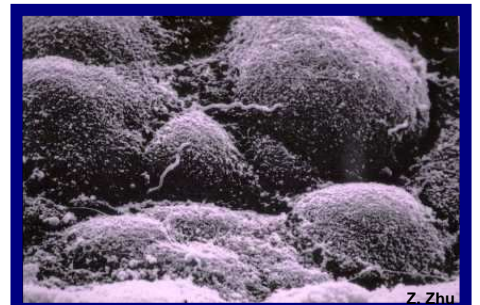
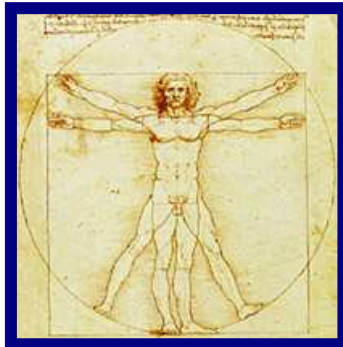


**INCIDENCE D'INFECTION PAR *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU
LATO, AGENT DE LA BORRÉLIOSE DE LYME, APRÈS UNE PIQÛRE DE
TIQUE SUR LE LITTORAL NEUCHÂTELOIS, SUISSE**



**PAR
DELPHINE HÜGLI**

**THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES**

NEUCHÂTEL 2007

INCIDENCE D'INFECTION PAR *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO, AGENT DE
LA BORRÉLIOSE DE LYME, APRÈS UNE PIQÛRE DE TIQUE SUR LE LITTORAL
NEUCHÂTELOIS, SUISSE

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

Par

Delphine Hügli

Acceptée sur proposition du jury :

Dr Lise Gern, directrice de thèse

Prof. Michel Brossard, rapporteur

Prof Benoît Jaulhac, rapporteur

Dr Floriane de Marval, rapporteur

Soutenue le 26 janvier 2007

Université de Neuchâtel 2007

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Incidence d'infection par *Borrelia burgdorferi*
sensu lato, agent de la borréliose de Lyme,
après une piqûre de tique sur le Littoral
neuchâtelois, Suisse

Delphine HUEGLI

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

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

Mmes L. Gern (directrice de thèse), F. de Marval (Genève),
MM. M. Brossard et B. Jaulhac (Strasbourg F)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 15 mars 2007

Le doyen :
T. Ward

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

	I
I	Introduction..... 1
I.1	Historique de la Borréliose de Lyme 1
I.2	Agent étiologique de la Borréliose de Lyme 2
I.2.1	Systématique, définition et génome 2
I.2.2	Répartition géographique de <i>B. burgdorferi</i> sl..... 4
I.2.3	Rôle de certaines protéines membranaires de surface exprimées par <i>B. burgdorferi</i> sl .. 5
I.3	Cycle épidémiologique 6
I.3.1	Le vecteur : la tique 6
I.3.1.1	Systématique 6
I.3.1.2	<i>Ixodes ricinus</i> 7
I.3.1.2.1	Répartition géographique et écologie..... 7
I.3.1.2.2	Cycle évolutif 9
I.3.1.2.3	Hôtes..... 10
I.3.2	Transmission de <i>B. burgdorferi</i> sl à l'hôte 11
I.3.3	Hôtes réservoirs de <i>B. burgdorferi</i> sl 12
I.4	Aspects cliniques de la Borréliose de Lyme.....14
I.4.1	Manifestations cliniques..... 14
I.4.1.1	Stade I : infection précoce localisée 14
I.4.1.2	Stade II : Infection précoce disséminée 15
I.4.1.3	Stade III : Infection disséminée tardive 15
I.4.2	Association entre manifestations cliniques et génoespèces 16
I.5	Réponse immunitaire humorale et diagnostic de la Borréliose de Lyme17
I.5.1	Réponse immunitaire humorale <i>anti-B. burgdorferi</i> sl 17
I.5.2	Diagnostic de la borréliose de Lyme 19
I.5.2.1	Détection d'anticorps..... 22
I.5.2.1.1	ELISA..... 22
I.5.2.1.2	Western blot..... 23
I.5.3	Traitement et prévention 24
I.6	Epidémiologie de la borréliose de Lyme26
I.6.1	Incidence de la Borréliose de Lyme 26
I.6.2	Epidémiologie de la Borréliose de Lyme en Suisse 27
I.7	But de l'étude29
II	Matériel et Méthodes31
II.1	Récolte des sérums et des tiques des participants.....31

II

II.2	Critères d'inclusion dans l'étude	32
II.3	Récolte des tiques libres	34
II.4	Analyse des tiques libres récoltées sur le terrain	35
II.4.1	Immunofluorescence directe, mise en culture et extraction d'ADN	35
II.4.2	Détection et identification des génoespèces de <i>B. burgdorferi</i> sl par Polymerase Chain Reaction (PCR) et Reverse Line Blot (RLB).....	36
II.4.2.1	Polymerase Chain Reaction (PCR)	36
II.4.2.2	Reverse Line blot (RLB).....	37
II.5	Analyse des tiques récoltées sur les participants	38
II.5.1	Extraction de l'ADN par l'Hydroxyde d'Ammonium (NH ₄ OH)	38
II.5.2	Détection et identification des génoespèces de <i>B. burgdorferi</i> sl par PCR et Reverse Line Blot	39
II.5.3	Real Time PCR	39
II.5.4	Détermination du degré de gorgement des tiques récoltées sur les participants	40
II.5.4.1	Récolte des tiques.....	41
II.5.4.2	Infestation des animaux de laboratoire	41
II.5.4.3	Détachement et conservation des tiques.....	41
II.5.4.4	Mesure des tiques et détermination du degré de gorgement (indice scutal).....	42
II.6	Analyse des sérums	43
II.6.1	Dosage immunoenzymatique microparticulaire (MEIA) sur IMx® (Abbott, 2002).....	43
II.6.2	Séroévolution significative et séroconversion.....	44
II.6.3	SDS-Page et Western Blot	44
II.6.3.1	Préparation de l'antigène	45
II.6.3.2	SDS Page et Western Blot.....	45
II.6.3.3	Lecture et interprétation des résultats.....	46
II.6.3.3.1	Immunoblot IgG	46
II.6.3.3.2	Immunoblot IgM	47
II.7	Analyses statistiques	48
III	Résultats	50
III.1	Analyse des tiques libres récoltées sur le terrain	50
III.1.1	Nombre de tiques récoltées	50
III.1.2	Densité des populations de tiques	50
III.1.3	Prévalence d'infection des tiques libres déterminée par IF, culture et PCR	51
III.1.4	Densité de tiques infectées par <i>B. burgdorferi</i> sl	52
III.1.5	Prévalence d'infection des tiques libres par les différentes génoespèces de <i>B. burgdorferi</i> sl déterminée par RLB.....	53

III.2 Etude épidémiologique.....	53
III.2.1 Nombre de participants, âge et sexe.....	53
III.2.2 Sites de piqûre, âge et sexe.....	54
III.2.3 Répartition saisonnière des piqûres de tiques	54
III.2.4 Analyse des tiques récoltées sur les participants	54
III.2.4.1 Nombre de tiques récoltées sur les participants.....	54
III.2.4.2 Prévalence d'infection des tiques récoltées sur les participants par les différentes généoespèces de <i>B. burgdorferi</i> si déterminée par RLB	55
III.2.4.3 Prévalence d'infection des tiques récoltées sur les participants par <i>B. burgdorferi</i> si déterminée par Real Time PCR	56
III.2.4.4 Détermination du degré de gorgement des tiques récoltées sur les participants... 57	
III.2.4.4.1 Analyse par régression non linéaire	57
III.2.4.4.2 Repas sanguin des tiques	57
III.2.4.4.3 Tiques récoltées sur les participants à l'étude épidémiologique	58
III.3 Etude séroépidémiologique	59
III.3.1 Critères d'inclusion à l'étude sérologique.....	59
III.3.2 Séroprévalence chez la population de contrôle et calcul du seuil de séroconversion	60
III.3.3 Séroprévalence chez la population d'étude	61
III.3.3.1 Séroprévalence initiale en IgM et en IgG pour les 3 années de l'étude	61
III.3.4 Séroconversions et séroévolutions significatives asymptomatiques	62
III.3.4.1 Séroconversions et séroévolutions significatives asymptomatiques en IgM	62
III.3.4.2 Séroconversions et séroévolutions significatives asymptomatiques en IgG	64
III.3.5 Séroréversions et séroévolutions négatives significatives.....	65
III.3.6 Troisième prise de sang	66
III.3.7 Evolution sérologique des participants piqués par une tique infectée par <i>B. burgdorferi</i> si	67
III.4 Etude des traitements préventifs.....	69
III.5 Etude clinique : manifestations cliniques et traitement antibiotique.....	69
III.6 Risque d'infection clinique et subclinique.....	71
III.7 Corrélation entre la densité des tiques infectées (CTDi), le nombre de séroévolutions significatives en IgM et le nombre d'érythèmes migrants selon l'année.....	71
IV Discussion	73
IV.1 Densité et prévalence d'infection des tiques libres.....	73
IV.2 Etude épidémiologique.....	75

