au jour J₁₈; les spirochètes observés étaient bien mobiles mais peu nombreux, de 1 à 9 spirochètes par lame (Tableau 15).

Par contre toutes les souris se sont révélées négatives aux jours J₅ et J₂₂ après l'infestation par les larves F₂ infectées.

Les larves gorgées récoltées ont été conservées jusqu'à la mue.

Souris (no.)	Densité d'infestation	Nbre de larves gorgées récoltées	Infection du plasma				
			microscope à fond noir				culture
			J ₅	J ₁₃	J ₁₈	J ₂₂	J ₁₃
126	60	20	négatif	positif	négatif	négatif	négatif
127	60	32	négatif	positif	négatif	négatif	négatif
128	60	22	négatif	positif	négatif	négatif	négatif
129	60	27	négatif	positif	négatif	négatif	négatif
130	60	53	négatif	positif	négatif	négatif	négatif
131	60	39	négatif	positif	positif	négatif	négatif
Total	360	193					

Tableau 15: Infection du plasma de souris infestées par des larves F₂ infectées à l'examen au microscope à fond noir et résultat de leur mise en culture.

IV.3.2. Mise en culture du plasma en milieu BSK-II

Au 13^{ème} jour après infestation par les larves F₂, le plasma des 6 souris positives a été mis en culture dans du milieu BSK-II sans antibiotique. Aucune multiplication de spirochète n'a été détectée; par contre un spirochète immobile a été observé dans le cas du plasma en culture de la souris no. 128 (de 125 µl à 300 µl de plasma dans 2 ml de milieu BSK-II).

Ces tubes de culture de plasma ont été soumis à un test de PCR et aucun n'a permis de détecter la présence de spirochète.

Les nymphes F₂ à jeun n'ont pas été examinées et nos analyses n'ont pas été poursuivies pour cette récolte.

3.5. RÉCOLTE D'OCTOBRE 1995

I. LES ADULTES FEMELLES SAUVAGES

Cette dernière récolte est la seule à avoir été effectuée en automne, au mois d'Octobre 1995; elle a été entreprise suite aux résultats de la récolte du mois de Juin précédent et pour laquelle les prévisions faites sur l'accroissement du nombre de femelles transmettant le spirochète à leur descendance par l'augmentation de la récolte n'ont pas été atteintes.

En effet comme pour toutes les autres récoltes, une seule femelle a donné une descendance larvaire positive malgré le nombre élevé de femelles sauvages testées: nous en espérons 6 environ.

Nous avons ainsi récolté 300 femelles sauvages au Bois de l'Ermitage à Neuchâtel et de ces 300 femelles, 150 ont été utilisées pour infester 2 lapins soit 75 femelles par lapin. Après repas sanguin, un total de 142 femelles gorgées ont été récoltées et conservées jusqu'à la ponte. Ainsi 125 pontes ont été obtenues.

Comme pour la récolte de Juin 1995, nous n'avons pas procédé à la détermination du poids des femelles gorgées après leur repas sanguin. Pour cette récolte d'automne nous espérons selon nos prévisions obtenir environ 3 femelles donnant une descendance positive.

Toutes les femelles ayant donné une ponte, soit 125 femelles, ont ensuite été disséquées après oviposition pour examen en IFD de l'ovaire et de l'intestin.

Au total 4/125 femelles étaient positives, soit 3.2% des femelles gorgées, dont 2 avec une infection mixte de l'ovaire et de l'intestin et les 2 autres avec une infection limitée à l'intestin. Le tableau 1 ne représente que l'infection des organes (ovaire et intestin) des 125 femelles ayant donné une ponte.

Tique (no.)	Nb d'oeufs infectés / nb d'oeufs examinés		Infection des organes		Tique (no.)	Nb d'oeufs infectés / nb d'oeufs examinés		Infection des organes		Tique (no.)	Nb d'oeufs infectés / nb d'oeufs examinés		Infection des organes			
			intestin	ovaire				intestin	ovaire				intestin	ovaire		
1	0/65		négatif	négatif	33	0/65	négatif	négatif	64	0/65	négatif	négatif	95	0/65	négatif	négatif
2	0/65		négatif	négatif	34	0/65	négatif	négatif	65	0/65	négatif	négatif	96	0/65	négatif	négatif
3	0/65		négatif	négatif	35	0/65	négatif	négatif	66*	63/65	positif	positif	97	0/65	négatif	négatif
4	0/65		négatif	négatif	36	0/65	négatif	négatif	67	0/65	négatif	négatif	98	0/65	négatif	négatif
5	0/65		négatif	négatif	37	0/65	négatif	négatif	68	0/65	négatif	négatif	99	0/65	négatif	négatif
6	0/65		négatif	négatif	38	0/65	négatif	négatif	69	0/65	négatif	négatif	100	0/65	négatif	négatif
7	0/65		négatif	négatif	39	0/65	négatif	négatif	70	0/65	négatif	négatif	101	0/65	négatif	négatif
8	0/65		négatif	négatif	40	0/65	négatif	négatif	71	0/65	négatif	négatif	102	0/65	négatif	négatif
9	0/65		négatif	négatif	41	0/65	positif	positif	72	0/65	négatif	négatif	103	0/65	négatif	négatif
10	0/65		négatif	négatif	42	0/65	négatif	négatif	73	0/65	négatif	négatif	104	0/65	négatif	négatif
11	0/65		négatif	négatif	43	0/65	négatif	négatif	74	0/65	négatif	négatif	105	0/65	négatif	négatif
12	0/65		négatif	négatif	44	0/65	négatif	négatif	75	0/65	négatif	négatif	106	0/65	négatif	négatif
13	0/65		négatif	négatif	45	0/65	négatif	négatif	76	0/65	négatif	négatif	107	0/65	négatif	négatif
14	0/65		négatif	négatif	46	0/39	négatif	négatif	77	0/65	négatif	négatif	108	0/65	négatif	négatif
15	0/65		négatif	négatif	47	0/39	positif	négatif	78	0/65	négatif	négatif	109	0/65	négatif	négatif
16	0/65		négatif	négatif	48	0/65	négatif	négatif	79	0/65	négatif	négatif	110	0/65	négatif	négatif
17	0/65		négatif	négatif	49	0/65	négatif	négatif	80	0/65	négatif	négatif	111	0/65	négatif	négatif
18	0/65		négatif	négatif	50	0/65	négatif	négatif	81	0/65	négatif	négatif	112	0/65	négatif	négatif
19	0/65		négatif	négatif	51	0/65	négatif	négatif	82	0/65	négatif	négatif	113	0/65	négatif	négatif
20	0/65		négatif	négatif	52	0/65	négatif	négatif	83	0/65	négatif	négatif	114	0/65	négatif	négatif
21	0/65		positif	négatif	53	0/65	négatif	négatif	84	0/65	négatif	négatif	115	0/65	négatif	négatif
22	0/65		négatif	négatif	54	0/65	négatif	négatif	85	0/65	négatif	négatif	116	0/65	négatif	négatif
23	0/65		négatif	négatif	55	0/65	négatif	négatif	86	0/65	négatif	négatif	117	0/65	négatif	négatif
24	0/65		négatif	négatif	56	0/65	négatif	négatif	87	0/65	négatif	négatif	118	0/65	négatif	négatif
25	0/65		négatif	négatif	57	0/65	négatif	négatif	88	0/65	négatif	négatif	119	0/65	négatif	négatif
26	0/65		négatif	négatif	58	0/65	négatif	négatif	89	0/65	négatif	négatif	120	0/65	négatif	négatif
27	0/65		négatif	négatif	59	0/65	négatif	négatif	90	0/65	négatif	négatif	121	0/65	négatif	négatif
28	0/65		négatif	négatif	60	0/65	négatif	négatif	91	0/65	négatif	négatif	122	0/65	négatif	négatif
29	0/65		négatif	négatif	61	0/65	négatif	négatif	92	0/65	négatif	négatif	123	0/65	négatif	négatif
30	0/65		négatif	négatif	62	0/65	négatif	négatif	93	0/65	négatif	négatif	124	0/65	négatif	négatif
31	0/65		négatif	négatif	63	0/65	négatif	négatif	94	0/65	négatif	négatif	125	0/65	négatif	négatif
32	0/65		négatif	négatif												

Tableau 1: Infection des organes (ovaire, intestin) et des oeufs des femelles sauvages gorgées

* femelle avec une ponte infectée

II. TRANSMISSION TRANSOVARIIENNE DE *B. BURGDORFERI* AUX OEUFS ET AUX LARVES F₁

II.1. Infection des oeufs

Pour chacune des 125 pontes, nous avons examiné 65 oeufs en IFD, et au total 8125 oeufs ont été testés; une seule ponte s'est révélée positive, (femelle no. 66) et elle correspond à l'une des 2 femelles avec ovaire et intestin positifs (femelles nos. 41 et 66) (Tableau 1). Ce qui donne pour cette récolte une fréquence de transmission transovarienne de 0.8%.

Pour la ponte positive de la femelle no. 66, 65/65 oeufs ont présenté des spirochètes, soit un pourcentage d'infection de 100%.

II.2. Infection des larves F₁ à jeun

Les larves issues de la seule ponte positive (femelle no. 66) ont été examinées en IFD et se sont révélées positives à 95%, soit 99 larves infectées sur les 104 testées.

Par ailleurs la descendance larvaire des 3 autres femelles ayant présenté des spirochètes, soit au niveau de l'ovaire et de l'intestin (femelle no. 41) soit au niveau de l'intestin seul (femelle no. 21 et 47), a été également examinée. Pour chacune d'elles 65 larves ont été testées en IFD mais aucune n'a présenté de spirochète.

Aucune différence n'est observée entre le pourcentage d'infection des oeufs (100%) et celui des larves (95%) issues de cette ponte positive ($P=0.15767$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

Des tentatives d'isolement du spirochète *B. burgdorferi* ont été faites avec un total de 35 larves dont 13 larves gorgées et 22 larves à jeun.

Les larves gorgées ont été mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques à raison de 5 tubes avec une larve gorgée chacun et 4 tubes contenant chacun 2 larves gorgées. Quant aux larves à jeun, elles ont été réparties dans 12 tubes dont 5 tubes avec une larve chacun, 6 tubes de 2 larves chacun et un tube avec 5 larves.

L'examen périodique au microscope à fond noir des 21 tubes contenant les larves en culture est resté négatif aussi bien pour les larves à jeun que pour les larves gorgées.

III. TRANSMISSION TRANSSTADIALE DE *B. BURGDORFERI* DES LARVES F₁ AUX ADULTES F₁

III.1. Repas sanguin des larves F₁ à jeun et transmission de *B. burgdorferi* aux souris

Les larves issues de la ponte positive de la femelle no. 66 ont été utilisées d'une part pour suivre le devenir de l'infection chez la tique comme pour les autres récoltes (souris nos. 105, 106, 109, 110, 112), et d'autre part pour une expérience de "cofeeding" (souris nos. 103, 104, 107, 108, 111).

III.1.2. Suivi de l'infection par *B. burgdorferi* chez *I. ricinus*

Pour cette expérience, un total de 5 souris ont été utilisées, dont 3 BALB/C mâles et 2 souris mâles 'swiss', avec une densité larvaire unique de 85 larves par souris (Tableau 2).

Souris (no.)	Densité larvaire	Larves gorgées
105	85	81
106	85	68
109	85	70
110	85	67
112	85	74
Total	425	360

Tableau 2: Repas sanguin des larves F₁.

III.1.2.1. Biopsies d'oreilles

Des biopsies d'oreilles ont été pratiquées sur les souris (nos. 105, 106, 109, 110 et 112) à différentes dates après leur infestation par des larves F₁ infectées et les biopsies ont été mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques.

Les biopsies ont été faites aux jours J₁₄ (I), J₂₁ (II), J₂₈ (III) et J₆₃ (IV) pour les souris nos. 105, 109 et 110; aux jours J₇ (I), J₂₁ (II), J₃₂ (III) et J₅₇ (IV) pour la souris no. 112 (Tableau 3).

L'examen des tubes de culture contenant les biopsies d'oreilles n'a pas permis de voir de spirochètes au microscope à fond noir.

III.1.2.2. Xénodiagnoses

Par ailleurs, une série de xénodiagnoses successives ont été faites sur les mêmes souris (nos. 105, 109, 110 et 112) avec 20 à 30 larves saines: aux jours J₇ (I), J₁₄ (II), J₂₁ (III), J₂₈ (IV) et J₆₆ (V) après leur infestation par les larves F₁ pour les souris nos. 105, 109 et 110; aux jours J₇ (I), J₁₄ (II), J₂₁ (III), J₃₂ (IV) et J₆₀ (V) pour la souris no. 112 (Tableau 3).

L'examen des nymphes à jeun issues des larves de xénodiagnose n'a pas montré de spirochètes fluorescents.

Souris (no.)	Biopsies d'oreilles				Xénodiagnoses				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	V
105	négative	négative	négative	négative	0/9	0/10	0/18	0/2	0/15
109	négative	négative	négative	négative	0/11	0/2	0/18	0/15	0/13
110	négative	négative	négative	négative	0/8	0/2	0/12	0/4	0/9
112	négative	négative	négative	négative	0/18	0/18	0/15	0/11	—
Total					0/46	0/32	0/63	0/32	0/37

— nymphes à jeun non testées

Tableau 3: Résultat des xénodiagnoses et de la mise en culture des biopsies d'oreilles effectuées sur les souris infestées par les larves F₁ infectées.

III.2.2. Cofeeding avec les larves F₁ à jeun

A travers cette expérience, nous avons tenté de voir si une transmission par cofeeding, c'est-à-dire une transmission de *B. burgdorferi* de tiques infectées à tiques non infectées, pouvait avoir lieu avec des larves infectées par voie transovarienne (Gern & Rais, 1986).

Un total de 4 souris ont servi à cette expérience dont 2 souris mâles 'swiss' (nos. 107 et 108) et 2 souris BALB/C mâles (nos. 103 et 104). Chaque souris a été infestée au jour J₀ (I) par 15 nymphes saines dans une capsule puis au jour J₁, 85 larves F₁ infectées ont été rajoutées dans chaque capsule.

Souris (no.)	Densité larvaire F ₁	Larves F ₁ gorgées	Densité nymphale	Nymphes gorgées
103	85	70	15	10
104	85	70	15	14
107	85	58	15	10
108	85	56	15	8
111	85	62	15	10
Total	425	316	75	52

Tableau 4: Repas sanguin des larves F₁ et des nymphes saines (jour J₀) utilisées pour l'expérience de cofeeding.

Les nymphes gorgées du jour J₀ ont été examinées après mue comme adultes mâles et femelles à jeun: aucun spirochète fluorescent n'a été observé chez ces tiques (Tableau 5).

Souris (no.)	Densité nymphale	Nymphes gorgées récoltées	Nbre d'adultes infectées / nbre d'adultes examinés
103	15	10	0/7
104	15	14	0/9
107	15	10	0/8
108	15	8	0/6
111	15	10	0/7
Total	75	52	0/37

Tableau 5: Infection des tiques adultes mâles et femelles issues des nymphes saines utilisées pour infester les souris au jour J₀ de l'expérience de cofeeding.

III.2.2.1. Xénodiagnoses

Une série de tests de xénodiagnose ont été pratiqués sur ces souris avec des larves saines et les nymphes à jeun issues de ces larves ont été examinées en IFD (Tableau 6).

Aux jours J₇ (II) et J₁₁ (III), une xénodiagnose a été faite sur ces souris avec 25 à 30 larves saines dans chaque capsule afin de mettre en évidence une éventuelle infection localisée au site de fixation des larves F₁ infectées. La souris BALB/C no. 104 est morte au jour J₈ et a été remplacée par la no. 111 avec laquelle le même protocole a été suivi; 62 larves F₁ gorgées ont été récoltées de cette souris.

Afin de déceler une possible dissémination de l'infection chez ces souris, une xénodiagnose a été pratiquée sur la tête de chacune des souris avec 25 larves saines, aux jours J₁₄ (IV), J₂₁ (V), J₂₈ (VI) et J₆₆ (VII).

III.2.2.2. Biopsies d'oreilles

Des biopsies d'oreilles ont en outre été effectuées aux jours J₁₄ (I), J₂₁ (II), J₂₈ (III) et J₆₃ (IV) puis mises en culture dans du milieu BSK-II avec antibiotiques dans le but d'isoler le spirochète.

Les biopsies d'oreilles ont été examinées au microscope à fond noir et le contrôle périodique des tubes de culture n'a pas permis d'observer de spirochète (Tableau 6).

Souris (no.)	Xénodiagnoses						Biopsies			
	I*	II*	III*	IV*	VI*	VI*	I	II	III	IV
103	0/15	0/13	0/14	0/12	0/9	0/7	nég.	nég.	nég.	nég.
104	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
107	0/14	0/9	0/11	0/15	0/5	—	nég.	nég.	nég.	nég.
108	0/11	0/5	0/16	0/16	0/14	0/16	nég.	nég.	nég.	nég.
111	0/18	0/14	0/17	0/17	0/4	0/7	nég.	nég.	nég.	nég.
Total	0/58	0/41	0/58	0/60	0/32	0/30				

† souris morte

— nymphes à jeun non examinées

* adultes à jeun (mâles et femelles issues des nymphes du J₀)

** nymphes à jeun issues des larves saines

Tableau 6: résultat des xénodiagnoses et de la mise en culture des biopsies d'oreilles effectuées sur les souris de l'expérience de cofeeding avec les larves F₁ à jeun.

III.3. Infection des nymphes F₁ à jeun

Après la mue larvaire, 120 nymphes à jeun ont été examinées en IFD et 94 présentaient des spirochètes, soit un taux d'infection de 78.33%; les taux variant de 33% à 100% d'une tique à l'autre (Tableau 7).

Par rapport à celui des larves (95%), le pourcentage d'infection des nymphes (78.33%) est plus faible et la différence est significative ($P=0.00034$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

Souris (no.)	Nbre de nymphes infectées / nbre de nymphes examinées
103	10/12 (83.3%)
104	12/12 (100%)
107	10/12 (83.3%)
108	8/12 (66.6%)
111	4/12 (33.3%)
105	7/12 (58.3%)
106	12/12 (100%)
109	12/12 (100%)
110	12/12 (100%)
112	7/12 (58.3%)
Total	94/120 (78.33%)

Tableau 7: Infection des nymphes F₁ à jeun

Aucune tentative d'isolement de *B. burgdorferi* n'a été faite à partir des nymphes F₁ à jeun pour cette récolte.

III.4. Repas sanguin des nymphes F₁ et transmission de *B. burgdorferi* aux souris

Les nymphes F₁ issues de cette dernière récolte ont été utilisées dans 2 expériences de mise en évidence du spirochète dans le plasma des souris (Stanek et al., 1985). Un total de 9 souris blanches mâles ont été utilisées pour ces expériences.

Ainsi 3 souris ont été infestées chacune par 25 nymphes F₁ infectées (nos. 117, 118 et 119). Leurs plasmas observés aux 7^{ème} et 22^{ème} jours après infestation par les nymphes

n'ont pas montré de spirochète au microscope à fond noir; par contre au 15ème jour après infestation, les 3 souris étaient toutes positives (Tableau 8).

La même expérience a été refaite avec 6 souris (nos. 120, 121, 122, 123, 124 et 125): aucun spirochète n'a été observé dans le plasma aux 7ème et 22ème jours; tandis que de nouveau, à l'examen au microscope à fond noir le plasma des 6 souris présentait des spirochètes au 15ème jour après leur infestation par les nymphes F₁ infectées (Tableau 8).

Les spirochètes ainsi observés au microscope à fond noir sont bien mobiles malgré leur faible nombre; nous n'avons vu que de 1 à une dizaine de spirochètes par lame.

La mise en culture du plasma infecté de ces souris n'a permis la multiplication des spirochètes ni en milieu BSK-II avec antibiotiques ni en milieu BSK-II sans antibiotique.

Néanmoins un spirochète immobile a pu être observé en milieu BSK-II avec antibiotiques pour le plasma en culture de la souris no. 123.

Souris (no.)	Densité d'infestation	Nombre de nymphes gor- gées récoltées	infection du plasma			
			microscopie à fond noir			culture
			J ₇	J ₁₅	J ₂₂	J ₁₅
117	25	11	négatif	positif	négatif	négatif
118	25	6	négatif	positif	négatif	négatif
119	25	8	négatif	positif	négatif	négatif
120	25	14	négatif	positif	négatif	négatif
121	25	20	négatif	positif	négatif	négatif
122	25	12	négatif	positif	négatif	négatif
123	25	4	négatif	positif	négatif	négatif
124	25	13	négatif	positif	négatif	négatif
125	25	11	négatif	positif	négatif	négatif
Total	225	99				

Tableau 8: résultat de l'expérience de mise en évidence de *B. burgdorferi* dans le sang de souris infestées par des nymphes F₁ infectées.

III.5. Détection et caractérisation du spirochète par PCR

Un total de 21 nymphes F₁ à jeun ont été écrasées sur une lame puis un test de PCR a été fait sur les étalements. Le test a permis de conclure au genre *Borrelia* mais nous n'avons pas pu caractériser la souche présente dans ces nymphes.

Par ailleurs, le plasma infecté de 3 souris (nos. 117, 118 et 119) a été mis en culture puis soumis à un test de PCR pour tenter de caractériser la souche de *Borrelia* présente dans le sang de ces souris. Aucune caractérisation n'a été possible, le test de PCR s'étant révélé négatif pour les 3 souris.

Nous ne sommes pas allé plus loin dans nos analyses pour cette récolte et ainsi aucune expérience n'a été entreprise avec les adultes issues des nymphes F₁ infectées.

3.6. DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-*B. BURGDORFERI*

Dans nos tentatives de mettre en évidence une transmission du spirochète *B. burgdorferi* par les tiques F_1 ou F_2 (larves, nymphes ou femelles issues des différentes récoltes), aux souris sur lesquelles elles se sont nourries, nous avons testé les sera de certaines de ces souris par immunodot-blot et par western-blot; ceci afin de voir si elles avaient réagi avec des antigènes du spirochète.

Nous avons ainsi testé ces sera par rapport aux 3 sous-espèces de *B. burgdorferi* sensu lato à savoir *B. burgdorferi* sensu stricto (souche ZS7), *B. garinii* (souches NE4 et NE83c), *B. afzelii* (souche NE517 et NE632).

I. Immunodot-blot des sera

Un certain nombre de sera (24 au total) ont été testés par immunodot-blot et ont donné des réactions assez faibles dans l'ensemble par rapport à des sera témoins positifs. Par ailleurs ces sera réagissent indistinctement avec les antigènes des 3 sous-espèces de *B. burgdorferi* sensu lato.

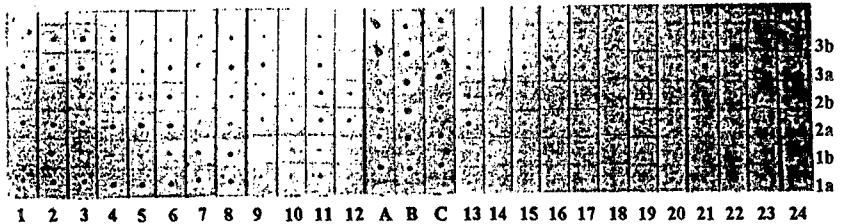


Photo I: test d'immunodot-blot de sera de souris infestées par des larves F_1 ou des nymphes F_1 .

Ligne (no.)	Souris (no.)	Stade infestant	Récolte	Ligne (no.)	Souris (no.)	Stade infestant	Récolte
1	76	Larve F_1	Juin 1995	13	120*	Nymphe F_1	Octobre 1995
2	77	Larve F_1	Juin 1995	14	121*	Nymphe F_1	Octobre 1995
3	79	Larve F_1	Juin 1995	15	122*	Nymphe F_1	Octobre 1995
4	103	Larve F_1	Octobre 1995	16	123*	Nymphe F_1	Octobre 1995
5	110	Larve F_1	Octobre 1995	17	124*	Nymphe F_1	Octobre 1995
6	112	Larve F_1	Octobre 1995	18	125*	Nymphe F_1	Octobre 1995
7	114	Nymphe F_1	Juin 1995	19	128*	Larve F_2	Juin 1995
8	115	Nymphe F_1	Juin 1995	20	129*	Larve F_2	Juin 1995
9	116	Nymphe F_1	Juin 1995	21	130*	Larve F_2	Juin 1995
10	117*	Nymphe F_1	Juin 1995	22	131*	Larve F_2	Juin 1995
11	118*	Nymphe F_1	Octobre 1995	23	95	Nymphe F_1	Juin 1995
12	119*	Nymphe F_1	Octobre 1995	24	97	Nymphe F_1	Juin 1995

Lignes A, B, et C correspondent aux sera-témoins de souris infestées par des nymphes infectées par nutrition artificielle avec différentes souches (NE632, NE83c, ZS7):

Ligne A: souche NE632

antigène B31

1a: 1µg

1b: 0.5µg

Ligne B: souche NE83c

antigène NE4

2a: 1µg

2b: 0.5µg

Ligne C: souche ZS7

antigène NE517

3a: 1µg

3b: 0.5µg

* Souris ayant présenté des spirochètes dans le plasma

Légende de la photo I

Sur la photo I, on note néanmoins une réaction assez forte des sera nos. 77, 79, 103 et 112 (souris infestées par des larves F₁), nos. 115 et 118 (souris infestées par des nymphes F₁).

Le test d'immunodot-blot devait nous permettre de faire un tri des sera en vue d'une analyse par western-blot mais les réactions obtenues n'étant que très faibles dans l'ensemble, nous avons choisi de tester quelques sera de souris par western-blot et en particulier, ceux des souris dont l'infection du plasma a été démontrée par l'observation du spirochète au microscope à fond noir.

II. Western-blot des sera

Un total de 26 sera ont été testés par western-blot (photos II et III) et nous observons dans l'ensemble qu'il y a eu réaction avec des antigènes du spirochète. La plupart des sera reconnaissent les protéines situées dans les régions de poids moléculaire entre 40 Kda et 90 Kda, protéines qui sont communes à l'ensemble des isolats de *B. burgdorferi*; et pratiquement tous réagissent avec la flagelline, protéine de 41 Kda.

Si ces sera reconnaissent donc bien des protéines antigéniques de *B. burgdorferi*, les différents profils obtenus par western-blot ne permettent cependant pas une identification de la souche présente dans les stades infestants de tiques. Néanmoins ils montrent que les souris ont été en contact avec le spirochète ou tout au moins avec certains de ces composants antigéniques.

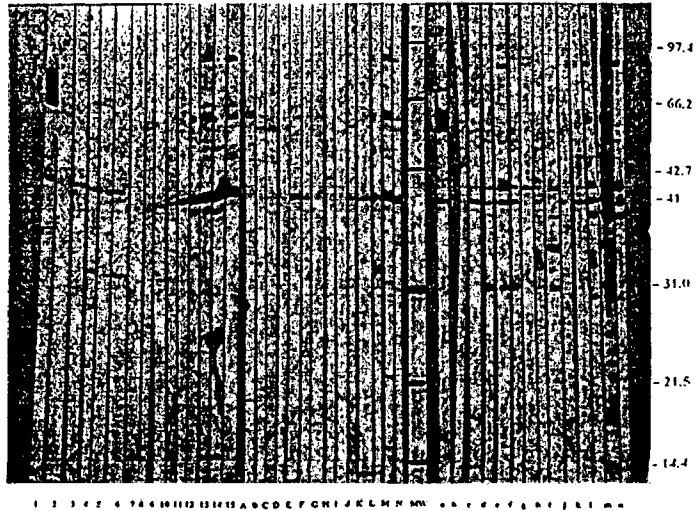


Photo II: profils protéiniques obtenus en western-blot avec des sera de souris infestées par des larves F_1 et des nymphes F_1 infectées.