IV		
IV.3	Etude séroépidémiologique.....	79
IV.4	Etude clinique : Manifestations cliniques	84
V	<i>Conclusion</i>	89
VI	<i>Résumé</i>	90
VII	<i>Remerciements</i>	92
VIII	<i>Bibliographie</i>	94
IX	<i>Tableaux et figures des résultats</i>	114
X	<i>Annexes</i>	140
X.1	Annexe 1: questionnaire de 1 ^{ère} consultation	140
X.2	Annexe 2: questionnaire de 2 ^{ème} consultation	141
X.3	Annexe 3: Reverse Line Blot (RLB)	142
X.4	Annexe 4 : Real Time PCR.....	146
X.5	Annexe 5: SDS Page et Western Blot	147

I Introduction

I.1 Historique de la Borréliose de Lyme

Plusieurs symptômes de la borréliose ou maladie de Lyme, notamment l'acrodermatite chronique atrophiante (ACA), étaient déjà connus en Europe au XIX^{ème} siècle (Pick, 1895 ; Buchwald, 1883), mais la relation entre les signes cliniques et la notion de piqûre de tique n'avait pas encore été établie. Le suédois Afzelius a été le premier, en 1909, à décrire une lésion cutanée annulaire migrante chez une femme piquée par une tique (Afzelius, 1910). En 1913, Lipschütz proposa le terme d'érythème chronique migrant (ECM), car il avait observé un caractère chronique à cette affection. Il soupçonnait déjà un agent infectieux ou une toxine transmis au cours du repas sanguin de la tique (Lipschütz, 1913). La première description de la forme neurologique de la maladie a été faite en 1922 par Garin et Bujadoux en France avec un cas de paralysie à tique, précédé d'un ECM consécutif à une piqûre de tique (Garin et Bujadoux, 1922). Dans les années 1940, l'allemand Bannwarth définit un syndrome, précédé dans quelques cas par un érythème, comprenant des douleurs radiculaires suivies par des méningites chroniques et parfois par des névrites crânielles et périphériques. Ces manifestations ont été regroupées sous le terme de syndrome de Bannwarth (Bannwarth, 1941).

De nombreuses hypothèses ont été émises quant à la nature de l'agent infectieux. L'hypothèse d'une toxine responsable a prévalu pendant de nombreuses années, jusqu'à ce que Höllström, en 1951, démontre l'efficacité de la pénicilline dans le traitement de l'ECM, en se basant sur l'observation de Lennhoff (1948). Ce dernier avait décrit des organismes à l'aspect morphologique de spirochètes (le spirochète responsable de la syphilis était déjà connu), sur des coupes histologiques d'érythèmes.

En 1955, Binder et al (1955) confirment l'hypothèse d'un agent infectieux en inoculant des fragments de biopsie d'ECM à trois volontaires. Ils développèrent un ECM qui disparu en quelques jours après un traitement à la pénicilline.

En 1970, la première description d'ECM associé à une piqûre de tique aux USA (Wisconsin) est faite par Scrimanti (1970). Quelques années plus tard, de nombreux cas d'arthrites inflammatoires, parfois précédées d'érythèmes, surviennent chez des adultes et surtout chez des enfants de la région de la ville de Lyme au sud du Connecticut. Cette épidémie, avec une prévalence de 4.25 cas pour 1000 habitants, a conduit Steere et ses

collaborateurs à mener une enquête épidémiologique (Steere et al, 1977). Comme la moitié des résidents de cette région habitaient des zones boisées, le lien entre ces manifestations rhumatologiques et un agent infectieux transmis par les piqûres de tiques ou d'autres arthropodes hématophages a été établi (Steere et al, 1978). Ils nommèrent cette nouvelle maladie, maladie de Lyme, du nom de la ville où elle fut découverte pour la première fois.

En 1981, le premier cas européen d'arthrite de Lyme a été décrit. Ce cas, précédé d'un ECM, a pu être corrélé avec une piqûre d'arthropode non identifié survenue en 1979 à Payerne/VD (Gerster et al, 1981).

Lors d'une étude menée dans l'Etat de New-York par Burgdorfer sur la transmission de *Rickettsia rickettsii*, agent étiologique de la fièvre boutonneuse des Montagnes Rocheuses, par la tique *Dermacentor variabilis* et *Ixodes scapularis*, Burgdorfer découvrit des spirochètes dans l'intestin d'*Ixodes scapularis* (Burgdorfer et al, 1982). En 1983, Barbour et al isolent et parviennent à cultiver ces spirochètes à partir de tiques *I. ricinus* capturées en Suisse (Barbour et al, 1983). La même année, aux USA, le spirochète est isolé à partir du sang de deux patients atteints d'ECM et de myalgies (Benach et al, 1983) et de liquide céphalorachidien (Steere et al, 1983). Ces mêmes auteurs ont également démontré la nature identique de spirochètes isolés d'une tique et de ceux isolés d'un patient, ce qui conduisit à la confirmation de l'implication d'un spirochète dans la maladie de Lyme.

En 1984, Johnson et al (1984) donne au spirochète le nom de *Borrelia burgdorferi*, en l'honneur de son découvreur, Willy Burgdorfer.

I.2 Agent étiologique de la Borréliose de Lyme

I.2.1 Systématique, définition et génome

Le complexe *B. burgdorferi* sensu lato regroupe les agents pathogènes de la Borréliose de Lyme. Ce sont des bactéries Gram négatives appartenant à la famille des *Spirochaetaceae* (tableau 1). Plus de 20 espèces du genre *Borrelia* ont été identifiées et sont classées en deux catégories principales, *Borrelia* des fièvres récurrentes et *Borrelia* du complexe *B. burgdorferi* sl, différentes de par leurs caractéristiques écologiques et génétiques (Wang et al, 1999a).

B. burgdorferi sl est de forme hélicoïdale, flexible et mesure 20-30 µm de long et 0.2-0.3 µm de diamètre. Sa structure comprend un cylindre protoplasmique entouré d'un espace périplasmique où sont localisés 7-11 flagelles contribuant au mouvement de la cellule et à sa morphologie. Le tout est entouré d'une membrane externe. Elle est microaérophile et se déplace par mouvements de rotation et de translation.

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Maladie
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Cristispira</i>		
				<i>Spirochaeta</i>		
				<i>Borrelia</i>	<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	Borréliose de Lyme
					<i>B. duttoni</i>	Fièvres récurrentes à tiques
					<i>B. turicatae</i>	Fièvres récurrentes à tiques
					<i>B. hermsii</i>	Fièvres récurrentes à tiques
					<i>B. parkeri</i>	Fièvres récurrentes à tiques
					<i>B. hispanica</i>	Fièvres récurrentes à tiques
					<i>B. recurrentis</i>	Fièvres récurrentes à poux
				<i>Treponema</i>	<i>T. pallidum</i>	
					<i>T. endemicum</i>	
					<i>T. pertenue</i>	
					<i>T. carateum</i>	
				<i>Brevinema</i>		
<i>Spironema</i>						

Tableau 1. Classification taxonomique de *B. burgdorferi* sl (Rosa, 1997).

Son génome comprend un chromosome linéaire d'environ 1000 kb et plusieurs plasmides linéaires et circulaires de 15-60 kb (Bergström et al, 2002). Ces plasmides codent pour un grand nombre de protéines membranaires de surface, par exemple la protéine membranaire de surface A (OspA) et la protéine membranaire de surface C (OspC), qui jouent un rôle prédominant dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte et dans l'adhésion et la colonisation dans la tique ou l'hôte (voir chapitre I.2.2).

Le complexe *B. burgdorferi* sl est constitué de 12 génoespèces: *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. turdii*, *B. tanuki*, *B. andersoni*, *B. sinica* et *B. spielmanii* (Baranton et al, 1992; Bergström et al, 2002; Richter et al, 2004 et 2006).

Au sein d'une même génoespèce, il existe une grande hétérogénéité au niveau de certaines protéines membranaires de surface, comme l'OspA et l'OspC. L'OspA présente plusieurs sérotypes qui sont corrélés avec la classification des différentes génoespèces du complexe *B. burgdorferi* sl : le sérotype 1 correspond à *B. burgdorferi* ss, le sérotype 2 à *B. afzelii* et les sérotypes 3 à 8 à *B. garinii* (Wilske et al, 1993b, 1995, 1996; Wang et al, 1999a).

I.2.2 Répartition géographique de *B. burgdorferi* sl

La distribution géographique des génoespèces du complexe *B. burgdorferi* sl varie d'un continent à l'autre :

- En Amérique du Nord, *B. burgdorferi* ss est présente, ainsi que *B. andersoni* et *B. bissettii* (Marconi et al, 1995 ; Postic et al, 1998).
- En Asie, *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* sont trouvées. *B. turdii*, *B. tanukii* et *B. japonica* ont été trouvées uniquement au Japon. *B. garinii* et *B. afzelii* sont les génoespèces les plus fréquemment isolées chez la tique *I. persulcatus* au Japon, en Chine et en Corée. *B. valaisiana* a été détectée chez *I. columnae* au Japon, chez *I. granulatus* en Chine, à Taiwan, en Corée, en Thaïlande et seulement chez *I. nipponensis* en Corée (Miyamoto et Masuzawa, 2002).
- En Afrique du Nord, *B. lusitaniae*, *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* et *B. valaisiana* ont été décrites, *B. lusitaniae* y est l'espèce dominante (Younsi et al, 2001 ; Sarih et al, 2003).
- En Europe, *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii* et *B. lusitaniae* sont présentes avec des prévalences d'infection très variables selon les régions (Rauter et Hartung, 2005, Richter et al, 2006). Les génoespèces les plus fréquemment isolées d'*I. ricinus* sont *B. afzelii* et *B. garinii* (Hubalek et Halouzka, 1997 ; Rauter et Hartung, 2005). *B. burgdorferi* ss est principalement distribuée en Europe occidentale, mais rarement en Europe de l'est (Hubalek et Halouzka, 1997 ; Gern et al, 1999). *B. valaisiana* est la plus abondante génoespèce en Irlande (Kirstein et al, 1997b) et est également trouvée plus faiblement dans les

pays suivants : en Suisse (Péter et al, 1995 ; Humair et al, 1998a ; Jouda et al, 2004a et b), en France (Quessada et al, 2003 ; Ferquel, 2006), en Italie (Cinco et al, 1998), en Angleterre (Kurtenbach et al, 1998a), aux Pays-Bas (Schouls et al, 1999), en Russie (Korenberg et al, 2002). *B. spielmanii* et *B. lusitaniae* sont les génoespèces les plus rares en Europe, mais *B. lusitaniae* est l'espèce dominante au Portugal (De Michelis et al, 2000).

I.2.3 Rôle de certaines protéines membranaires de surface exprimées par *B. burgdorferi* sl

L'OspA est une des protéines membranaires de surface majeures et a été utilisée pour le diagnostic sérologique et le développement de vaccins. Sa masse moléculaire est de 31-34 kDa et les gènes codant pour l'OspA, ainsi que pour l'OspB, sont localisés sur un plasmide linéaire de 49 kb (Wilske et al, 1993b). Comme vu précédemment, l'OspA présente 8 sérotypes corrélés avec la classification des différentes génoespèces du complexe *B. burgdorferi* sl.

L'OspC est la protéine séroréactive prédominante dans les stades précoces de l'infection chez l'homme. Sa masse moléculaire est de 20-25 kDa (Wilske et al, 1995) et les gènes codant sont localisés sur un plasmide circulaire de 25 kb (Wang, 1999a).

Avant le repas sanguin, dans l'intestin des tiques, les spirochètes forment une population plus ou moins homogène qui exprime principalement l'OspA. Pendant le repas sanguin, cette population devient plus hétérogène, certains spirochètes exprimant l'OspA et l'OspC, alors que d'autres expriment un seul type d'Osp et que d'autres n'expriment ni l'OspA, ni l'OspC. Cette hétérogénéité des protéines de surface permet à *Borrelia* de lutter contre le système immunitaire de l'hôte vertébré, une population hétérogène étant moins susceptible d'être éliminée par le système immunitaire (Ohnishi et al, 2001). L'OspA joue un rôle important dans la colonisation du vecteur. L'OspA et probablement l'OspB sont exprimées au niveau de l'intestin moyen de la tique à jeûn et permettent l'adhésion de la bactérie à l'épithélium intestinal (Pal et al, 2000 ; Yang et al, 2004). Le changement dans l'expression de l'OspA pour celle de l'OspC semble important pour la migration de *B. burgdorferi* sl de l'intestin aux glandes salivaires de la tique et donc pour la transmission à l'hôte vertébré (Pal et al, 2004). L'OspC serait également impliquée dans l'établissement initial de l'infection chez l'hôte (Pal et al, 2004 ; Grimm et al, 2004).

I.3 Cycle épidémiologique

I.3.1 Le vecteur : la tique

I.3.1.1 Systématique

Les tiques sont des ectoparasites hématophages obligatoires et peuvent transmettre de nombreux microorganismes pathogènes (bactéries, virus et protozoaires). Elles appartiennent à l'ordre des *Acari*, plus précisément au sous-ordre des *Ixodida* (*Metastigmata*). Ce dernier comprend 3 familles : *Ixodidae*, *Argasidae* et *Nuttalliellidae* (tableau 2).

La famille des *Ixodidae* comprend 13 genres et 694 espèces répandues dans le monde entier (Sonenshine, 1991a). Cette famille, aussi appelée « tiques dures », possède sur la partie dorsale du corps une plaque sclérifiée caractéristique (scutum). Chez les larves, nymphes et femelles, le scutum recouvre la partie antérieure du corps, tandis que chez les mâles, la surface dorsale entière est constituée du scutum. Les 4 espèces principales transmettant *B. burgdorferi* si sont comprises dans le genre *Ixodes* et sont regroupées dans le complexe *I. ricinus*: *I. scapularis* dans la partie nord-est et centre-ouest des Etats-Unis, *I. pacificus* dans l'ouest des Etats-Unis, *I. ricinus* en Europe et *I. persulcatus* en Asie.

La famille des *Argasidae*, ou « tiques molles », du fait qu'elle ne possède pas de scutum, est représentée par 5 genres et 170 espèces. Le capitulum est situé en position ventrale et le corps est de forme ovale.

La famille des *Nuttalliellidae* ne compte qu'une seule espèce, *Nuttalliella namaqua*, trouvée en Afrique.

Phylum	Classe	Sous-classe	Ordre	Sous-ordre	Famille	Lignée	Sous-famille	Genre
Arthropoda	Chelicerata	Arachnida	Acari	Ixodida (Metastigmata)	Argasidae		Argasinae	Argas
							Ornithodorinae	Ornithodoros
								Otobius
								Antricola
								Nothoaspis
					Nuttalliellidae			Nuttalliella
					Ixodidae	Prostriata	Ixodinae	Ixodes
							Metastrata	Amblyomminae
						Haemaphysalinae		Haemaphysalis
						Hyalomminae		Hyalomma
						Rhipicephalinae		Cosmiomma
								Dermacentor
								Rhipicentor
								Anomalohimalaya
Nosomma								
Rhipicephalus								
Boophilus								
Margaropus								

Tableau 2. Classification des tiques selon Hoogstraal (Parola et Raoult, 2001; Sonenshine, 1991a).

Les tiques de la famille des *Ixodidae* jouent un rôle important en médecine vétérinaire et humaine. En Europe, *I. ricinus* peut transmettre plusieurs organismes pathogènes, par exemple la bactérie *B. burgdorferi* s.l (borréliose de Lyme), le protozoaire *Babesia* sp. (babésiose) et le virus de l'encéphalite à tiques.

I.3.1.2 *Ixodes ricinus*

I.3.1.2.1 Répartition géographique et écologie

I. ricinus est le principal vecteur de *B. burgdorferi* s.l et est largement répandue en Europe, de la côte atlantique jusqu'aux chaînes de l'Oural et de l'Islande aux montagnes de l'Atlas en Afrique du Nord (figure 1) (Gern et Humair, 2002).



Figure 1. Répartition géographique d'*I. ricinus* (Gern et Humair, 2002)

En Suisse, elle abonde sur le Plateau et se rencontre également dans le Jura, les Préalpes, les Alpes et au sud des Alpes (Aeschlimann, 1972 ; Jouda et al, 2003). Les biotopes d'*I. ricinus* sont caractérisés par un couvert végétal dense et une litière humide riche en feuilles mortes et elle abonde donc dans les forêts mixtes et les régions boisées (Gern et Humair, 2002). On la rencontre dans les forêts de feuillus riches en sous-bois, les lisières et bordures de chemins forestiers, les hêtraies, les chênaies, mais rarement dans les milieux ouverts où la forte exposition au soleil et au vent ne permet pas sa survie. L'altitude constitue un facteur limitant, *I. ricinus* devient rare au-dessus de 1200m en Suisse et aucune tique n'a été récoltée à plus de 1500m (Aeschlimann, 1987). La distribution géographique est limitée par plusieurs facteurs environnementaux, comme l'humidité relative, la température et la végétation. Ces facteurs jouent un rôle important dans la morphogenèse et l'activité saisonnière des tiques à jeûn. *I. ricinus* est très sensible à la dessiccation et une humidité relative supérieure à 80% est indispensable pour l'activité et la survie des tiques libres, surtout pour les stades immatures (Gern et Humair, 2002). Pour l'activité de quête d'*I. ricinus*, la température de l'air et du sol ne doit pas dépasser 35°C et la température des couches superficielles du sol ne doit pas être

inférieure à 10°C (Gigon, 1985). Randolph et Storey (1999) et Perret et al (2000, 2003b, 2004) ont observé que le déficit de saturation (mesure du pouvoir asséchant de l'air) est un facteur influençant l'activité des tiques. Si le déficit de saturation est trop élevé, on observe une diminution des populations de tiques (Perret et al 2004).