Lignes (no.)			Souris (no.)	Stade Infestant	Récolte
1	A	a	103	larves F_1	Octobre 1995
2	B	b	115	nymphes F_1	Juin 1995
3	C	c	110	larves F_1	Octobre 1995
4	D	d	128 *	larves F_2	Juin 1995
5	E	e	129 *	larves F_2	Juin 1995
6	F	f	130 *	larves F_2	Juin 1995
7	G	g	131 *	larves F_2	Juin 1995
8	H	h	109	larves F_1	Octobre 1995
9	I	i	124 *	nymphes F_1	Juin 1995
10	J	j	97	nymphes F_1	Juin 1995
11	K	k	95	nymphes F_1	Juin 1995
12	L	l	Témoin positif ZS7	Sera de souris infestées par des nymphes ayant été infectées par nutrition artificielle avec différentes souches (ZS7, NE632, NE83c, NE496)	
13	M	m	Témoin positif NE632		
14	N	n	Témoin positif NE83c		
15			Témoin positif NE496		
Lignes 1 à 15:		souche NE4			
Lignes A à N:		souche B31			
Lignes a à n:		souche NE517			
* souris ayant présenté des spirochètes dans le plasma					
Légende de la photo II					

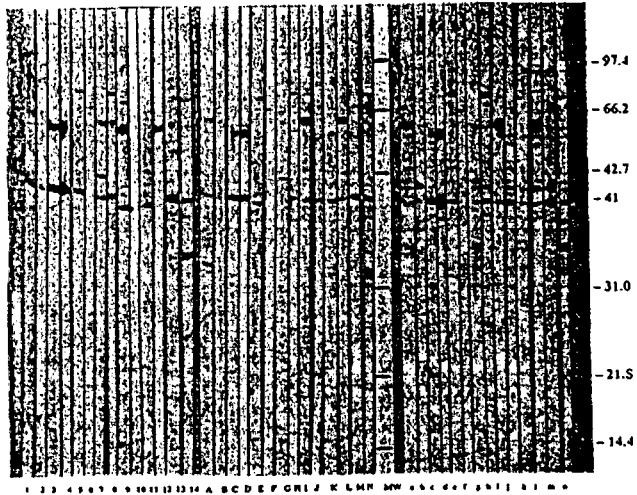


Photo III: profils protéiniques obtenus en western-blot avec des sera de souris infestées par des larves F_1 et des nymphes F_1 infectées.

Lignes (no.)			Souris (no.)	Stade infestant	Récolte
1	A	a	29	nymphes F_1	Juin 1993
2	B	b	37	larves F_1	Mai 1994
3	C	c	39	larves F_1	Mai 1994
4	D	d	49	nymphes F_1	Mai 1994
5	E	e	51	nymphes F_1	Mai 1994
6	F	f	53	nymphes F_1	Mai 1994
7	G	g	76	larves F_1	Juin 1995
8	H	h	12	larves F_1	Juin 1991
9	I	i	103	larves F_1	Octobre 1995
10	J	j	117 *	nymphes F_1	Octobre 1995
11	K	k	119 *	nymphes F_1	Octobre 1995
12	L	l	79	larves F_1	Juin 1995
13	M	m	90	nymphes F_1	Juin 1995
14	N	n	Lapin	féelles F_1	Juin 1995
Lignes 1 à 14: souche NE4					
Lignes Δ à N: souche B31					
Lignes a à n: souche NES17					
* souris ayant présenté des spirochètes dans le plasma					
Légende de la photo III					

3.7. RÉCAPITULATION COMPARATIVE DES 5 RÉCOLTES

Nous avons regroupé dans les tableaux I et II (voir les pages nos. 85 & 86), les principaux résultats et données relatifs aux différentes récoltes. Ces 2 tableaux récapitulatifs donnent en résumé les pourcentages d'infection obtenus par l'examen des différents stades évolutifs de *I. ricinus* (oeufs, larves, nymphes ou adultes) mais aussi la plupart des résultats qui seront traités dans la discussion de notre travail.

Par ailleurs, les photos A et B (voir la page no. 87) illustrent 2 des techniques utilisées pour mettre en évidence le spirochète chez la tique.

– La photo A montre des spirochètes fluorescents dans un oeuf, après une réaction d'immunofluorescence directe.

– La photo B représente une infection massive de l'intestin chez une tique femelle après oviposition. Il s'agit d'une coupe à la paraffine colorée à l'argent selon la méthode de Dieterle.

Tableau I: Récapitulatif des résultats et données relatifs aux différentes récoltes.

STADES	JUIN 91	JUIN 93	MAI 94	JUIN 95	OCTOBRE 95	TOTAL
FEMELLES SAUVAGES	55 récoltées; 30 infestantes; 42 gorgées; 34 pontes	138 récoltées; 78 infestantes; 76 gorgées; 71 pontes	74 récoltées; 60 infestantes; 54 gorgées; 51 pontes	428 récoltées; 375 infestantes; 352 gorgées; 288 pontes	300 récoltées; 150 infestantes; 142 gorgées; 125 pontes	995 récoltées; 713 infestantes; 666 gorgées; 569 pontes
OEUFs F ₁	2.9% (1/34) * 43.6% (28/55) *	1.4% (1/71) * 65% (39/60) * †	1.9% (1/51) * 64.3% (74/115) * †	—	0.8% (1/125) * 100% (63/65) * †	1.42% (4/281) * 68.47% (202/295) * 74% (178/240) †
LARVES F ₁		1.4% (1/71) **	1.9% (1/51) **	1.29% (1/77) **	0.8% (1/125) **	1.23% (4/324) **
- Fréquence de TTO		—	—	1.64% (1/60) †	25% (1/4) †	3.12% (2/64) †
- Taux de TTO		47% (17/36) ***	82% (111/135) ***	94% (108/108) ***	95% (99/104) ***	85.8% (327/381) ***
- Infection						
SOURIS		1	11	5	10 (5 cof + 5)	22
- Biopsies		0/1	0/11	0/5	0/10	0/22
- Xénodiagnoses		0/1	0/11	0/5	0/10	0/22
NYMPHES F ₁						
- Infection						
SOURIS		66.6% (12/18)	84.8% (11/12/132)	93% (56/60)	78% (94/120)	83% (274/330)
- Biopsies		4	8	13 (7 + 4 cof + 2 plasma)	9 (plasma)	34
- Xénodiagnoses		0/4	0/8	0/11	—	0/23
- Plasma		0/4	0/8	0/11	—	0/23
ADULTES F ₁		—	—	0/2 aux jours J ₁ , J ₂ , J ₃ , J ₄ , J ₅	9/9 au jour J ₁₅	9/11
Dietatie						
Femelles		—	4/20	—	—	4/20
- à jeun		6/14	—	—	—	6/14
- gorgées		2/16	1/30	—	—	3/46
Mâles		—	—	—	—	—
IED						
Femelles		—	0/15	0/12	—	0/27
- à jeun		—	0/70	11/32	—	11/102
- gorgées		—	0/14	3/12	—	3/26
Mâles		—	—	—	—	—
OEUFs F ₂		14% (2/14)	0% (0/70)	32% (8/25)	—	—
- Fréquence de TTO		64.6% (84/130)	0% (0/4550)	83% (325/390) §	—	—
- Infection						

STADES	JUN 91	JUN 93	MAI 94	JUN 95	OCTOBRE 95	TOTAL
LARVES F ₁ - Fréquence de TTO - Taux de TTO - Infection		Pres d'éclosion	Les larves n'ont pas été examinées suite à la négativité des oeufs	24% (6/25) 66.6% (6/9) 92.4% (244/264) 6 (plasma)		24% (6/25) 66.6% (6/9) 92.4% (244/264) 6 (plasma)
SOURIS - Biopsies - Xenodiagnoses - Plasma				6/6 au jour J ₁ — — —		6/6 au jour J ₁ — — —
* récoltes pour lesquelles les oeufs F ₁ ont été analysés. ** récoltes pour lesquelles les larves F ₁ ont été analysés. *** récoltes pour lesquelles des nymphes F ₁ ont été obtenues. † récoltes pour lesquelles les oeufs puis les larves F ₁ ont été analysés. ‡ récoltes pour lesquelles le taux de transmission transovarienne a pu être établi.				TTO transmission transovarienne Cof. expérience de cofeding pas fait ou non déterminé Plasma expérience de mise en évidence du spirochète dans le plasma § pontes dont les oeufs ont éclos en larves		
STADES	JUN 91	JUN 93	MAI 94	JUN 95	OCTOBRE 95	TOTAL
FEMELLES SAUVAGES examinées	34 Disséquées 1 avec intestin, ovaire et ponte infectés	1 Disséquée 1 avec intestin, ovaire et ponte infectés	1 Disséquée 1 avec intestin, ovaire et ponte infectés	288 Disséquées 1 avec intestin, ovaire et ponte infectés	125 Disséquées 1 avec intestin, ovaire et ponte infectés	449 Disséquées 5 avec intestin, ovaire et ponte infectés
OEUF F ₁ examinés	1870	4260	3365	Oeufs non examinés	8125	17620
LARVES F ₁ examinées	PAS D'ÉCLOSION	36 + 10 = 46	135	3546	299	4026
NYPHES F ₁ examinées		18	132 + 81 = 213	60	120	411
ADULTES F ₁ examinés - Femelles - Mâles		30 14 16	70 + 50 + 29 = 149 70 + 35 = 105 30 + 14 = 44	25 + 12 + 12 = 49 25 + 12 = 37 12	Adultes non examinés	228 156 72
DEUFS F ₂ examinés		286	4550	585		5421
LARVES F ₂ examinées				264		264

Tableau II. Récapitulatif des résultats et données relatifs aux différentes récoltes.

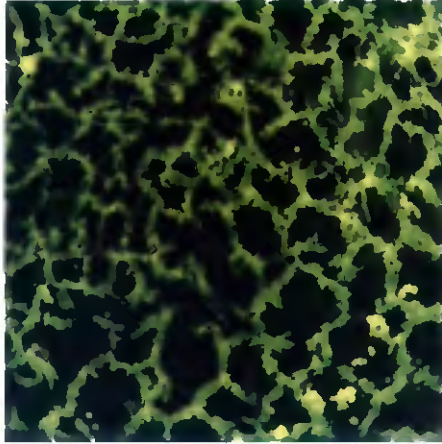


Photo A: Infection d'un oeuf par *B. burgdorferi* (spirochètes fluorescents) (150X)
(test direct d'immunofluorescence)

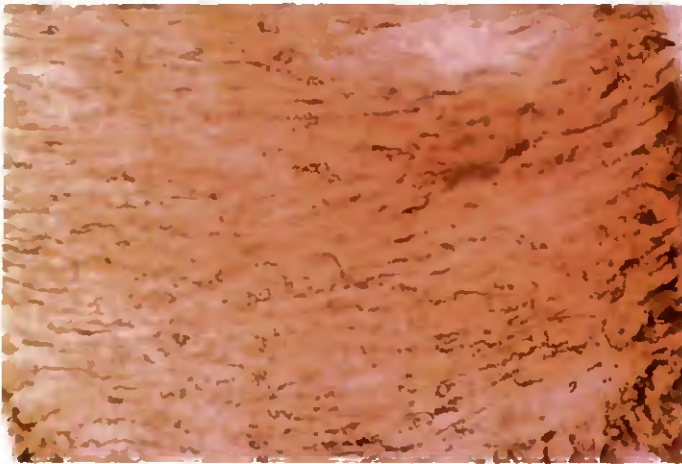


Photo B: Infection massive par *B. burgdorferi* de l'intestin d'une femelle
après oviposition (750X) (coloration de Dieterle)

4. DISCUSSION

I. FRÉQUENCE ET TAUX DE TRANSMISSION TRANSOVARIENNE

La transmission transovarienne est généralement quantifiée par la prévalence de l'infection chez les larves à jeun récoltées dans la nature ou par les pourcentages de femelles infectées passant le spirochète aux larves.

Dans la quantification du phénomène concernant les femelles, on peut tenir compte:

- soit de l'ensemble des femelles examinées donnant une descendance infectée, quel que soit le statut de l'infection chez ces femelles; on définit ainsi la **fréquence de transmission**.
- soit uniquement des femelles examinées présentant une infection au niveau de leurs organes, localisée ou généralisée; on parle alors de **taux de transmission transovarienne**.

I.1. Prévalence de l'infection chez les larves sauvages à jeun

L'infection des larves à jeun récoltées sur la végétation renseigne sur l'existence du phénomène de transmission transovarienne dans la nature; une infection des larves ne pouvant être héritée que d'une transmission transovarienne à partir d'une femelle infectée via les oeufs.

Cependant, Piesman (1991) a émis l'idée selon laquelle des larves partiellement gorgées sur un hôte peuvent ensuite se fixer et se nourrir sur un autre hôte. Des larves pourraient ainsi s'infecter sur un hôte spirochétémique lors d'un repas partiel et par conséquent, selon lui, une infection chez les larves dites à jeun dans la nature ne résulterait pas forcément d'une transmission transovarienne. En dehors de cette hypothèse, il est admis que les larves trouvées infectées à jeun dans la nature doivent leur infection uniquement à une transmission transovarienne.

Les taux d'infection, c'est-à-dire la prévalence, chez les larves à jeun d'*I. ricinus* récoltées dans différentes régions d'Europe sont généralement faibles. Pour citer quelques exemples, notons:

– en Suisse, Zhioua et al. (1994) ont trouvé 20/652 larves avec des spirochètes soit une prévalence de 3.1%;

- en Allemagne, Steinbrink (1994) trouve une prévalence de 5.3% (n=112); tandis qu'une autre étude (Matuschka et al., 1992) avait établi un taux de 0.7% (n=150);
- en Tchéquie, Halouzka et al. (1995) ont récolté 9/142 larves infectées soit un taux d'infection de 6.3%;
- en France, Doby et al. (1990) trouvent une prévalence de 4.8% (n=355).

Aux États-Unis, les prévalences rapportées sont encore plus faibles: Piesman et al. (1986) observent des spirochètes chez 2/274 nymphes *I. scapularis* issues de larves récoltées dans la nature et nourries sur des hamsters.

Si l'on tient compte de ces taux de prévalence, nous constatons que le phénomène de transmission transovarienne semble peu important dans la nature d'autant que d'autres travaux ont noté une absence de spirochètes chez des larves à jeun récoltées dans la nature. C'est le cas notamment en France de Doby et al. (1989) sur un total de 351 larves et en Suède de Mejlou et Jaenson (1993) à partir d'un échantillon de 421 larves. Aux États-Unis, Piesman (1991) ne trouve aucun spirochète chez 148 larves d' *I. scapularis* récoltées à jeun dans la nature.

1.2. Fréquence de transmission transovarienne

Nous définissons la fréquence de transmission transovarienne comme le pourcentage de femelles qui transmettent le spirochète à leur descendance.