Les tiques attendent à l'affût sur la végétation basse, comme les herbes, fougères, feuilles mortes, le passage d'un hôte. Elles dressent leur première paire de pattes possédant les organes sensoriels nécessaires à la reconnaissance de l'hôte et s'accrochent aux vertébrés de passage grâce à des griffes situées à l'extrémité de leurs pattes. *I. ricinus* est active du printemps à l'automne, généralement de février à novembre, et l'activité saisonnière des trois stades, larve, nymphe et adulte, peut montrer deux pics d'activité, un premier au printemps et un deuxième en automne. Le pic d'activité printanier est habituellement plus élevé que celui d'automne, à l'exception des larves qui démontrent une situation inversée dans certaines régions (Gern et Humair, 2002).

I.3.1.2.2 Cycle évolutif

Le cycle de vie d'*I. ricinus* se déroule en trois stades (cycle triphasique) (figure 2): larve, nymphe et adulte (mâle et femelle). Le repas sanguin est un élément indispensable pour muer au stade suivant et pour la production et la ponte des oeufs chez les femelles. A partir des centaines d'oeufs pondus par la femelle, des larves hexapodes vont éclore et attendre sur le sol le passage d'un hôte vertébré sur lequel elles vont prendre un repas sanguin de 2 à 3 jours. Les larves gorgées se détachent de l'hôte et se laissent tomber au sol où a lieu la mue en nymphes. Quelques semaines plus tard, les nymphes octopodes vont attendre le passage d'un hôte pour se nourrir. Après le repas sanguin de 5-6 jours, elles vont tomber au sol et muer en adultes, femelles ou mâles, quelques semaines plus tard. L'accouplement des adultes se fait sur l'hôte, ou si la population est dense, elle peut se faire sur la végétation (Aeschlimann, 1972). La femelle prend un dernier repas sanguin de 7 à 10 jours pendant lequel elle peut ingérer jusqu'à 150 fois son poids de sang, alors que le mâle prend un repas sanguin frugal et ne se gorge pas. A la fin du repas, la femelle va pondre des centaines d'oeufs sur le sol et mourir. La durée du cycle de vie varie selon les conditions climatiques et la densité des hôtes. Il dure de 2-6 ans, généralement 3 ans, où chaque stade met une année pour passer au suivant (Gray, 1991).

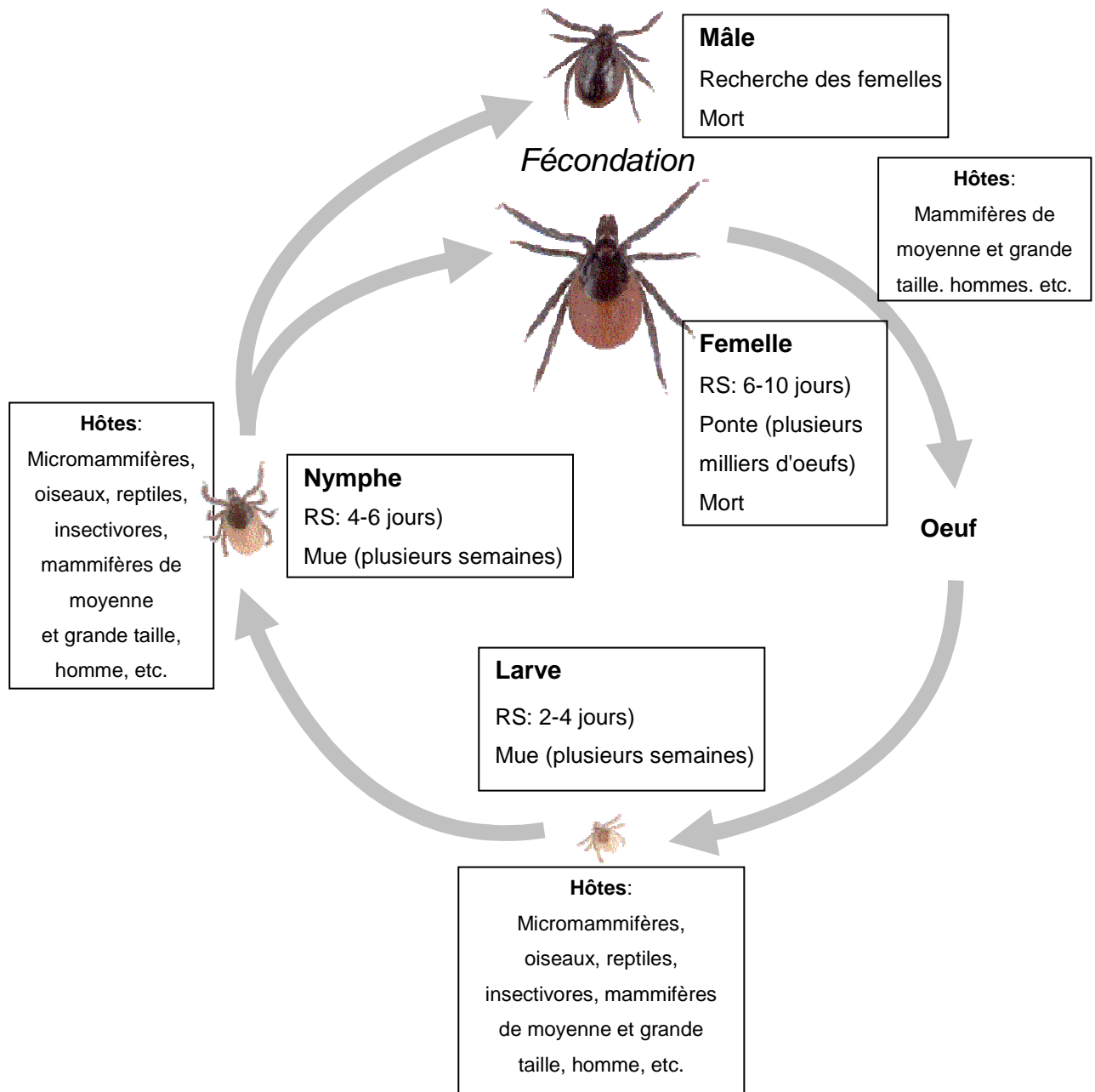


Figure 2 : Cycle de vie de *I. ricinus* (RS= repas de sang) (adapté de Perret, 2003a)

I.3.1.2.3 Hôtes

I. ricinus se gorge sur un large spectre de vertébrés (plus de 300 espèces), comprenant les mammifères, les oiseaux et certains reptiles (Aeschlimann, 1972; Gern et Humair, 2002; Sonenshine, 1991b), et ne présente pas une spécificité parasitaire stricte. Cette espèce est considérée comme télotrope. En général, les stades immatures (larve et

nymphe) se nourrissent sur des hôtes de petite et moyenne taille, comme les oiseaux, les reptiles, les micromammifères et autres petits mammifères (Aeschlimann, 1972 ; Humair et al, 1993a et b ; Humair et al, 1998a ; Olsen et al, 1995 ; Papadopoulos et al, 2002), tandis que les adultes préfèrent les mammifères de moyenne et grande taille (Aeschlimann, 1972 ; Gern et al, 1998 ; Gern et Humair, 2002). Humair et al (1993b) ont démontré que les larves se gorgent 40 fois plus sur des petits mammifères que les nymphes et que celles-ci se nourrissent 6 à 7 fois plus sur les oiseaux que les larves. Ce manque de spécificité pour l'hôte permet donc à *I. ricinus* d'avoir une large distribution et ce sont principalement les facteurs écologiques qui limitent sa présence. Tous les stades peuvent parasiter l'homme, considéré comme un hôte accidentel.

I.3.2 Transmission de *B. burgdorferi* sl à l'hôte

B. burgdorferi sl est transmis à l'hôte lors du repas sanguin via la salive de la tique, mais n'est pas transmis immédiatement après la piqûre de tique. Chez la plupart des tiques non gorgées, les spirochètes se trouvent dans l'intestin. Après environ 1.5-2 jours de repas sanguin, ils traversent la paroi intestinale, passent dans l'hémocoèle et migrent dans les autres organes, dont les glandes salivaires (Gern et al, 1990 ; Kahl et al, 1998; Crippa et al, 2002). Le risque qu'il y ait transmission augmente donc avec la durée du repas sanguin. Cependant, *B. burgdorferi* sl a été détecté dans les alvéoli de glandes salivaires de tiques *I. ricinus* non gorgées récoltées en Suisse, ce qui laisse supposer que *B. burgdorferi* sl peut être transmis à un hôte relativement rapidement après l'attachement (Lebet et Gern, 1994 ; Leuba-Garcia et al, 1994). Kahl et collaborateurs (1998) ont en effet décrit dans leur étude une transmission précoce par *I. ricinus* : 50% des gerbilles ont été infectés par *B. burgdorferi* sl après seulement 16.7 heures d'attachement. Crippa et al (2002) ont démontré que la période de transmission de *B. burgdorferi* sl varie selon les génoespèces: *B. burgdorferi* ss n'est transmis à l'hôte qu'après 48h d'attachement, alors que *B. afzelii* est transmis plus tôt. *I. ricinus* semblerait être un meilleur vecteur pour *B. afzelii* que pour *B. burgdorferi* ss. Ces auteurs ont également montré que *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* sont incapables de pénétrer activement une peau intacte, au contraire des spirochètes responsables des fièvres récurrentes et que l'injection par la piqûre de tique est un élément fondamental pour qu'il puisse y avoir transmission (Crippa et al, 2002).