Il s'agit du rapport des femelles ayant donné une descendance infectée sur l'ensemble des femelles examinées.

La descendance des femelles est étudiée à partir des larves, mais dans notre travail nous l'avons examinée aussi dès le stade des oeufs pondus par ces femelles puis ensuite au stade larvaire après éclosion des oeufs.

1.2.1. Fréquence de transmission par rapport aux oeufs

La fréquence de transmission par rapport aux oeufs correspond donc au pourcentage de pontes présentant des oeufs infectés sur le total des pontes étudiées. En effet la descendance des femelles a été examinée dès le stade des oeufs pour 4 des 5 récoltes que nous avons effectuées; la récolte de Juin 95 n'ayant été étudiée qu'à partir des larves F₁.

Nous observons dans chaque cas qu'une seule ponte a présenté des oeufs infectés et ceci quel que soit le nombre de femelles testées: la fréquence est de 2.9% (n=34) en Juin 91, 1.4% (n=71) en Juin 93, 1.9% (n=51) en Mai 94 et 0.8% (n=125) en Octobre 95.

Le passage de l'infection des femelles aux oeufs apparaît donc comme peu fréquent et si l'on considère l'ensemble des 4 récoltes pour lesquelles l'infection des oeufs a été établie nous obtenons une fréquence de 1.42%, soit 4/281 femelles qui ont donné des oeufs infectés.

Dans la littérature peu de travaux ont été faits concernant l'infection des oeufs pondus par des femelles infectées. Burgdorfer et al. (1988) ont examiné 100 oeufs de chacune de 12 femelles sauvages *I. dammini* récoltées dans la nature et nourries sur des lapins au laboratoire; ces femelles présentaient une infection généralisée mais aucune des 12 pontes examinées n'a présenté d'oeufs infectés. Par contre, ils observent des oeufs infectés dans les pontes de 4/5 femelles gorgées infectées expérimentalement.

Chez *I. ricinus*, Stanek et al. (1986) ont observé des spirochètes au niveau des homogénats d'oeufs issus des pontes de 3 femelles gorgées dont les broyats s'étaient révélés également infectés.

1.2.2. Fréquence de transmission par rapport à la descendance larvaire

Sur l'ensemble des 5 récoltes d'adultes d'*I. ricinus*, nous avons obtenu une descendance larvaire pour 4 d'entre elles et, dans le cas de la récolte de Juin 91 les oeufs de la femelle ayant donné une ponte infectée n'ont pas éclos en larves.

Outre les récoltes de Juin 93, de Mai 94 et d'Octobre 95, une descendance larvaire a été obtenue également pour celle de Juin 95, récolte pour laquelle nous n'avons pas pu examiner les oeufs pondus par les femelles sauvages.

Comme pour les oeufs, nous avons obtenu pour chaque récolte une seule femelle générant une descendance larvaire infectée et dans le cas des récoltes de Juin 91, de Mai 94 et d'Octobre 95, il s'agit évidemment de celles ayant présenté des oeufs infectés dans leur ponte.

Les fréquences de transmission transovarienne sont donc les mêmes que par rapport aux oeufs de ces 3 récoltes, soit respectivement 1.4% (1/71 femelle), 1.9% (1/51 femelle) et 0.8% (1/125 femelle). Quant à la récolte de Juin 1995, nous obtenons une fréquence de 1.29%, soit 1/77 femelles ayant donné une descendance larvaire infectée.

Pour l'ensemble des 4 récoltes pour lesquelles une descendance larvaire a été obtenue, la fréquence totale est de 1.23% soit 4/324 femelles qui ont donné des larves infectées.

Dans une étude semblable, Burgdorfer et al. (1983) ont trouvé une fréquence de transmission transovarienne de 1.1%, soit 2 femelles *I. ricinus* qui ont donné une descendance larvaire infectée sur un total de 180 femelles sauvages gorgées sur des lapins au laboratoire. Magnarelli et al. (1987) ont obtenu quant à eux 7/76 femelles *I. scapularis* dont les larves se sont révélées infectées soit une fréquence de 9.2%, à partir de femelles récoltées gorgées sur des cerfs et des chiens. Chez *I. pacificus*, Lane et Burgdorfer (1987) ont observé une descendance larvaire infectée d'une seule femelle sur 100 femelles sauvages gorgées au laboratoire sur des lapins, soit une fréquence de transmission transovarienne de 1%. Les fréquences de transmission transovarienne sont donc plutôt faibles pour les différentes espèces vectrices de *B. burgdorferi*.

I.2.3. Comparaison des fréquences à partir des oeufs et à partir des larves

Les pourcentages de transmission transovarienne pouvant se définir soit à partir des oeufs soit à partir des larves, cela suppose le passage de l'infection de la femelle aux oeufs puis des oeufs aux larves. En effet, selon le stade de développement choisi, les taux de transmission peuvent être minorés du fait de l'échec du passage de l'infection d'un stade à l'autre en raison notamment d'une absence d'éclosion des oeufs comme décrit par Burgdorfer et al. (1988) chez une femelle *I. scapularis* naturellement infectée et dont les ovocytes étaient massivement infectés.

La plupart des travaux quantifient le phénomène de transmission transovarienne à partir de la descendance larvaire et non des oeufs. Dans notre travail, les fréquences de transmission à partir des oeufs ou à partir des larves, quand il y a eu éclosion, sont évidemment les mêmes car les pontes infectées ont donné chaque fois des larves infectées. La comparaison des fréquences de l'ensemble des 4 récoltes pour lesquelles les oeufs ont été analysés (1.42%) avec les 4 pour lesquelles les larves l'ont été (1.23%), ne montre pas non plus de différence significative ($P=1.00000$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

L'examen des oeufs des femelles de cette récolte nous aurait sans doute apporté d'autres informations, d'autant qu'une ponte sur les 18 issues des femelles infectées systématiquement n'a pas éclos en larves et nous ne saurions dire si elle était infectée ou non. Toutefois, l'analyse de la descendance larvaire d'autres femelles infectées soit systématiquement ($n=16$) soit uniquement au niveau de l'intestin ($n=42$) ainsi que de

18 femelles non infectées de la récolte de Juin 95, n'a pas montré de spirochètes non plus. Il en est de même des larves issues des pontes négatives de 3 autres femelles infectées de la récolte d'Octobre 95, dont 1 avec une infection systémique et 2 avec une infection de l'intestin; l'examen des oeufs pondus par ces femelles n'avait pas révélé de spirochète. Par ailleurs nous avons déjà observé une absence d'éclosion des oeufs infectés dans le cas de la seule ponte infectée de la récolte de Juin 91.

Nous pouvons cependant constater que généralement, les larves issues d'une ponte infectée le sont également pour autant qu'il y ait eu éclosion.

Ainsi donc, si l'étude de la descendance à partir des larves peut minorer le phénomène de transmission transovarienne, notamment en raison de l'absence d'éclosion des oeufs de certaines pontes infectées, elle permet d'apprécier les taux de transmission transovarienne quand il y a continuité du cycle évolutif de la tique, c'est-à-dire éclosion de larves à partir d'oeufs pondus par des femelles infectées.

Signalons que la comparaison des fréquences de transmission d'une récolte à l'autre n'a pas montré de différence significative aussi bien à partir des oeufs qu'à partir des larves.

En étudiant la descendance de 5 femelles *I. scapularis* infectées expérimentalement et ayant pondu des oeufs infectés pour 4 d'entre elles, Burgdorfer et al. (1988) observent également des larves infectées pour toutes les pontes infectées correspondantes.

1.3. Taux de transmission transovarienne

Le taux de transmission transovarienne se définit comme le pourcentage de femelles infectées qui transmettent le spirochète à leur descendance.

Dans la littérature, l'expression "taux de transmission transovarienne" est employée par référence à l'infection de la descendance larvaire.

Dans notre cas, nous avons estimé le phénomène par rapport aux oeufs et aux larves. Les oeufs infectés de la seule ponte positive de Juin 91 n'ayant pas éclos en larves, le taux de transmission transovarienne n'a pas pu être établi pour cette récolte. Par ailleurs, pour les 2 récoltes de Juin 93 et de Mai 94, l'infection des organes n'a été recherchée que pour les seules femelles ayant donné une ponte infectée et par conséquent on ne peut pas parler de taux de transmission transovarienne car nous ignorons le statut de l'infection de l'ensemble des femelles pour lesquelles les oeufs ont été examinés.

En revanche, les taux de transmission transovarienne ont pu être calculés pour les récoltes de Juin 95 et d'Octobre 95 pour lesquelles l'ensemble des femelles ayant donné des pontes ont été disséquées et les organes (ovaire et intestin) examinés en IFD pour la recherche de spirochètes.

En Juin 95, sur un total de 288 femelles gorgées disséquées après oviposition, 60 étaient infectées dont 42 avec une infection limitée à l'intestin et 18 avec une infection de l'ovaire et de l'intestin. Des 18 femelles avec infection généralisée, 18 pontes ont été obtenues et 17 de ces pontes ont éclos en larves; 1/17 ponte a donné des larves infectées. Nous obtenons un taux de transmission transovarienne de 1.66%, 1/60 femelle générant une descendance larvaire infectée.

Quant à la récolte d'Octobre 95, 125 femelles gorgées ont été disséquées après oviposition et l'examen en IFD de l'ovaire et de l'intestin de chacune a permis de dénombrer 4 femelles infectées dont 2 avec une infection limitée à l'intestin et 2 avec une infection de l'ovaire et de l'intestin. Les pontes des 125 femelles disséquées ont été examinées et une seule a donné des oeufs infectés et par la suite des larves infectées après éclosion; il s'agit de la descendance de l'une des 2 femelles avec une infection généralisée. Le taux de transmission transovarienne est donc de 25%, soit 1/4 femelle qui a donné une descendance larvaire infectée.

Pour l'ensemble de ces 2 récoltes, 64 femelles ont présenté des spirochètes soit au niveau de l'ovaire et de l'intestin (n=20), soit uniquement au niveau de l'intestin (n=44) et 2 femelles ont donné une descendance larvaire infectée, soit un taux de transmission transovarienne de 3%.

Des 5 récoltes que nous avons effectuées, une descendance larvaire infectée a été obtenue dans 4 cas, la ponte infectée de la récolte de Juin 1991 n'ayant pas éclos en larves. Nous constatons que les taux de transmission transovarienne, comme la fréquence d'infection, des oeufs sont faibles.

Dans une étude semblable chez *I. ricinus*, Burgdorfer et al. (1983) ont trouvé un taux de transmission transovarienne de 5.1% à partir de l'examen de 180 femelles sauvages gorgées sur des lapins au laboratoire et dont 39 étaient infectées soit au niveau de l'intestin (37/39) soit au niveau de tous les organes (2/39). Les 2 femelles avec infection systémique ont donné chacune une descendance larvaire infectée.

Chez *I. pacificus*, Lane et Burgdorfer (1987) ont observé une descendance larvaire infectée dans le cas d'une femelle sur 3 gorgées et présentant une infection systémique, soit un

taux de transmission transovarienne de 33%. L'examen des larves issues des pontes des 2 autres femelles n'a pas permis de voir de spirochètes.

Chez *I. scapularis*, Magnarelli et al. (1987) trouvent 7/18 femelles infectées ayant passé le spirochète à leur descendance larvaire, soit 38.8%.

Burgdorfer et al. (1988) ont examiné la descendance larvaire de 5 femelles *I. scapularis* infectées expérimentalement et présentant des spirochètes au niveau de différents organes dont l'ovaire. Sur un total de 48 femelles gorgées ayant pondu, ils observent des spirochètes chez 46 de ces femelles dont 9/46 avec une infection systémique et 37/46 avec une infection limitée à l'intestin. Des larves infectées ont été trouvées pour 4/5 femelles avec infection systémique.

II. EFFICACITÉ DE LA TRANSMISSION TRANSOVARIENNE.

II.1. Infection des oeufs

L'infection des oeufs pondus par les tiques femelles sauvages a été examinée pour 4 des 5 récoltes effectuées (Juin 1991, Juin 1993, Mai 1994 et Octobre 1995) et nous avons respectivement observé des taux d'infection de 43.6% (n=55), de 65% (n=60), 64.3% (n=115) et de 100% (n=65); soit un pourcentage total d'infection de 68.4% avec 202/295 oeufs infectés pour l'ensemble des récoltes.

Nous constatons que malgré la faiblesse des fréquences de transmission du spirochète de la femelle à sa ponte, les pourcentages d'infection des oeufs peuvent être par contre très élevés.

Par contre chez *I. scapularis*, Burgdorfer et al. (1988) observent des oeufs infectés à des taux de 7% (n=100), 12% (n=100), 25% (n=100) et 100% (n=100) chez 4/5 femelles infectées systématiquement.

II.2. Infection des larves

Si les taux de transmission transovarienne du spirochète des femelles infectées aux larves sont plutôt faibles, les pourcentages d'infection de la descendance larvaire peuvent être élevés: nous avons ainsi obtenu des taux d'infection chez les larves de 47% (n=36) en Juin 1993, 96.5% (n=135) en Mai 1994, 94% (n=106) en Juin 1995 et 95% (n=104) en Octobre 1995. Ceci corrobore les résultats trouvés par d'autres travaux.

Dans une étude semblable chez *I. ricinus*, Burgdorfer et al. (1983) ont trouvé deux descendance larvaires positives à 100% pour l'une et à 60% pour l'autre, chez des larves issues des pontes de 2 femelles avec infection systémique.

Chez *I. pacificus*, Lane et Burgdorfer (1987) ont observé une descendance larvaire infectée à 100% (n=30) dans le cas d'une femelle sur 3 gorgées et présentant une infection systémique.

Par contre chez *I. scapularis*, Burgdorfer et al. (1988) ont examiné la descendance larvaire de 5 femelles infectées artificiellement et présentant des spirochètes au niveau de différents organes dont l'ovaire et les taux observés sont plus faibles. Des larves infectées ont été trouvées pour 4 des 5 femelles à des taux de 2.5% (n=80), 8% (n=100), 12% (n=100) et 36% (n=80).