I.3.3 Hôtes réservoirs de *B. burgdorferi* sl

B. burgdorferi sl a besoin, pour maintenir son cycle et sa circulation dans la nature, d'un vecteur, mais également d'hôtes vertébrés. Ceux-ci sont nécessaires au maintien des populations de tiques. Certains d'entre eux jouent un rôle comme hôtes réservoirs, c'est-à-dire qu'ils sont capables de transmettre l'infection aux tiques. Pour qu'un hôte soit réservoir, il doit s'infecter, héberger un pathogène et agir comme une source d'infection pour d'autres animaux vertébrés par l'intermédiaire d'une tique vectrice. Parmi les 300 espèces de vertébrés répertoriées comme hôtes d'*I. ricinus* (Anderson, 2001 ; Gern et Humair, 2002), moins de 50 d'entre elles peuvent jouer un rôle de réservoir (Gern et al, 1998). Les micromammifères sont le groupe de vertébrés dont le rôle de réservoir a été le plus étudié, du fait de la facilité de capture et de maintien en laboratoire. En Europe, au moins 9 espèces de micromammifères ont démontré leur compétence en tant que réservoir : *Apodemus agrarius* (mulot rayé); *Glis glis* (loir gris), *Microtus agrestis* (campagnol des champs), *Neomys fodiens* (musaraigne aquatique), *Sorex minutus* (musaraigne pygmée), *Sorex araneus* (musaraigne carrelet) et plus particulièrement, *Clethrionomys glareolus* (campagnol roussâtre), *A. sylvaticus* (mulot sylvestre) et *A. flavicollis* (mulot à collier) (Humair et al, 1993b ; 1999 ; Gern et al, 1998 ; Gern et Humair, 2002).

Parmi les hôtes réservoirs de taille moyenne, on trouve *Sciurus vulgaris* (écureuil roux), *S. carolinensis* (écureuil gris), *Erinaceus europaeus* (hérisson européen), *Lepus europaeus* (lièvre européen), *Lepus timidus* (lièvre variable), *Rattus norvegicus* (surmulot), *Rattus rattus* (rat noir) (Gern et al, 1998 ; Humair et al, 1998a). Plusieurs espèces d'oiseaux ont également été identifiées comme hôtes réservoirs : il s'agit principalement de *Turdus merula* (merle noire), *Erithacus rubecula* (rouge-gorge), *T. philomelos* (grive musicienne) et *Phasianus colchicus* (faisan) (Humair et al, 1993a ; Gern et al, 1998, Gern et Humair, 2002 ; Humair et al, 1998b ; Poupon et al, 2006).

De plus, il existe une association spécifique entre hôtes réservoirs et génoespèces. Les hôtes peuvent présenter une association particulière avec une ou plusieurs génoespèces de *B. burgdorferi* sl. Les micromammifères sont les principaux réservoirs pour *B. afzelii* et un sérotype particulier de *B. garinii*, le sérotype 4 (Hu et al, 1997 ; 2001 ; Huegeli et al, 2002). Les écureuils sont les hôtes réservoirs de *B. burgdorferi* ss et de *B. afzelii* (Humair et Gern, 1998a), alors que les oiseaux sont infectés par *B. garinii* (OspA sérotypes 3, 5, 6, 7) et *B. valaisiana* (Humair et al, 1998b ; Kurtenbach, 2002). Poupon et collaborateurs ont

également rapporté que les oiseaux sont des hôtes réservoirs pour *B. lusitaniae* (Poupon et al, 2006). L'association entre hôte et génoespèce est liée au système complément du système immunitaire de l'hôte. Les différentes génoespèces de *B. burgdorferi* si réagissent différemment au système complément de l'hôte et présente soit une sensibilité ou une résistance au système complément. Les souches résistantes au complément ont la capacité de fixer les régulateurs de complément, le facteur H et FHL-1, grâce à deux protéines, Crasp-1 et Crasp-2, empêchant ainsi la formation du complexe d'attaque membranaire. Les souches sensibles au complément sont incapables de fixer ces régulateurs (Kurtenbach et al, 2002). Ainsi, si une tique infectée par *B. afzelii*, génoespèce associée aux rongeurs, se nourrit sur un oiseau (hôte compétent pour *B. garinii*, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae*), cette dernière va perdre son infection, puisque l'oiseau n'est pas un hôte compétent pour *B. afzelii*. Le système complément de l'oiseau va lyser les borrelies dans l'intestin de la tique au moment du repas sanguin (Kurtenbach, 1998b). Par contre, *B. burgdorferi* ss est une génoespèce moins spécialisée et peut infecter les mammifères et les oiseaux (Kurtenbach et al, 2002).

Parmi les hôtes parasités par les tiques, il existe certaines espèces qui ne peuvent être infectées et donc ne peuvent transmettre *Borrelia* aux tiques et sont appelées des hôtes incompetents. C'est le cas des Cervidés (Gern et al, 1998 ; Jaenson et Tälleklint, 1992), dont le sérum a un effet bactéricide sur toutes les génoespèces de *B. burgdorferi* sl. Ce phénomène est lié au système complément de ces hôtes comme mentionné précédemment (Kurtenbach et al, 1998b).

Le « cofeeding » représente une autre voie d'infection pour les tiques : si des tiques non infectées se nourrissent en même temps que des tiques infectées au même endroit sur un hôte compétent ou non compétent, elles peuvent acquérir l'infection (Gern et Rais, 1996).

Les tiques peuvent également être infectées via la transmission transovarienne: les femelles infectées peuvent contaminer leurs œufs. Ce mode de transmission est rare chez *I. ricinus*, mais lorsque ce processus se produit, la prévalence d'infection des larves est très haute (Bellet-Edimo et al, 2005).

I.4 Aspects cliniques de la Borréliose de Lyme

I.4.1 Manifestations cliniques

La borréliose de Lyme est une maladie à évolution lente touchant essentiellement la peau, les articulations, le système nerveux et le coeur. Elle peut évoluer, si elle n'a pas été soignée, en manifestations pathologiques graves et chroniques. Cette maladie est composée de 3 stades: le stade précoce localisé (I), le stade précoce disséminé (II) et le stade tardif (III) (Steere, 2001). L'infection peut passer inaperçue jusqu'au stade II ou III (Steere, 1989).

I.4.1.1 Stade I : infection précoce localisée

L'infection précoce localisée (stade I) est caractérisée par un érythème migrant (EM), une lésion cutanée annulaire rouge très caractéristique, causée par la diffusion locale de *B. burgdorferi* si au niveau de la peau. Il se développe à l'endroit de la piqûre de tique après 3 à 32 jours (en moyenne 7 jours) (Evison et al, 2005b). Le diamètre de cette lésion s'étend lentement en quelques jours, ou quelques semaines, et peut atteindre un diamètre de 3 à plus de 50 cm. Le centre est pâle et la périphérie présente un liséré rouge. L'EM est indolore, cependant il peut être accompagné de brûlures et de démangeaisons, ainsi que de symptômes similaires à ceux de la grippe (céphalée, fièvre, adénopathie, myalgie, arthralgie, nausée). Sans traitement antibiotique, l'EM disparaît spontanément en quelques semaines ou quelques mois. S'il est traité, il régresse en quelques jours (Edlow, 2002). Un signe précoce de dissémination de l'infection est l'apparition de plusieurs EM simultanés, appelé érythèmes multiples (Constantin et al, 2000; Nocton et Steere, 1995; Steere, 2001). Ils sont moins fréquents en Europe (seulement 5-20% des cas) qu'aux USA (Evison et al, 2005b). Trois cas de patients avec des EM multiples ont été observés en Suisse, où l'un deux a présenté plus de 70 lésions (Constantin et al, 2000). Une réaction locale après une piqûre de tique peut apparaître et il est important de la distinguer d'un EM. En général, cette réaction, apparaissant rapidement après la piqûre, mesure rarement plus d'un centimètre et ne s'étend pas. Cependant, le CDC (Centers of Disease Control, USA) préconise un diamètre d'au moins 5 cm pour diagnostiquer un EM dans le cadre d'études épidémiologiques (Evison et al, 2005b).

I.4.1.2 Stade II : Infection précoce disséminée

L'infection précoce disséminée (stade II) survient quelques jours à quelques semaines après la piqûre de tique. Ce stade est caractérisé par des manifestations cutanées (lymphocytome cutané bénin), musculaires (myalgies), rhumatologiques (arthralgies, arthrite de Lyme) et neurologiques (neuroborréliose précoce). Au stade de dissémination précoce, les symptômes surviennent en crises de courte durée (Steere, 1989 ; Rahn et Malawista, 1991).

Le lymphocytome cutané bénin (LBC) est une manifestation rare (1% de toutes les manifestations cliniques), pouvant apparaître simultanément avec un EM ou le suivre. Il peut apparaître quelques jours à quelques mois après la piqûre de tique (Maraspin et al, 2002).

Les manifestations rhumatologiques apparaissent entre deux semaines et 2 ans après la piqûre (en moyenne 4-6 mois), touchant les articulations, les bourses séreuses, les tendons et les os. La plus caractéristique est l'arthrite de Lyme touchant majoritairement le genou et survenant en crises de quelques jours ou quelques semaines. Si cette arthrite n'est pas traitée, elle peut devenir chronique (Evison et al, 2005b).

La neuroborréliose précoce se manifeste des semaines ou des mois après la piqûre de tique et est caractérisée par trois manifestations : méningite, radiculite et paralysie faciale (syndrome de Bannwarth) (Kaiser, 1998). La paralysie faciale est presque exclusivement rencontrée chez les enfants (Evison et al, 2005b).

I.4.1.3 Stade III : Infection disséminée tardive

L'infection disséminée tardive (stade III) survient une à plusieurs années après l'infection initiale et prend une forme chronique.

L'acrodermatite chronique atrophiante (ACA) est le symptôme dermatologique caractéristique du stade tertiaire de la maladie et peut apparaître six mois à huit ans après la piqûre de tique. Cette lésion cutanée persistante, qui peut être localisée au niveau de la rotule, du tibia, du coude, de la main ou du visage, prend une apparence de parchemin violacé suite à l'atrophie de l'épiderme. Une atteinte des articulations voisines peut survenir (Evison et al, 2005b).

L'arthrite chronique de Lyme apparaît si la borréliose n'a pas été traitée antérieurement. Cependant, celle-ci est rare en Europe, au contraire des USA où environ 50% des patients non traités développent une arthrite chronique (Steere et al, 1987).

Le développement d'une neuroborréliose chronique est relativement rare chez les patients traités (Steere, 2001; Hengge et al, 2003). Elle apparaît en général deux à trois ans après la piqûre de tique (Evison et al, 2005b).

I.4.2 Association entre manifestations cliniques et génoespèces

En Europe, la borréliose de Lyme est provoquée principalement par 3 génoespèces: *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* et *B. afzelii*. Il existe une association entre ces génoespèces et certaines manifestations cliniques de la borréliose de Lyme: *B. burgdorferi* ss est préférentiellement retrouvée dans l'arthrite de Lyme, *B. afzelii* dans l'ACA (Assous et al, 1993 ; Van Dam et al, 1993 ; Balmelli et Piffaretti, 1995 ; Parola et Raoult, 2001) et *B. garinii* dans les symptômes neurologiques (Assous et al, 1993 ; Péter et al, 1997 ; Anthonissen et al, 1994 ; Parola et Raoult, 2001). Cependant, ces trois génoespèces pathogènes peuvent être retrouvées au niveau de l'EM (Wang et al, 1999a).

Les isolats provenant de biopsie de peau appartiennent essentiellement à *B. afzelii*, en particulier ceux provenant de patients avec une ACA (Wilske et al, 1993b). Par contre, les isolats provenant de liquide céphalorachidien (LCR) sont hétérogènes, mais avec une prédominance de *B. garinii* sérotypes 4 et 5. En Allemagne, des isollements de LCR ont démontré 58% de *B. garinii*, 28% de *B. afzelii* et 11% de *B. burgdorferi* ss (Busch et al, 1996). De même, une étude sérologique a montré que 64% des cas de neuroborréliose en Suisse sont associés à *B. garinii*, 11% à *B. burgdorferi* ss et 7% à *B. afzelii* (Péter et al, 1997).

De plus, le potentiel pathogène de *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* et *B. spielmanii* a été observé. Une étude sérologique menée en Suisse a révélé 3 cas de patients présentant des symptômes neurologiques associés à *B. valaisiana* (Ryffel et al, 1999). De plus, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, et *B. spielmanii* ont été associées à des manifestations dermatologiques: *B. valaisiana* a été détectée par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans des biopsies de peau de deux patients ayant développé un EM (Rijpkema, 1997). Collares-Pereira et collaborateurs ont décrit le premier isolat humain de *B. lusitaniae* chez une patiente portugaise souffrant de lésions cutanées chroniques (Collares-Pereira et al, 2004). *B. spielmanii*, décrit auparavant comme la souche A14S, aurait également un rôle

pathogène dans la borréliose de Lyme, puisque cette nouvelle génoespèce a été isolée d'un patient hollandais et de deux patients allemands et serait à l'origine de symptômes cutanés (EM et infections cutanées chroniques) (Fingerle et al, 2004 ; Richter et al, 2004 ; Földvári et al, 2005).

Comme vu précédemment, la borréliose de Lyme se présente sous forme d'une infection localisée qui peut ensuite se disséminer. L'invasivité d'une souche au sein d'une génoespèce est sa capacité à provoquer une forme clinique disséminée de la maladie. Cette invasivité est associée avec différents groupes de l'OspC. Le gène *ospC* étant très variable au sein d'une même génoespèce, plusieurs groupes ont pu être définis (Wang et al, 1999b). Baranton et al (2001) ont défini chez *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* et *B. garinii* 69 groupes, parmi lesquels 24 de ces groupes causent des formes invasives de la maladie : 5 groupes chez *B. burgdorferi* ss (Wang et al, 1999b), 8 chez *B. afzelii* et 11 chez *B. garinii* (Baranton et al, 2001 ; Lagal et al, 2003).

I.5 Réponse immunitaire humorale et diagnostic de la Borréliose de Lyme

I.5.1 Réponse immunitaire humorale *anti-B. burgdorferi* sl

B. burgdorferi sl possède de nombreuses protéines antigéniques contre lesquelles est dirigée la réponse immunitaire humorale (tableau 3). En cas d'infection récente, la réponse immunitaire humorale (principalement IgM) est dirigée principalement contre la flagelline (p41) et l'OspC (p21) (Wilske, 1993a). Ces anticorps restent détectables pendant de longues périodes (Aguero-Rosenfeld et al, 1996). Lorsque l'infection se dissémine, des anticorps IgG se forment graduellement contre des antigènes supplémentaires, comme p39 et p58. Au stade chronique de l'infection, la réponse immunitaire (IgG) est dirigée contre un grand nombre de protéines antigéniques, comme p83/100, p58, p43, p39, p30, p21, Osp17 et p14 (Hauser et al, 1997 ; Wilske et al, 1993a). En début d'infection, la réponse immunitaire est moins spécifique à la génoespèce et à la souche de *B. burgdorferi* sl que lorsqu'elle devient chronique (Péter et al, 1997).

Protéine (PM)	Fonction connue ou localisation	Réaction croisée	Remarques
p83/100 (83-100 kDa)	Cylindre protoplasmique ou associée au flagelle ?	Basse	Codée sur le chromosome, relation entre l'antigène et le genre <i>Borrelia</i>
HSP60, HSP75 (60 kDa -75 kDa)	« Heat shock proteins »	Large (spirochètes et autres bactéries)	Codée sur le chromosome
p66 (66 kDa)	Associée à la membrane	Basse	Codée sur le chromosome
p58 (58 kDa)	Inconnue	Basse	Codée sur le chromosome
p41 (41 kDa)	Flagelline	Réaction croisée large par exposition des épitopes conservés	Codée sur le chromosome, région centrale variable avec des régions du gène conservées
BmpA (p39) (39 kDa)	Associée à la membrane	Basse (réaction croisée occasionnelle avec le sérum de patients souffrant de syphilis)	Codée sur le chromosome, variable selon la souche.
OspB (34 kDa -36 kDa)	Protéine membranaire de surface	Equivoque	Codée sur un plasmide, variable selon la souche; ce gène manque chez certaines souches de <i>B. burgdorferi</i>
OspA (31 kDa -33 kDa)	Protéine membranaire de surface	Basse	Codée sur un plasmide, variable selon la souche, expression variable
p30 (30 kDa)	Inconnue	Basse	Souvent confondue avec OspA
OspC (21 kDa -24 kDa)	Protéine membranaire de surface	Basse	Codée sur un plasmide, variable selon la souche, expression variable
p21 (21 kDa)	Inconnue	Basse	Confusion possible avec OspC
Osp17 (p17) (17 kDa)	Protéine membranaire de surface	Basse	variable selon la souche, expression variable

Tableau 3. Protéines immunodominantes de *B. burgdorferi* sl (Wilske et al, 2000).