Magnarelli et al. (1987), à partir de 43 femelles gorgées *I. scapularis* récoltées sur des cerfs et des chiens, observent eux aussi des taux d'infection faibles avec un total de 44/2297 larves infectées issues de 7 femelles, soit un pourcentage d'infection de 1.9%. Les pourcentages d'infection varient d'une femelle à l'autre: 3.3%, 4.8%, 5.7%, 8.3%, 15%, 25.7% et 27.3%; les taux de 25.7% et 27.3% étant enregistrés pour les descendance de 2 femelles récoltées sur le même chien.

II.3. Passage de l'infection des oeufs aux larves

Nous avons comparé les taux d'infection des oeufs et ceux des larves pour chaque récolte et nous observons une différence significative uniquement pour la récolte de Mai 94: 64% des oeufs (n=115) et 96.5% des larves (n=135) (P=0.00148, pour un seuil de significativité à P<0.05; test exact de Fischer). On constate en effet un pourcentage d'infection plus élevé chez les larves que chez les oeufs pour cette récolte contrairement à celle de Juin 93 et d'Octobre 95 pour lesquelles on ne note pas de différence significative entre l'infection des

oeufs et celle des larves. Le pourcentage total d'infection des oeufs de ces récoltes (74%, n=240) est également inférieur à celui des larves (82.5%, n=275) et de même l'on constate une différence significative ($P=0.02360$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer).

Les facteurs qui pourraient expliquer une infection plus élevée des larves par rapport aux oeufs dont elles sont issues ne nous sont pas connus, nous pouvons néanmoins supposer qu'il y a eu éclosion d'un pourcentage plus important d'oeufs infectés par rapport aux oeufs non infectés ou alors qu'une multiplication des spirochètes a lieu dans les larves. Mais une telle hypothèse reste à confirmer.

Chez *I. scapularis*, Burgdorfer et al. (1988) observent par contre des taux d'infection systématiquement plus faibles chez les larves que chez les oeufs de 4 femelles infectées expérimentalement: 12% (n=100), 25% (n=100), 100% (n=100) et 7% (n=100) pour les oeufs contre respectivement 8% (n=100), 12% (n=100), 40% (n=80) et 2.5% (n=80) pour les larves.

III. EFFICACITÉ DE LA TRANSMISSION TRANSSTADIALE

La transmission transstadiale est nécessaire au maintien de l'infection du spirochète chez les tiques si au cours du cycle aucun repas sanguin infectieux n'est pris tout au long de leur cycle de développement. La persistance de l'infection au sein de la tique dépend donc en partie des mues larvaire et nymphale.

III.1. Passage des larves aux nymphes

Nous avons obtenu respectivement chez les nymphes des taux d'infection de 66.6% (n=18), 84.8% (n=132), 93% (n=60) et 78% (n=120) pour les récoltes de Juin 93, Mai 94, Juin 95 et Octobre 95. Sauf pour la récolte de Juin 93, les pourcentages d'infection sont en général plus élevés chez les larves que chez les nymphes, mais ils restent néanmoins comparables, c'est-à-dire que la différence n'est pas significative.

Pour les récoltes de Juin 93, Mai 94 et Octobre 95, le pourcentage total d'infection des nymphes (80.7%, n=270) est légèrement inférieur à celui des larves (82.5%, n=275) mais la différence n'est pas significative ($P=0.65818$).

Il en est de même de l'ensemble des récoltes pour lesquelles une descendance larvaire puis une descendance nymphale ont été obtenues, c'est-à-dire en tenant compte de celle de

Juin 95; nous arrivons ainsi à un taux d'infection de 85.8% (n=381) chez les larves et de 83% (n=330) chez les nymphes; la différence n'est pas non plus significative (P=0.34941).

Stanck et al. (1986), signalent un taux de transmission transstadiale de 100% des larves aux nymphes issues d'une femelle sauvage *I. ricinus* infectée systématiquement. Chez *I. pacificus*, Lane et Burgdorfer (1987) obtiennent des taux d'infection similaires chez les larves (100%, n=30) et les nymphes (100%, n=13) issues d'une femelle sauvage infectée. Chez *I. scapularis*, Burgdorfer et al. (1988) constatent, quant à eux, une absence de spirochètes chez les nymphes issues de la descendance larvaire infectée de 4 femelles infectées expérimentalement.

III.2. Passage des nymphes aux adultes

Nous avons examiné les tiques adultes mâles et femelles F₁ pour les récoltes de Juin 93, de Mai 94 et de Juin 95. Outre qu'elle s'est faite à l'aide de 2 techniques différentes, l'immunofluorescence et la coloration à l'argent de coupes de tiques incluses dans la paraffine, la mise en évidence de l'infection l'a été aussi bien pour les femelles gorgées que les femelles à jeun. Les taux d'infection ne sont donc pas toujours comparables.

Pour la récolte de Juin 93, l'infection a été établie à partir de coupes à la paraffine colorées à l'argent selon la méthode de Dieterle. Les femelles F₁ ont été examinées après repas sanguin et oviposition et 6/14 femelles (42.8%) ont présenté des spirochètes au niveau des organes; et pour 4 d'entre elles il s'agissait d'une infection systémique. Les tiques mâles F₁ se sont révélées moins infectées avec un taux de 12.5% (n=16).

Les tiques mâles et femelles F₁ de la récolte de Mai 94 ont été examinées d'une part après coloration des coupes à l'argent et d'autre part en immunofluorescence. Parmi les tiques examinées après coloration de Dieterle, 4/20 femelles F₁ à jeun (20%) et 1/30 mâles F₁ (3.3%) se sont révélés infectés. Par contre, aucune des 29 tiques à jeun examinées (15 femelles et 14 mâles) n'était infectée et il en est de même des 70 femelles gorgées analysées après oviposition et dissection qui n'ont montré de spirochètes ni dans l'intestin ni dans l'ovaire. Cependant, l'examen des nymphes dont elles étaient issues a permis de voir encore des spirochètes 11 mois après la mue. Nous observons ainsi une différence dans les taux d'infection établis par les 2 techniques, la coloration à l'argent donnant des taux plus élevés que le test direct d'immunofluorescence; ce qui nous laisserait penser à une modification

antigénique du spirochète lors de son maintien dans la tique uniquement et qui serait responsable éventuellement de la négativité du test d'immunofluorescence à la différence de la technique de Dieterle pour laquelle il ne s'agit que d'une coloration chimique. Par ailleurs, on peut se poser la question de savoir si l'immunofluorescence permet la détection du spirochète dans le cas d'infection faible ce qui pourrait être le cas avec les tiques adultes et compte tenu de l'épaisseur des étalements sur lames, de telles infections pourraient ne pas être détectées. Il faut toutefois signaler qu'avec des nymphes F_1 de la récolte de Juin 93, le taux d'infection établi en immunofluorescence (66%, $n=18$) était plus élevé que celui obtenu par la coloration des coupes à l'argent (20%, $n=10$). Néanmoins, la négativité en immunofluorescence des organes des femelles disséquées après oviposition pose problème car le repas sanguin permet la multiplication des spirochètes, ce qui conduit quelquefois à une dissémination de l'infection (Ribeiro et al., 1987); et dans le cas présent, l'ensemble des oeufs issus de ces femelles se sont également révélés négatifs par le test direct d'immunofluorescence. Nous sommes en droit de nous interroger sur l'infection effective de ces femelles d'autant que le conjugué fluorescent utilisé a permis de détecter des spirochètes dans le cas des larves F_1 et des organes des femelles sauvages de la récolte de Juin 95. L'analyse du serum du lapin ayant servi d'hôte à ces femelles F_1 nous aurait peut-être permis de clarifier cette observation et savoir s'il peut y avoir perte de l'infection chez les tiques suite au repas sanguin.

En Juin 95, les tiques adultes ont été examinées à jeun en immunofluorescence, et sur les 12 femelles et 12 mâles testés seuls 3 mâles ont présenté des spirochètes. Par contre, l'examen de femelles gorgées après oviposition et dissection a montré 9/25 tiques infectées systématiquement; de même 2/7 autres femelles qui n'ont pas pondu avaient une infection de l'intestin pour l'une, et généralisée pour l'autre. Ceci tendrait à confirmer l'hypothèse de la multiplication des spirochètes à la suite du repas sanguin vu le nombre considérablement plus élevé de femelles gorgées infectées par rapport aux femelles à jeun. De même on peut imaginer qu'issues d'une seule femelle sauvage ayant transmis l'infection à sa descendance, ces femelles F_1 peuvent avoir hérité une plus grande capacité à transmettre le spirochète.

Nous constatons que les taux d'infection sont donc plutôt faibles chez les tiques adultes F_1 que chez les nymphes dont elles sont issues. Mais dans une étude similaire, Lane et Burgdorfer (1987) observent eux un taux d'infection de 100% ($n=16$, dont 5 mâles et 11 femelles) chez des adultes F_1 *I. pacificus* issues de nymphes également infectées à 100% ($n=13$). Il s'agissait de la descendance d'une femelle sauvage infectée ayant transmis

l'infection à l'ensemble de sa progéniture à des taux particulièrement élevés, 100%, des larves F₁ aux nymphes F₁ puis des nymphes F₁ aux adultes F₁. Par contre avec des femelles *I. scapularis* infectées expérimentalement, Burgdorfer et al. (1988) obtiennent une transmission transovarienne avec des oeufs puis des larves infectées mais l'infection diminuant d'un stade à l'autre a pratiquement disparu au stade nymphal. Nous observons ainsi que le maintien par voie transstadiale du spirochète transmis par voie transovarienne n'est pas toujours assuré et que s'il peut survenir à des taux même très élevés, il peut tout autant disparaître à l'un ou l'autre des stades évolutifs de la tique. Nous pourrions imaginer que dans certains cas il y aurait sélection d'une souche de spirochète plus susceptible d'être transmise par cette voie, d'où l'obtention de taux de transmissions transovarienne puis transstadiale importants.

Dans la nature, l'infection des nymphes et des adultes à jeun pourraient autant résulter d'une transmission transovarienne du spirochète que d'une infection issue d'un repas sanguin sur un hôte infecté puis maintenue par voie transstadiale. Les prévalences de l'infection chez les nymphes et les adultes à jeun d'*I. ricinus* récoltées dans la nature varient selon les travaux.

Aeschlimann et al. (1986) ont trouvé des prévalences de 5 à 34% chez les nymphes et les adultes dans différentes forêts en Suisse avec un taux moyen d'infection de 20%; tandis que Burgdorfer et al. (1983) trouvent 36.3% de tiques *I. ricinus* adultes (n=201) infectées par le spirochète. En Allemagne, Steinbrink (1994) observent des prévalences de 7.7% (n=5052) chez les nymphes, de 8.7% (n=284) chez les mâles et de 15.5% (n=309) chez les femelles; alors que Matuschka et al. (1992) observent des taux d'infection de 18% chez les nymphes (n=557) et de 15% chez les adultes (n=232). Ces variations des taux d'infection d'une étude à l'autre s'expliquent entre autres raisons par la différence des biotopes servant d'habitat aux tiques; en effet la prévalence de l'infection dépend notamment de la population d'hôtes (Matuschka et al., 1992) ainsi que du degré de contact entre les tiques et les hôtes et donc par conséquent des dimensions du biotope (Rhodain et Perez, 1985).

IV. TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DE *B. BURGDORFERI* DES FEMELLES F₁ AUX LARVES DE DEUXIÈME GÉNÉRATION

Nous avons pu étudier le devenir de l'infection jusqu'à la deuxième génération de tiques pour 3 des 5 récoltes: Juin 93, Mai 94 et Juin 95. La récolte de Juin 93 n'avait pas donné de larves dès la première génération et quant à celle d'Octobre 95, l'examen s'est arrêté au stade des nymphes F₁.

Avec la récolte de Juin 93, les femelles F₁ gorgées ont pondu des oeufs infectés qui n'ont pas éclos en larves. Il s'agissait de 2 femelles infectées systématiquement et dont les pontes respectives avaient des oeufs infectés à 38% (n=65) et à 91% (n=65) et au total nous obtenons un taux d'infection de 65% (n=130) pour les 2 pontes. Nous constatons qu'il est le même pour les oeufs pondus par les femelles sauvages (65%, n=60) (P=1.00002), ce qui indiquerait que l'infection par le spirochète est comparable d'une génération à l'autre.

Si l'on estime la fréquence de transmission transovarienne d'une génération à l'autre pour cette récolte, nous arrivons à 14.3%, 2/14 femelles F₁ ayant passé l'infection aux oeufs. Ni la fréquence de transmission à partir des larves ni le taux de transmission transovarienne ne peuvent être établis dans ce cas puisqu'il n'y a pas eu de descendance larvaire de deuxième génération; néanmoins nous pouvons noter que 2/6 femelles F₁ infectées systématiquement ont transmis le spirochète à leurs oeufs, soit un pourcentage de 33%.

La récolte de Mai 94 a donné lieu à une observation étonnante dans la mesure où malgré le nombre élevé de femelles F₁ examinées, l'infection n'a pu être mise en évidence ni au niveau des organes des femelles gorgées disséquées après oviposition ni au niveau des oeufs pondus par ces femelles. En effet un total de 70 femelles F₁ ont été utilisées et toutes ont donné des pontes. Comme nous l'avons déjà mentionné, il pourrait s'agir d'une cause liée à la technique de détection (problème d'antigénicité, faible nombre des spirochètes). Rappelons que l'examen en IFD de 29 tiques adultes à jeun (15 femelles et 14 mâles) s'était déjà révélé négatif. Cependant l'analyse par la méthode de Dieterle de 50 autres tiques adultes F₁ à jeun (20 femelles et 30 mâles) a permis de visualiser des spirochètes chez 4/20 femelles et 1/30 mâles.

En Juin 95, un total de 25 femelles gorgées ont donné une ponte et 8 de ces pontes issues de femelles infectées systématiquement ont montré des oeufs infectés. Les différents

pourcentages de transmission transovarienne de la génération F_1 à la génération F_2 ont pu être établis pour cette récolte.

On obtient ainsi une fréquence de transmission à partir des oeufs de 32%, soit 8/25 pontes infectées; et à partir des larves la fréquence est de 24% ($n=25$), 2 pontes avec des oeufs infectés n'ayant pas éclos en larves. Quant au taux de transmission transovarienne, il est de 66.6% avec 6/9 femelles F_1 qui ont passé le spirochète à leur descendance larvaire F_2 .

L'infection des oeufs F_2 varie de 70% à 92% d'une ponte à l'autre avec un taux général d'infection de 83.3% ($n=390$) et l'infection des larves F_2 va de 78% à 100% d'une femelle à l'autre avec un pourcentage total d'infection de 92.4% ($n=264$).

Si l'on compare l'infection des oeufs et des larves pour l'ensemble des pontes qui ont éclos, nous observons une différence significative dans les taux d'infection ($P=0.00082$, pour un seuil de significativité à $P<0.05$; test exact de Fischer); notons néanmoins que les oeufs et les larves des différentes pontes avaient des taux d'infection comparables sauf 2 pontes dont les larves étaient infectées à 100% ($n=20$ et $n=65$) et qui présentaient une différence significative par rapport aux oeufs infectés respectivement à 70.76% ($n=65$) et 80% ($n=65$).

Par rapport au pourcentage d'infection des larves F_1 (94.3%, $n=106$), le taux général d'infection des larves F_2 est le même 92.42% ($n=264$) ce qui permet une fois de plus d'observer que l'infection est non seulement maintenue mais également comparable d'une génération à l'autre. Et ceci confirme l'efficacité de la transmission transovarienne.

Les mêmes constatations ont été faites dans une étude similaire par Lane et Burgdorfer (1987) qui ont suivi le cours de l'infection jusqu'à la deuxième génération avec *I. pacificus*. Ils obtiennent des descendance larvaires infectées F_2 chez 4/5 femelles F_1 avec des taux d'infection larvaire de 96.7% ($n=30$), 90% ($n=30$), 96.7% ($n=30$) et 93.3% ($n=30$), soit un pourcentage total d'infection de 94.16% ($n=120$) comparable avec celui de 100% obtenu avec les larves F_1 .

V. TRANSMISSION À L'HÔTE

Il est important que le spirochète maintenu dans la tique uniquement par transmissions transovarienne et transstadiale puisse infecter l'hôte afin que la tique joue elle-même un éventuel rôle de réservoir de l'infection.

Nous avons recherché une transmission du spirochète à l'hôte par les stades immatures (larves et nymphes) nourries sur des souris. Cette recherche s'est faite par xénodiagnose et par mise en culture des biopsies d'oreilles effectuées sur les souris et il s'agissait ainsi de détecter une éventuelle infection disséminée chez l'hôte. Et malgré le nombre important des biopsies d'oreilles examinées ainsi que des tiques de xénodiagnose testées gorgées ou à jeun après mue, il ne nous a pas été possible en utilisant ces 2 techniques de mettre en évidence une infection des souris et donc une transmission du spirochète aux souris par ces larves ou nymphes.

Cependant l'examen du plasma, d'une part de 9 souris infectées par des nymphes F_1 de la récolte d'Octobre 95 et d'autre part de 6 souris infectées par des larves F_2 de la récolte de Juin 95, nous a permis de visualiser des spirochètes à l'examen au microscope à fond noir et nous autorise à affirmer que le "spirochète transovarien" est transmis aux souris; ce qui confirme ainsi les résultats de Stanek et al. (1987) avec des larves et des nymphes F_1 d'*I. ricinus*. S'ils ont utilisé des densités larvaires de 30 à 50 larves pour infester les souris, ils obtiennent par contre une transmission de l'infection chez des souris infestées chacune par une seule nymphe.

Nous constatons que le spirochète n'est détectable dans le plasma qu'à certaines périodes soit au jour J_{13} et J_{18} avec les larves F_2 de même qu'au jour J_{15} avec les nymphes F_1 dans notre travail.

Stanek et al. (1987) observent des spirochètes dans le plasma des souris des jours J_8 (± 2) au J_{22} après le début du repas sanguin des larves F_1 et avec les nymphes F_1 , du jour J_5 au jour J_{21} avec des pics de spirochétemie aux jours J_{14} puis J_{19} ; aucun spirochète n'étant observé au-delà de 4 semaines.

Par ailleurs pour essayer de mettre en évidence une infection localisée chez l'hôte, nous avons réalisé des expériences de transmission du spirochète par cofeeding; ce type de transmission a été récemment mis en évidence pour le spirochète *B. burgdorferi* et la tique *I. ricinus* (Gern et Rais, 1996), sur l'exemple de certains virus comme le virus Thogoto (Jones et al., 1987) ou le virus de l'encéphalite à tiques (Alekseev et Chunikhin, 1990; Labuda et al., 1992) pour lesquels une transmission du pathogène entre tiques saines et tiques infectées a été démontrée.

La transmission par cofeeding consiste en un passage du spirochète des tiques infectées à des tiques saines se nourrissant simultanément sur le même hôte, mais pas forcément sur le même site, en l'absence d'une infection disséminée (Randolph et al., 1996).

Avec ces expériences, nous espérons mettre en évidence une transmission localisée au site de fixation des tiques infectées puis de détecter une éventuelle dissémination de l'infection chez l'hôte. Ni les tiques de xénodiagnose ni les biopsies d'oreilles mises en culture n'ont permis la visualisation du spirochète.

En effet nous avons pratiqué des xénodiagnoses et des biopsies pendant la période de spirochétémie déterminée par les travaux de Stanek et al. (1987) cités précédemment. Et pourtant l'examen des tiques et des biopsies n'a pas présenté de spirochètes; ce qui renforce l'hypothèse des limites des techniques de détection utilisées notamment dans le cas d'infection avec un faible nombre de spirochètes aussi bien chez l'hôte que chez la tique; de même que celui d'une modification antigénique du spirochète.

S'il est avéré que le spirochète est présent dans le sang des hôtes, Burgdorfer (1989; 1991) suggère ainsi qu'il pourrait se comporter comme les spirochètes des fièvres récurrentes, c'est-à-dire présenter dans le sang périphérique des concentrations successivement élevées puis faibles; ce qui explique que l'infection des tiques de xénodiagnose varie de 0 à 100%. Ce type de comportement impliquerait par ailleurs des modifications antigéniques chez le spirochète et ceci a été évoqué également par Lane et Burgdorfer (1987) par rapport à la réactivité des tiques F₁ et F₂ vis-à-vis des anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques de l'espèce (H5332) ou du genre *Borrelia* (H9724). Ces observations tendraient à faire penser que le spirochète transovarien serait particulier ce qui expliquerait notamment la négativité des tests de xénodiagnose effectués pour essayer de mettre en évidence une transmission du spirochète chez les souris.

V.2. Détection des anticorps anti-*B. burgdorferi*

La reconnaissance des antigènes de *B. burgdorferi* par les sera des souris ayant servi d'hôtes aux tiques infectées de nos différentes récoltes au moyen des tests d'immunodot-blot et de western-blot, confirme que ces tiques ont bien transmis le spirochète aux souris comme nous l'avions déjà mis en évidence avec l'observation de spirochètes dans le plasma de certaines de ces souris. Nous pouvons donc estimer que les souris ont été en contact avec des antigènes du spirochète, que celui-ci ait été infectieux ou non. Cependant nous n'avons pas été en mesure d'identifier la souche du spirochète présente dans ces tiques à l'aide de ces techniques.

V.3. Détection et caractérisation du spirochète par PCR

Nous avons tenté de détecter par la technique de PCR le spirochète dans les cultures négatives de tiques gorgées et à jeun dans le but de le caractériser par la suite. Aucune amplification n'ayant été mise en évidence nos tentatives sont restées vaines. Néanmoins à partir de nymphes écrasées sur lame (récolte d'Octobre 1995), une identification du genre *Borrelia* a pu être faite mais pas la caractérisation de l'espèce.

Un travail récent (Rijpkema et Bruinink, 1996) a montré toutefois la présence de 3 génogroupes (*B. afzelii*, *B. garinii* et le groupe VS116) chez des larves à jeun d'*I. ricinus* récoltées dans la nature.

VI. DISCUSSION GÉNÉRALE

VI.1. Les pourcentages d'infection

Le phénomène de transmission transovarienne est ainsi plutôt rare puisque sur un total de 569 femelles gorgées obtenues ayant donné une descendance, seules 4, soit 0.7% ont généré une descendance larvaire infectée. Dans une étude semblable, Patrican (1997) observe l'absence de spirochète chez un total de 14700 larves issues de 48/65 femelles sauvages *I. scapularis* nourries sur un chien et dont l'intestin s'est révélé infecté.

Généralement, les taux d'infection sont plus faibles en passant d'un stade à l'autre c'est-à-dire des oeufs aux larves puis des larves aux nymphes et enfin des nymphes aux adultes; ceci serait dû notamment à la mue car il y a perte de spirochètes au cours de ce phénomène (restriction au niveau de quelques organes comme le synganglion et l'intestin). Mais dans notre travail, ce phénomène s'observe surtout lors du passage de l'infection des nymphes aux adultes. Et si nous ne nous sommes pas intéressé au nombre de spirochètes présents en cas d'infection chez l'un ou l'autre des stades, nous avons néanmoins observé chez les oeufs des infections massives uniquement comparables à ce qui peut être observé au niveau de l'intestin ou de l'ovaire chez les femelles gorgées disséquées après oviposition.

Dans notre travail, le pourcentage de larves infectées est de loin plus élevé que la prévalence observée dans la nature mais ceci s'explique certainement par les différences entre les conditions de l'expérimentation au laboratoire et celles qui prévalent dans le milieu naturel. De plus, les larves récoltées infectées dans la nature sont diluées avec des larves saines issues de femelles non infectées et compte tenu des proportions de femelles non

infectées et de femelles infectées dans la nature, le phénomène de transmission transovarienne exprimé par ces larves infectées ne peut être que minoré.

Nous avons tout de même mis en évidence que le phénomène survient beaucoup plus fréquemment que ne semble l'indiquer les différents travaux et cela est encore plus évident quand on observe la génération F_2 qui donne des fréquences et des taux de transmission transovarienne plus élevés que les femelles sauvages récoltées dans la nature. Ceci d'autant plus que les différents stades évolutifs d'*I. ricinus* n'ont pas pris de repas sanguin infectieux et qu'ils doivent leur infection uniquement à l'efficacité de la transmission transovarienne puis de la transmission transstadiale. Ceci pourrait laisser supposer que le spirochète transmis par voie transovarienne est particulier ou que la femelle qui transmet ainsi donne aussi cette capacité à sa descendance.

En effet dans le cycle naturel les larves, les nymphes et les adultes peuvent autant hériter l'infection d'une transmission transovarienne que s'infecter lors de repas sanguins infectieux sur des hôtes infectés, en particulier sur les hôtes réservoirs dans les foyers endémiques, ce qui semble être le mode principal de circulation du spirochète dans la nature.

VI.2. Le spirochète et la tique

Dans tous les cas de transmission transovarienne que nous avons observés, il s'est toujours agi d'infection systémique chez les femelles, avec infection de l'ovaire. Par contre, si la présence de spirochètes dans l'ovaire est nécessaire à l'infection des oeufs, elle n'est cependant pas suffisante d'où l'observation de pontes non infectées malgré des ovaires massivement infectés.

Burgdorfer et al. (1988) chez *I. scapularis* note la présence massive de spirochètes *B. burgdorferi* dans les ovocytes d'une femelle naturellement infectée et dont la ponte s'est révélée non-infectée; et suite à l'observation de spirochètes dans l'espace entre la tunica propria et l'ovocyte, ils concluent à la non-viabilité de certains oeufs infectés. En effet, cet espace est normalement occupé par la cuticule ce qui n'est pas le cas pour certains oeufs infectés. Ceci aurait pour conséquence que l'absence d'éclosion des oeufs infectés par défaut de maturation ou alors la mort progressive des spirochètes dans les oeufs infectés aboutirait soit à l'absence de transmission transovarienne, soit à des larves faiblement infectées.

En ce qui concerne *Ornithodoros moubata* et *Borrelia duttoni*, Aeschlimann (1958), émet l'hypothèse que seules les borrelies arrivant très tôt au niveau du tissu germinatif de

l'ovaire, c'est-à-dire 4 à 5 jours après le repas sanguin, peuvent infecter les ovocytes en formation; en effet, selon lui; une fois la cuticule formée, il est impossible aux spirochètes de pénétrer dans l'ovocyte. De plus la formation de nids de spirochètes en raison de leur faible mobilité dans le tissu ovarien faciliterait l'infection des ovocytes se trouvant à proximité immédiate de ces nids.

Chez des tiques femelles *I. ricinus* infectées de façon expérimentale respectivement avant ou après repas sanguin, Monin et al. (1989) ont observé que seules les dernières produisaient des oeufs infectés et seulement à la fin de la ponte. Les facteurs qui déterminent l'infection des oeufs ou par la suite celle des larves restent donc à déterminer.

Certains auteurs (Lane, 1992; Schoeler et Lane, 1993) ont étudié l'impact de la présence de *B. burgdorferi* chez les tiques, notamment via une transmission transovarienne chez les tiques filiales, sur différents paramètres tels que le poids, la fertilité ou la fécondité des femelles infectées, ainsi que les mues larvaire et nymphale, par rapport à des tiques saines. Par ailleurs, la réactivité du spirochète transovarien par rapport à des anticorps monoclonaux spécifiques de genre ou d'espèce a été également analysée.

Chez *I. pacificus*, Lane (1992) note que la fertilité mais pas la fécondité des femelles F₁ infectées différait de façon significative de celles des femelles non infectées, par contre pour la génération F₂ aussi bien la fécondité que la fertilité des femelles infectées étaient différentes de celles des tiques saines. Les taux d'infection chez la génération filiale F₂ (larves, nymphes, adultes) étaient légèrement inférieurs par rapport à la génération F₁. La F₃ présentant quant à elle des taux d'infection plus faibles que la F₁ ou la F₂.

Les spirochètes présents dans les tissus de toutes les tiques F₁ et F₂ ainsi que les larves F₃ réagissaient avec l'anticorps monoclonal H9724 spécifique du genre *Borrelia* tandis que seuls quelques spirochètes présents chez certaines tiques F₂ ont réagi avec l'anticorps monoclonal H5332 spécifique de l'espèce *B. burgdorferi*. Néanmoins les spirochètes présents dans d'autres tiques F₂ et notamment des larves F₂ n'ont pas réagi avec l'anticorps monoclonal H5332 spécifique de l'espèce alors qu'ils réagissaient fortement avec des anticorps polyclonaux ainsi qu'avec l'anticorps monoclonal H9724 spécifique du genre *Borrelia*.