La plupart des patients présentent une séroconversion dans les 1 à 5 semaines après l'apparition d'un EM et les taux d'IgM atteignent un pic dans les 3 à 6 semaines, pour revenir à la normale dans les 1 à 3 mois (Péter et Zwahlen, 2001). Ils peuvent ne pas être décelés au moment où l'EM apparaît (Evison et al, 2005b), les examens sérologiques étant négatifs dans 50 % des cas d'EM (Rahn et Malawista, 1991). Une réponse IgG apparaît environ à la sixième semaine (Steere, 1989). Les taux en IgG atteignent généralement un pic vers 3-4 mois et diminuent lentement avec un traitement antibiotique. A un stade avancé de la maladie, les taux d'IgG sont élevés chez la plupart des patients, spécialement dans les cas d'arthrites et d'ACA (Herzer et al, 1986 ; Wilske et al, 1984). Si le patient est traité rapidement, il peut ne pas développer d'anticorps.

En cas de neuroborréliose de stade II ou chronique, des anticorps intrathécaux sont produits dans le LCR (Hansen et Lebech, 1991 ; Wilske et al, 1991). Les différentes étapes de la réponse immunitaire humorale sont résumées dans le tableau 4.

Stades	Réponse immunitaire
<p style="text-align: center;">Stade I Infection précoce/localisée</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Réponse IgM apparaissant environ à la troisième semaine après l'infection. <input type="checkbox"/> Suivi par les anticorps IgG apparaissant environ à la sixième semaine après l'infection. <input type="checkbox"/> Souvent séronégative. <input type="checkbox"/> Les IgM ne sont souvent pas détectables en cas d'infection de courte durée (par ex. réinfections).
<p style="text-align: center;">Stade II Infection précoce/disséminée</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Réponse immunitaire similaire au stade I avec les anticorps IgG maintenant détectables majoritairement. <input type="checkbox"/> Production d'anticorps intrathécaux en cas de neuroborréliose.
<p style="text-align: center;">Stade III Infection tardive/persistante</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> En cas d'arthrite et d'acrodermatite, titres élevés d'IgG. <input type="checkbox"/> Les IgM sont habituellement indétectables. <input type="checkbox"/> Production d'anticorps intrathécaux en cas de neuroborréliose chronique.

Tableau 4. Réponse immunitaire humorale dans la borréliose de Lyme (Wilske et al, 2000).

Certains antigènes de *B. burgdorferi* si présentent une réaction croisée avec d'autres espèces du même genre, ainsi qu'avec d'autres genres ou familles de bactéries (tableau 3). La flagelline présente une forte réaction croisée avec la protéine antigénique p39 de *B. hermsii* (fièvres récurrentes à tiques). La flagelline et les « heat shock proteins » de la famille des HSP60 et HSP70 présentent également une forte réaction croisée avec les « heat shock proteins » GroEL et DNaK d'*Escherichia coli* (Bruckbauer et al, 1992). Une réaction croisée peut également être observée avec d'autres spirochètes (*Treponema pallidum*, *Leptospira interrogans*), bactéries (*Rickettsia rickettsii*) ou virus (virus Epstein-Barr, cytomégalovirus, virus de l'immunodéficience humaine) (Magnarelli, 1987 ; Fawcett et al, 1992).

I.5.2 Diagnostic de la borréliose de Lyme

Excepté dans le cas de l'EM, le diagnostic de la borréliose de Lyme, basé sur des symptômes cliniques, requiert généralement une confirmation par un test de diagnostic. En Suisse, Evison et al (2005a) ont adopté les critères de diagnostic établis de l'EUCALB (European Union Concerted Action against Lyme Borreliosis) et du CDC (Center of Disease Control) pour établir des recommandations. Ces critères sont présentés dans le tableau 5 (Evison et al, 2005a).

Tableau 5. Critères de diagnostic de la Borréliose de Lyme (Evison et al, 2005a), adaptés d'EUCALB (Stanek et al, 1996) et du CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 1997).

	Clinique	Temps d'apparition après la piqûre de tique	Indication sérologique (sensibilité)	Autres tests
Erythème migrant	Lésion rouge à violacée de forme arrondie, souvent pâle en son centre, s'étendant dans les jours ou semaines qui suivent. La bordure de la lésion est clairement délimitée et de couleur vive. Un érythème annulaire apparaissant quelques heures après une piqûre de tique correspond à une réaction d'hypersensibilité et ne peut être défini comme érythème migrant. Possibles symptômes accompagnateurs : fièvre, fatigue, maux de tête, raideur de la nuque, arthralgies, myalgies.	Période d'incubation : 3-32 jours (en moyenne 7-10 jours).	Une sérologie n'est pas indiquée, car souvent négative (sensibilité de 40-60 %)	Pas indiqués
Lymphocytome cutané bénin	Nodule ou plaque violacée indolore, au niveau de l'oreille, du mamelon ou du scrotum. Plus fréquent chez les enfants (au niveau de l'oreille).	Environ 2 mois après la piqûre de tique; jusqu'à 10 mois.	Sérologie indiquée (sensibilité de 80%)	Biopsie pour exclure un lymphome cutané dans les cas douteux.
Acrodermatite chronique atrophiante	Lésion cutanée persistante rouge à violacée, située typiquement sur la rotule, le tibia, le coude ou la main. La lésion initiale peut commencer par une tuméfaction. Sans thérapie, la lésion s'atrophie, essentiellement au niveau des saillies osseuses. Il peut y avoir une induration de la peau.	6 mois à plusieurs années après la piqûre de tique.	Sérologie indiquée (sensibilité de 99%)	PCR sur une biopsie cutanée (sensibilité de 70-80%). En général, <i>B. afzelii</i> est trouvé
Arthrite	Crises de courte durée et répétées de tuméfaction des grosses articulations, pouvant évoluer en arthrite chronique. Des arthralgies intermittentes peuvent précéder l'arthrite. Des arthralgies, myalgies et fibromyalgies isolées ne permettent pas de poser le diagnostic.	Environ 2 semaines à 2 ans après la piqûre de tique (en moyenne 4-6 mois).	Sérologie indiquée (sensibilité de 80 % pour l'arthrite migrante et 90% pour l'arthrite chronique). L'isolement de <i>Borrelia</i> provenant d'un autre prélèvement ou la présence d'anticorps dans le LCR peuvent confirmer le diagnostic.	PCR sur le liquide synovial et biopsie synoviale (sensibilité de 80%). En général, <i>B. burgdorferi</i> ss est trouvé.
Cardite	Survenue aiguë d'un bloc atrio-ventriculaire de 2 ^{ème} ou 3 ^{ème} degré ou troubles du rythme cardiaque, souvent associés à une myocardite. Des palpitations, bradycardies, blocs de branche ou une myocardite isolée sont insuffisants pour diagnostiquer une cardite de Lyme.	4 jours à 7 mois après la piqûre de tique (en moyenne 21 jours).	Sérologie indiquée (sensibilité de 80%)	Biopsie du myocarde seulement dans les cas douteux.

Neuroborréiose précoce	Caractérisée par des symptômes comprenant méningite, névrite crânienne et radiculonévrite, isolées ou associées avec des paralysies faciales (syndromes de Bannwarth et de Garin- Bujadoux). Les enfants présentent le plus souvent des paralysies faciales. Des maux de têtes, de la fatigue, une paresthésie (sensation d'engourdissement) ou une raideur de la nuque seule ne permettent pas de poser un diagnostic.	Quelques semaines à quelques mois après une piqûre de tique.	Sérologie indiquée (sensibilité de 80% dans le sérum et de 30 % dans le LCR). La sérologie sur le sérum peut être négative en cas d'invasion précoce du système nerveux central, alors que des anticorps sont déjà détectables dans le liquide céphalorachidien (indice LCR/ indice sérum= formation d'anticorps intrathécaux)	Une pléocytose lymphocytaire du LCR est typique. Dans les cas incertains, d'autres diagnostics doivent être considérés.
Neuroborréiose tardive	Encéphalite persistante, encéphalomyélite, méningo-encéphalite, radiculonévrite.	Après des mois, jusqu'à plusieurs années. En général, 2-3 ans après la piqûre de tique.	Sérologie indiquée sur le sérum et le LCR (sensibilité de 99%). Mise en évidence d'AC intrathécaux obligatoire !	PCR sur le LCR pas indiquée (sensibilité de 10% seulement). En général, <i>B. garinii</i> est trouvé.
Syndrome post-borréiose de Lyme	<p>Pour poser ce diagnostic, tous les critères suivants doivent être remplis :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Borréiose de Lyme antérieure diagnostiquée, cliniquement et sérologiquement. 2. Une antibiothérapie adéquate et complète a été suivie. 3. Pas d'évidence d'infection active. 4. Symptômes persistant, invalidant le patient dans ses activités quotidiennes pendant plus de 6 mois après la fin d'un traitement antibiotique adéquat. Un ou plusieurs des symptômes suivants doivent être présents : fatigue, arthralgie, myalgie, dysfonction cognitive, troubles radiculaires. 5. Les douleurs ont commencé immédiatement après une borréiose de Lyme aiguë, voire jusqu'à 6 mois après. 6. Des déficits d'ordre interne et neurologique ne constituent pas de critères suffisants pour le diagnostic. 7. Exclusion systématique d'autres maladies neurologiques, rhumatismales et internes. 8. Exclusion d'une maladie psychiatrique ou d'une dépendance. 	Les symptômes débutent en général 6 mois après le diagnostic d'une borréiose de Lyme	Sérologie indiquée, en général positive, à l'exception de quelques patients pouvant présenter une séroréversion.	Exclusion à l'examen clinique et biologique d'autres maladies associées à un état de fatigue (y compris par ex. l'hyperthyroïdie) ainsi qu'exclusion anamnestique du syndrome de fatigue chronique.