Ainsi donc aucune conclusion nette ne peut être tirée de ces travaux d'autant qu'avec la même espèce, *I. pacificus*, une autre étude (Schoeler et Lane, 1993) a montré que la fécondité, la fertilité et le poids moyen des tiques femelles sauvages gorgées avec une infection systémique ou une infection limitée à l'intestin sont comparables. Des résultats

similaires ont été obtenus avec des femelles *I. persulcatus* saines ou infectées par *B. burgdorferi* (Nakao, 1995). De même Lane et Manweiler (1988) observent que des femelles *Ornithodoros coriaceus* saines ou infectées par *Borrelia coriaceae* produisent des quantités équivalentes d'oeufs fertiles.

Dans notre travail nous n'avons pas pris en compte cet aspect des choses, mais nous n'avons pas non plus constaté de phénomènes particuliers outre l'absence d'éclosion des oeufs F_1 infectés de Juin 93, des oeufs F_2 infectés de Juin 93 et de ceux de 2 pontes F_2 infectées de Juin 95. De même nous avons observé une faible fluorescence des spirochètes dans les oeufs de l'une des 2 pontes F_2 infectées issues de la récolte de Juin 1993 et qui n'ont pas éclos en larves. Par ailleurs l'absence d'infection chez les femelles gorgées F_1 de Mai 94 ainsi que de leurs oeufs est plutôt bizarre et il est dommage que nous n'ayons pas pu obtenir le sérum du lapin sur lequel elles se sont nourries car nous aurions pu analyser le statut de l'infection au niveau immunologique ce qui nous aurait permis de confirmer ou d'infirmer une infection de ces tiques. Enfin l'analyse des poids des femelles sauvages gorgées (Juin 91, Juin 93 et Mai 94) ainsi que des femelles F_1 gorgées (Juin 93) n'a pas montré de différence remarquable de poids entre tiques infectées et tiques saines.

VI.3. La transmission à l'hôte

Nous avons pu mettre en évidence une transmission du spirochète transovarien par les nymphes F_1 et les larves F_2 par visualisation du spirochète dans le plasma de souris infestées par ces nymphes ou larves infectées par *B. burgdorferi*; mais le spirochète n'a pu ni être mis en évidence chez les tiques de xénodiagnose ni être isolé à partir des stades évolutifs infectés des générations filiales (oeufs, larves, nymphes ou adultes) ou des biopsies d'oreilles de souris mises en culture.

Lane et Burgdorfer (1987) signalent eux aussi l'échec de toutes leurs tentatives d'isolement du spirochète à partir de tiques adultes *I. pacificus* F_1 à jeun ou gorgées ce qui tend à confirmer la difficulté qu'il y a à isoler le spirochète transmis par voie transovarienne et maintenu au sein de la tique transstadialement. Est-ce suite à des modifications induites par ce mode de transmission et qui aboutiraient par exemple à la perte de la virulence de ces spirochètes ou alors simplement que les techniques mises en oeuvre ou les espèces animales utilisées en laboratoire ne nous permettent pas toujours de mettre en évidence une telle infection aussi bien chez les tiques de xénodiagnose qu'en culture dans le milieu BSK-II. De nombreuses questions restent à résoudre.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Quelle est l'importance de la transmission transovarienne de *Borrelia burgdorferi* chez *Ixodes ricinus* dans l'épidémiologie de la maladie de Lyme ?

Le spirochète "transovarien" est-il transmis à l'hôte?

Oui, puisqu'il a été visualisé dans le plasma de souris infestées par des larves F₂ ou des nymphes F₁ infectées.

Le spirochète est-il particulier? (souche particulière)

Nous serions en droit de le penser dans la mesure où dans notre travail nous n'avons pu ni isoler ni caractériser le spirochète à l'un ou l'autre des stades évolutifs de la tique, bien qu'il ait été détecté aussi bien par immunofluorescence directe que par la coloration à l'argent. Dans le cas d'*I. ricinus*, *B. burgdorferi* a pu être isolé en milieu BSK-II par Stanek et al. (1987) de larves issues d'une femelle infectée mais dans un travail similaire chez *I. pacificus* (Lane et Burgdorfer, 1987), il n'a pas été possible d'isoler le spirochète à partir des tiques et il a été signalé des problèmes au niveau de l'antigénicité en ce qui concerne la réactivité vis-à-vis des anticorps monoclonaux spécifiques du genre *Borrelia* ou de l'espèce *B. burgdorferi*. Néanmoins la mise en évidence de 3 génogroupes, *B. afzelii*, *B. garinii* et le groupe VS116), chez des larves à jeun d'*I. ricinus* récoltées dans la nature (Rijpkema et Bruinink, 1996) tend à démontrer le contraire et selon ces auteurs le phénomène de transmission transovarienne jouerait même un rôle important dans l'établissement de ces groupes génomiques dans une population locale de tiques.

S'agit-il d'une impasse?

Le spirochète transovarien serait-il virulent c'est-à-dire se multiplie-t-il chez la souris pour assurer une parasitémie suffisante pour que les tiques puissent s'infecter sur les animaux infectés.

Une impasse épidémiologique est une situation réalisée lorsqu'un parasite infecte un vertébré incapable de le remettre en circulation, par exemple en ne développant pas une

parasitémie suffisante pour infecter les vecteurs (Rhodain & Perez, 1985). L'absence de tiques xénodiagnose infectées par *B. burgdorferi* tout au long de notre travail pourrait le laisser supposer. Mais les souris de laboratoire utilisées dans notre travail constituent-elles des hôtes appropriés pour l'étude de ce phénomène de transmission transovarienne.

Chez *I. hexagonus*, espèce n'appartenant pas au complexe *I. ricinus*, Toutoungi et al. (1993) ont démontré au laboratoire que des tiques de xénodiagnose s'infectaient sur des animaux infectés suite à une infestation par des larves ayant hérité l'infection par voie transovarienne ainsi que par les nymphes subséquentes. Signalons que pour cette espèce si les taux de transmission transovarienne observés expérimentalement au laboratoire sont plus élevés par rapport à *I. ricinus*, l'infection est plus faible parmi la descendance larvaire ou nymphale (Gern et al., 1991; Toutoungi et al., 1993).

□ En somme le vecteur constitue-t-il lui-même un réservoir?

Très certainement et notre travail le montre puisque sans avoir pris aucun repas de sang infectieux, les tiques ont conservé le spirochète d'un stade à l'autre et à des taux d'infection plutôt élevés. Il est vrai que cela s'est fait sur 2 générations seulement et il serait intéressant de voir ce qui se passerait sur plusieurs générations afin de savoir si le spirochète ainsi maintenu dans la tique demeure infectieux.

Mais compte tenu de l'échec de toutes nos tentatives d'isolement du spirochète à partir des animaux infestés par ces tiques, et notamment des tiques de xénodiagnose, la question se pose de savoir si le spirochète transovarien transmis à l'hôte peut être récupéré par le vecteur pour assurer le cycle de l'infection dans la nature et jouer ainsi entièrement son rôle de réservoir. Cet échec confirmerait la tendance de certains auteurs, notamment à propos de l'espèce *I. scapularis*, à minimiser le rôle de la transmission transovarienne dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme bien que le phénomène soit bien réel et quantitativement important comme le montre notre travail.

S'il est vrai que la transmission transovarienne constitue le seul moyen de maintien de certains germes dans la nature, comme le virus sigma de la drosophile (Rhodain et Perez, 1985; Fine, 1975), certains auteurs signalent cependant une perte de la virulence de germes ainsi transmis sur plusieurs générations. Nous pouvons noter le cas de *Borrelia duttoni* chez *O. moubata*, tique chez laquelle Aeschlimann (1958) observe une perte totale de la virulence du spirochète au bout de la troisième génération.

L'isolement du spirochète "transovarien" et sa caractérisation apporteront peut-être de précieuses informations d'une part pour tenter de répondre aux interrogations concernant sa nature et d'autre part pour étayer ou infirmer les arguments quant à l'importance du rôle joué par la transmission transovarienne dans le cycle naturel de l'infection par *Borrelia burgdorferi*. De nombreuses études restent donc à faire afin de mieux cerner le phénomène de transmission transovarienne et outre la caractérisation du spirochète, il serait intéressant de localiser dans la tique ou dans l'hôte, le siège de l'infection par le spirochète "transovarien".

6. RÉSUMÉ

Les tiques femelles infectées peuvent transmettre des germes via les oeufs à leur descendance larvaire; ce phénomène appelé transmission transovarienne est rare chez les arthropodes.

La transmission transovarienne de *Borrelia burgdorferi*, l'agent étiologique de la borréliose de Lyme, a été décrite chez différentes espèces d'*Ixodes*: *I. pacificus* et *I. scapularis* aux États-Unis, *I. ricinus* et *I. hexagonus* en Europe.

Ce phénomène semble être peu important dans la nature et ainsi seulement 3 à 4% des larves *I. ricinus* à jeun récoltées sur la végétation sont porteuses du spirochète, une telle infection ne pouvant résulter que d'un passage transovarien du spirochète à sa descendance larvaire.

A partir de femelles sauvages récoltées dans la nature et nourries sur des lapins de laboratoire, nous avons suivi l'évolution de l'infection au cours du cycle de vie de la tique *I. ricinus* dans le but de clarifier le rôle des phénomènes de transmissions transovarienne et transstadiale dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme.

Nous avons montré dans ce travail que peu de femelles (1.2%) transmettent le spirochète à leur descendance; mais quand il y a transmission transovarienne, 45% à 100% des oeufs peuvent être infectés. De plus cette infection est maintenue au sein de la tique de stade à stade sans aucun repas sanguin infectieux, c'est-à-dire par voie transstadiale; les taux d'infection variant de 47% à 96%, de 66% à 93% et de 3% à 26% respectivement chez les larves F₁, les nymphes F₁ et les adultes F₁. L'infection est en outre transmise à la deuxième génération à des pourcentages élevés, jusqu'à 83% chez les oeufs F₂ et 92% chez les larves F₂. Par conséquent, les faibles taux d'infection observés chez les iarves à jeun récoltées dans la nature résulteraient de leur dilution avec des larves non infectées issues tout autant de femelles infectées que de femelles non infectées.

Par ailleurs, le spirochète ainsi transmis et maintenu au sein de la tique peut être transmis à l'hôte ce qui met en évidence que la transmission transovarienne constituerait un moyen supplémentaire de maintien de l'infection dans la nature; la tique jouant elle-même un rôle de réservoir pour le spirochète.

Si le phénomène de transmission transovarienne semble donc être plus important que généralement décrit, des études complémentaires restent à entreprendre notamment pour isoler et caractériser le spirochète transovarien dans le but de clarifier un peu plus sa nature et par suite son rôle dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme.

7. BIBLIOGRAPHIE

AESCHLIMANN, A. (1958). Développement embryonnaire d'*Ornithodoros moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borrelia duttoni*. Acta Trop. 15 (1): 15-64.

AESCHLIMANN, A. (1972). *Ixodes ricinus* L. 1758 (Ixodoidea: Ixodidae). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta Trop. 29: 321-340.

AESCHLIMANN, A. (1976). Les tiques, leur biologie et les maladies qu'elles transmettent. Ann. Univ. Neuchâtel.

AESCHLIMANN, A. (1981). The role of hosts and environment in the natural dissemination of ticks. Studies on a Swiss population of *Ixodes ricinus* L., 1758. Rev. Adv. Parasit. (Ed. W. Slusarski). Polish Scientific Publishers, Warszawa. (ICOPA IV): 859-869.

AESCHLIMANN, A., BURGDORFER, W., MATILE, H., PÉTER, O., WYLER, R. (1979). Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L., en Suisse. 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. A 263: 450-456.

AFZELIUS, A. (1910). Erythema migrans. Arch. Derm. Syph. 101: 404

ALEKSEEV, A. N., CHUNIKHIN, S. P. (1990). Exchange of tickborne encephalitis virus between Ixodidae simultaneously feeding on the animals with subthreshold levels of viraemia. Med. Parazitol. Parazit. Bolezni. 2: 48-50.

ANDERSON, J. F. (1988). Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 539: 180-191.

ANDERSON, J. F., JOHNSON, R. C., MAGNARELLI, L. A., HYDE, F. W. (1985). Identification of endemic foci of Lyme disease: Isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks (*Dermacentor variabilis*). J. Clin. Microbiol. 22: 36-38.

ANDERSON, J. F., MAGNARELLI, L. A. (1984). Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. Yale J. Biol. Med. 57: 627-641.

ÅSBRINK, E., HOVMARK, A. (1988). Early and late cutaneous manifestations in *Ixodes*-borne borreliosis (*Erythema migrans* borreliosis, Lyme borreliosis). Ann. N.Y. Acad. Sci. 539: 4-15.

BARANTON, G., POSTIC, D., SAINT GIRONS, I., BOERLIN, P., PIFFARETTI, J-C., ASSOUS, M., GRIMONT, P. A. D. (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 378-379.

BARBOUR, A.G., BURGDORFER, W., HAYES, S. F., PETER, O., AESCHLIMANN, A. (1983). Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. Curr. Microbiol. 8: 123-126.

BARBOUR, A.G., (1984). Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57: 521-525.

BENACH, J., L., BOSLER, E., M., HANRAHAN, J., P., COLEMAN, J., L., HABICHT, G., S., BAST, T., F., CAMERON, D., J., ZIEGLER, J., L., BARBOUR, A., G., BURGDORFER, W., EDELMAN, R., KASLOW, R., A. (1983). Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. N. Engl. J. Med. 308: 740-742.

BENACH, J., L., COLEMAN, J., L., SKINNER, R., A., BOSLER, E., M. (1987). Adult *Ixodes dammini* on rabbits: A hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. J. Infect. Dis. 155: 1300-1306.

BERGER, B., W., CLEMMENSEN, O., J., ACKERMAN, A., B. (1983). Lyme disease is a spirochetosis: a review of the disease and evidence for its cause. *Am J. Dermatopathol.* 5: 111-124.

BERGER, B., W., CLEMMENSEN, O., J., GOTTLIEB, G., J. (1982). Spirochetes in the lesions of erythema chronicum migrans. *Am. J. Dermatophol.* 4: 555-556.

BOSLER, E.M., COLEMAN, J. L., BENACH, J. L., MASSEY, D. A., HANRAHAN, J. P., BURGENDORFER, W., BARBOUR, A. G. (1983). Natural distribution of the *Ixodes dammini* spirochete. *Science* 220: 321-322.

BRUMPT, E. (1949). Précis de parasitologie. Vol. 2. Masson (Paris).

BURGENDORFER, W. (1984). Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Lyme Disease 1st Int. Symp.* Ed. Steere et al.:65-70.

BURGENDORFER, W. (1989a) *Borrelia burgdorferi*: its relationship to tick vectors. *Lyme Borreliosis II, Zbl. Bakt. suppl.* 18: 8-13.

BURGENDORFER, W. (1989b) Vector/host relationships of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 15 (4): 775-787.

BURGENDORFER, W., BARBOUR, AG., HAYES, S F., PETER, O., AESCHLIMANN, A. (1983). Erythema chronicum migrans- a tickborne spirochetosis. *Acta Trop.* 40: 79-83.

BURGENDORFER, W., HAYES, S. F., BENACH, J. L. (1988). Development of *Borrelia burgdorferi* in ixodid tick vectors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 539: 172-179.

BURGENDORFER, W., SCHWAN, T. G. (1991). Lyme borreliosis: a relapsing fever-like disease? *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 77: 17-22.

CANALE-PAROLA, E. (1984). Order spirochaetales. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N.R. Krieg & J.G. Holt, Eds. Vol. 1: 38-39. Williams and Wilkins Press, Baltimore, MD.

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. *Scan. J. Infect. Dis.* 25: 441-448.

CLIFFORD, C. M., SONENSHINE, D. E., KEIRANS, J., KOHLS, G. M. (1973). Systematics of the subfamily Ixodinae (Acarina: Ixodinae). The subgenera of *Ixodes*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 66 (3): 489-500.

DEMAERSCHALCK, I., BEN MESSAOUD, A., DE KESEL, M., HOYOIS, B., LOBET, Y., HOET, P., BIGAIGNON, G., BOLLEN, A., GODFROID, E. (1995). Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33 602-608.

DONNELLY, J., PEIRCE, M., A. (1975). Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 5: 363-367.

DOURNON, E. (1988). La maladie de Lyme. pp.5-69. Edition des Laboratoires Beecham (Beecham Sevigne, Paris).

FINE, P. E. M. (1975). Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266: 173-194.

GARIN, C., BUJADOUX, M. (1922). Paralysie par les tiques. *J. Med. Lyon.* 71: 765-767.

GERN, L., RAIS, O. (1996). Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 33 (1): 189-192.

GERN, L., TOUTOUNGI, L. N., HU, C. M., AESCHLIMANN, A. (1991). *Ixodes (Phleixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med. Vet. Entomol.* 5: 431-435.

GERN, L., ZHU, Z., AESCHLIMANN, A. (1990). Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 56: 89-93.

GRAF, J. F. (1978). Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae), 1ère partie. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 51: 89-97.

GRAY, J. S. (1991). The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev. Med. Vet. Entomol.* 79 (6): 323-333.

HALOUZKA, J., JURICOVA, Z., MATLOVA, L., HUBALEK, Z. (1995). *Borreliae* in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Med. Vet. Entomol.* 9: 205-206.

HANSEN, K., BANGSBORG, J. M., FJORDVANG, H., PEDERSEN, N. S., HINDERSSON, P. (1988). Immunochemical characterization and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60 kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. *Infect. Immun.* 56: 2047-2053.

HAWKES, R., NIDAY, E., GORDON, J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119: 142-147.

HOOGSTRAAL, H., AESCHLIMANN, A. (1982). Tick-host specificity. *Bull. Soc. Entomol.. Suisse.* 55: 5-32.

HU, C., M. (1996). Lyme borreliosis and its tick vector: relationship of protein expression, antigenicity and pathogenicity of *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: spirochaetaceae) sensu lato and *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). Thèse de doctorat ès sciences. Université de Neuchâtel.

HUMAIR, P. F., TURRIAN, N., AESCHLIMANN, A., GERN, L. (1993a). *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol.* 40: 65-70.

HUMAIR, P. F., TURRIAN, N., AESCHLIMANN, A., GERN, L. (1993b). *Ixodes ricinus* immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis. *Folia Parasitol.* 40: 237-242.

JAENSON, T. G. T. (1991). The epidemiology of Lyme Borreliosis. *Parasitology Today* 7 (2): 39-45.

JOHNSON, R. C., SCHMID, G. P., HYDE, F. W., STEIGERWALT, A. G., BRENNER, D. J. (1984). Etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 (4): 496-497.

JONES, L. D., DAVIES, C. R., STEELE, G. M., NUTTALL, P. A. (1987). A novel mode of arbovirus transmission involving non-viraemic host. *Science* 237: 775-777.

KESELER, D. (1986). Mise en évidence de réservoirs de *Borrelia burgdorferi*, agent étiologique de l'Erythema chronicum migrans, et quelques aspects de son épidémiologie. Travail de licence. Université de Neuchâtel.

LABUDA, M. L., JONES, L. D., WILLIAMS, T., DANIELOVA, V., NUTTALL, P. A. (1992). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *J. Med. Entomol.* 30: 295-299.

LAM, T. T., NGUYEN, T-P. K., MONTGOMERY, R. R., KANTOR, F. S., FIKRIG E., FLAVELL, R. A. (1994). Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect. Immun.* 62: 290-298.

LANE, R. S. (1992). Effects of transovarially and transstadially-passed Lyme disease spirochete on the development and reproductive biology of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). First Int. Conf. Tick-Borne Path. Host-Vect. Interf., Uni. Minnesota, St.Paul: 282-289.

LANE, R. S., BURGDORFER, W. (1987). Transovarial and transstadial passage of *Borrelia burgdorferi* in the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37 (1): 188-192.

LANE, R.S., MANWEILER, S. A. (1988). *Borrelia coriaceae* in ticks vector, *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae), with emphasis on transstadial and transovarial infection. *J. Med. Entomol.* 25 (3): 172-179.

LIPSCHÜTZ, B. (1913). Über eine seltene Erythemform (*Erythema chronicum migrans*). Arch. Derm. Syph. 118: 349-356.

MAGNARELLI, L. A., ANDERSON, J. F., FISH, D. (1987). Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). J. Infect. Dis. 156 (1):234-236.

MATUSCHKA, F.R., FISCHER, P., HEILER, M., BLUMCKE, S., SPIELMAN, A. (1992). Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by Lyme disease spirochete by European *Ixodes* ticks. Parasitol. Res. 78 (8): 695-698.

MEJLON, H., A., JAENSON, T., G., T. (1993). Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. Scand. J. Infect. Dis. 25: 449-456.

MBOW, M. L., CHRISTE, M., RUTTI, B., BROSSARD, M. (1994). Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in Balb/c mice developing cutaneous reactions. J. Parasitol. 80 (1): 81-87.

MONIN, R., GERN, L., AESCHLIMANN, A. (1988). A study of the different modes of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*. Lyme Borreliosis II, Zbl. Bakt. Suppl. 18: 14-20.

NAKAO, M. (1995). *Ixodes persulcatus* and Lyme disease spirochete: comparison of development between infected and non-infected ticks. Jpn. J. Zool. 46 (3): 241-247.

NAKAO, M., MIYAMOTO, K. (1992). Negative finding in detection of transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in Japanese ixodid ticks, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus*. Jpn. J. Sanit. Zool. 43 (4): 343-345.

NORRIS, S. J., CARJER, C. J., HOWELL, J. K., BARBOUR, A. G. (1992). Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. Infect. Immun. 60: 4662-4672.

- OLIVER, JR, J. H., OWSLEY, M. R., HUTCHESON, H. J., JAMES, A. M., CHEN, C., IRBY, W. S., DOTSON, E. M., MCLAIN, D. K. (1993). Conspecificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 30 (1): 54-63.
- PATRICAN, L. A. (1997). Absence of Lyme disease spirochetes in larval progeny of naturally infected *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) fed on dogs. *J. Med. Entomol.* 34 (1): 52-55.
- PAVIA S. P. (1994). Overview of the pathogenic spirochetes. *J. Spiroch. Tick-borne Dis.* 1 (1): 3-11.
- PEACOCK, M., BURGDORFER, W., ORMSBEE, R. S. (1971). Rapid fluorescent-antibody conjugation procedure. *Infect. Immun.* 3: 415-420.
- 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 (2): 259-262.
- PIESMAN, J., DONAHUE, J. G., MATHER, T. N., SPIELMAN, A. (1986). Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field-collected larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 23 (2): 219.
- PIESMAN, J., OLIVER, J. R., SINSKY, R. J. (1990). Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42 (4): 352-357.
- PIESMAN, J., SINSKY, R. J. (1988). Ability of *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to acquire, maintain and transmit Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J. Med. Entomol.* 25 (5): 336-339.
- POSTIC, D., ASSOUS, M., V., GRIMONT, P., A., D., 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.

- RANDOLPH, S. E.** (1994). The relative contributions of transovarial and transstadial transmission to the maintenance of tick-borne diseases. in *Lymé Borreliosis*, Axford J.S. and Rees, D.H.E., Ed., 131-134.
- RANDOLPH, S. E., CRAINE, N. G.** (1995). General framework for comparative quantitative studies on transmission of tick-borne diseases using Lyme borreliosis in Europe as an example. *J. Med. Entomol.* 32 (6): 765-777.
- RANDOLPH, S. E., GERN, L., NUTTALL, P. A.** (1996). Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today* 12 (12): 472-479.
- RAWLINGS, J.A.** (1986). Lyme disease in Texas. *Zentbl. Bakt. Hyg., A.* 263: 483-487.
- RHODAIN, F., PEREZ, C.** (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire.. Maloine Ed., pp.458.
- RIBEIRO, J. M. C., 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.
- RIJPKEMA, S. G. T.** (1996). Do Roe deer (*Capreolus capreolus*) spread *Borrelia*-infected *Ixodes ricinus* ticks? *Veterinary Quarterly* 18 suppl. 3: 146-147.
- SAINT GIRONS, I., OLD, I., G., DAVIDSON, B., E.** (1994). Molecular biology of the *Borrelia*, bacteria with linear replicons. *J. Gen. Microbiol.* 140: 1803-1916.
- SCHOELER, G. B., LANE, R. S.** (1993). Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, in the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 30 (1): 80-86.
- STANEK, G., BURGER, I., HIRSCHL, A., WEWALKA, G., RADDA, A.** (1986). *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 263: 29-33.

- STEERE, A. C. (1989). Medical progress: Lyme disease. N. Engl. J. Med. 321: 586-596.
- STEERE, A., C., BRODERICK, T., F., MALAWISTA, S., E. (1978). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. Am. J. Epidemiol. 108: 312-321.
- STEERE, A., C., GRODZICKI, R., L., KORNBLATT, A., N., CRAFT, J., E., BARBOUR, A., G., BURGENDORFER, W., SCHMID, G., P., JOHNSON, E., MALAWISTA, S., E. (1983). The spirochetal etiology of Lyme disease. N. Engl. J. Med. 308: 733-740.
- STEERE, A., C., MALAWISTA, S., E. (1979). Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. Ann. Intern. Med. 91: 730-733.
- 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.
- STEINBRINK, H. (1994). First investigations on occurrence of *Ixodes ricinus* and *Borrelia burgdorferi* in Mecklenburg-Vorpommern. Appl. Parasitol. 35: 155.
- STOSCHECK, C. M. (1990). Quantitation of protein. In: Guide to Protein Purification. Deutscher (Ed.) pp. 50-68.
- TELFORD, S. R. III, MATHER, T. N., MOORE, S. I., WILSON, M. L., SPIELMAN, A. (1988). Incompetence of deer as reservoir hosts of the Lyme disease spirochete. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 105-109.
- TELFORD, S. R. III, SPIELMAN, A. (1989). Competence of a rabbit-finding *Ixodes* (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme disease spirochete. J. Med. Entomol. 26 (2): 118-121.
- TOUTOUNGI, L. N., GERN, L. (1993). Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. Exp. Appl. Acarol. 17 (8): 581-586.

VAN ORDEN, A. E., GREER, P. W. (1977). Modification of Dieterle spirochete stain. *J. Histol.* 1: 51-53.

WEBER, K., PFISTER, H-W. (1994). Clinical management of Lyme borreliosis. *Lancet* 343: 1017-1020.

WILSKA, B., PFISTER, H-W. (1995). Lyme borreliosis research. *Curr. Op. Infect. Dis.* 8: 137-144.

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 (5): 763-766.

ZUNG, J. L., LEWENGRUB, S., RUDZINSKA, M. A., SPIELMAN, A., TELFORD, S. R., PIESMAN, J. (1989). Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. *Can. J. Zool.* 67: 1737-1748.

8. REMERCIEMENTS.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

J'exprime ma gratitude au Professeur André Aeschlimann, pour m'avoir accepté dans son groupe et permis d'entreprendre ce travail de recherche.

Toute ma reconnaissance va également aux membres du jury:

à Madame Claudine Perez-Eid, de l'Institut Pasteur à Paris,

à Monsieur Michel Brossard, du Département Immunologie de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel, pour avoir accepté de juger ce travail.

A Madame Lise Gern, co-directrice de thèse, pour son soutien et sa disponibilité; ses conseils et ses encouragements auront été essentiels à la conclusion de ce travail.

A Monsieur Bruno Betschart, directeur de thèse, pour son encadrement scientifique et toute l'énergie qu'il aura déployée pour l'achèvement de cette thèse.

Un amical merci :

à Olivier Rais "Pitou", pour sa disponibilité et toute l'aide qu'il m'a apportée tout au long de ce travail;

à Raquel Martinez, pour son aide précieuse en PCR.

A tous les collègues des groupes Parasitologie et Immunologie, pour les discussions et les rires: Frédéric Ganapamo, Carmela Di Mito, Suzanne Leuba-Garcia, Pierre-François Humair et tous les autres.

A Martial Renaud, conseiller des étudiants, pour son amabilité.

A Marie-Anne et Pontien Déguénon,

à Pierre Eoné,

à la Famille Maliki,

à la Famille Mabongo, pour les bons moments passés ensemble.

Ce travail de thèse a été effectué avec l'aide du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (no. 32-29964.90).