La détection des anticorps est la méthode la plus utilisée comme test de diagnostic, tandis que la détection directe du pathogène (Microscopie, culture, PCR) est limitée à des cas spéciaux, où les symptômes cliniques et les résultats sérologiques seraient atypiques.

I.5.2.1 Détection d'anticorps

En cas d'infection, la séroconversion (apparition d'anticorps spécifiques) en IgM se développe en 3 à 5 semaines et la séroconversion en IgG en 6 à 8 semaines. Une sérologie positive sans manifestations cliniques associées ne constitue pas un critère suffisant pour décider d'un traitement antibiotique. Une sérologie positive peut être due à un contact antérieur avec *B. burgdorferi* sl et n'atteste pas que l'infection est active.

Un examen sérologique en deux étapes est recommandé (CDC, 1995 ; Wilske et al, 2000). Un premier test sérologique, l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est effectué. Ce test peut conduire à des résultats faussement positifs, dus à d'éventuelles réactions croisées. C'est pourquoi, si les résultats sont positifs ou équivoques, il doit être suivi d'un test de confirmation, le western blot, qui identifie spécifiquement les anticorps dirigés contre les antigènes des différentes géoespèces de *B. burgdorferi* sl.

I.5.2.1.1 ELISA

Il existe sur le marché plusieurs tests ELISA utilisant différents antigènes de *B. burgdorferi* sl. Un choix d'antigènes appropriés peut aider à distinguer une infection récente d'une infection ancienne. Les tests effectués sur des isolats d'antigènes de *B. burgdorferi* sl ont montré que les anticorps dirigés contre la flagelline (p41) et l'OspC sont parmi les premiers à apparaître en début d'infection (Wilske et al, 1993a ; Dressler et al, 1993 ; Wilske et al, 2000). Les tests utilisant des antigènes recombinants sont plus spécifiques que ceux utilisant des lysats de cellules entières, mais ne sont pas forcément plus sensibles. Les fragments internes recombinant de la flagelline présentent une faible homologie avec des espèces apparentées (par ex. *B. hermsii*) ou d'autres spirochètes (*T. pallidum*) et une haute spécificité pour *B. burgdorferi* sl, au contraire de la flagelline complète (Magnarelli, 1992). L'utilisation d'une combinaison du fragment interne recombinant de p41 avec l'OspC a été recommandée pour les dosages de l'IgM (Magnarelli et al, 1996 ; Wilske et al, 1993a). Pour la détection des IgG, l'antigène p100 est celui démontrant la plus haute spécificité et sensibilité dans les stades tardifs de la

maladie et représente donc, avec le fragment interne de p41, les antigènes les plus appropriés (Wilske et al, 1993a).

Récemment, un test ELISA utilisant comme antigène le peptide de synthèse C6 a été développé et utilisé avec succès (Liang et al, 2000 ; Wilske, 2003). C6 dérive d'une région invariable de la séquence de la lipoprotéine VslE, l'IR6. Cette région, très immunogène, est conservée parmi les 3 géoespèces pathogènes de *B. burgdorferi* sl (Liang et al, 2000). L'ELISA C6 présente à ce jour la meilleure sensibilité et permet de détecter les anticorps dirigés contre *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss.

I.5.2.1.2 Western blot

Le Western Blot (WB) peut être réalisé à partir de lysats de cellules entières de *B. burgdorferi* sl séparés par électrophorèse, transférés ensuite sur une membrane de nitrocellulose ou à partir d'antigènes recombinants. L'avantage de l'utilisation d'antigènes recombinants est que l'identification des bandes est plus facile que sur un immunoblot (IB) de lysats de cellules entières, mais ce dernier permet la détection d'un plus grand nombre d'antigènes.

En Europe, la présence de 3 géoespèces pathogènes pour l'homme complique passablement la comparabilité, la standardisation et l'interprétation de ces tests. Aux USA, le CDC recommande les critères d'interprétation suivants : au moins 5 bandes parmi p18, p21 (OspC), p28, p30, p39, p41 (flagelline), p45, p58, p66 et p93 pour les immunoblots IgG (Dressler et al, 1993) et au moins 2 bandes parmi p21(OspC), p39 et p41 pour les immunoblots IgM (Engström et al, 1995). Ces critères ne peuvent pas être appliqués en Europe, car la réponse immunitaire chez les patients européens avec une borréliose de Lyme est dirigée contre un spectre plus étroit de protéines antigéniques que chez les patients américains (Dressler et al, 1994). Ainsi, Hauser et collaborateurs (1997) ont établi des critères d'interprétations pour l'Europe spécifiques à la souche utilisée, avec une spécificité supérieure à 96% : Pour les IB IgG, utilisant la souche PKa2 (*B. burgdorferi* ss), la présence d'au moins une bande parmi p83/100, p58, p56, OspC et p17a ; avec la souche PKo (*B. afzelii*), au moins deux bandes parmi p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p17 et p14 ; avec la souche PBi (*B. garinii*), au moins une bande parmi p83/100, p39, OspC, p21 et p17b. Pour les IB IgM, au moins une bande parmi p39, OspC et p17a ou une forte p41 pour la souche PKa2 (*B. burgdorferi* ss) ; avec la souche PKo (*B. afzelii*), au moins une bande parmi p39, OspC et p17 ou une forte bande de p41 ; avec

la souche PBi (*B. garinii*), au moins une bande parmi p39 et OspC ou une forte bande p41. Dans l'ensemble, un IB utilisant la souche PKo (*B. afzelii*) présente une plus grande sensibilité, suivi par un IB utilisant PBi, puis PKa2 (Hauser et al, 1997).

Une étude sur l'utilisation de l'IB dans le sérodiagnostic de la borréliose de Lyme au niveau européen a été menée par l'EUCALB. Elle avait pour but d'identifier les critères d'interprétation de plusieurs laboratoires européens, afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité des IB européens et de déterminer des critères d'interprétation communs applicables dans tous les laboratoires européens (Robertson et al, 2000b). Les auteurs de cette étude en ont conclu qu'une seule règle d'interprétation n'était pas applicable en Europe, la borréliose de Lyme démontrant de nombreuses variations d'un pays et d'une région à l'autre. Cinq règles ont tout de même été retenues, avec des sensibilités et des spécificités acceptables, formulées à partir de 8 bandes d'importance commune dans les laboratoires participants (tableau 6). L'une ou l'autre de ces règles peut être choisie comme une base d'interprétation, que les laboratoires peuvent adapter selon les variations locales (par ex. hétérogénéité au sein d'une même géoespèce) (Robertson et al, 2000b).

Règle n°	Nb de bandes requises	Protéines antigéniques
1	2 ou 3	p41 (IgM), OspC (IgM), p83/100, p58
2	2 ou 3	p41 (IgM), OspC (IgM), p83/100, p58, p39
3	2 ou 3	p41 (IgM), OspC (IgM), p83/100, p39, p41, p17
4	2 ou 3	p41 (IgM), OspC (IgM), p83/100, p39, p17, OspC
5	2, 3 ou 4	p41 (IgM), OspC (IgM), p83/100, p39, p41, p17, OspC

Tableau 6. Règles d'interprétation européennes d'immunoblots possibles à partir des 8 bandes importantes dans les laboratoires participant à l'étude (Robertson et al, 2000b).

I.5.3 Traitement et prévention

Le traitement de la borréliose de Lyme se fait par antibiotiques. Certains des symptômes régressent spontanément, mais un traitement antibiotique raccourcit non seulement la durée des symptômes, mais surtout empêche l'évolution de la maladie vers les stades tardifs plus graves. Le type d'antibiotique, son mode d'administration (oral ou intraveineux) et la durée du traitement dépendent du stade de la borréliose de Lyme. Un traitement par intraveineuse est indiqué lors de manifestations neurologiques et

cardiaques. La doxycycline, l'amoxicilline et le cefuroxime sont les antibiotiques recommandés (Evison et al, 2005b).

En ce qui concerne la prévention, celle-ci consiste principalement à se protéger des piqûres de tiques. Pour ce faire, le port de pantalons longs et d'habits à manches longues, bien fermés aux poignets et aux chevilles, ainsi que l'utilisation de répulsifs est vivement recommandée. L'inspection minutieuse du corps après une exposition réduit considérablement les risques d'infection, puisque le risque d'être infecté augmente avec le temps d'attachement de la tique.

La question d'une prophylaxie antibiotique après une piqûre de tique a été le sujet de nombreuses études. Dans une étude menée en Suisse romande, les auteurs ont rapporté un faible risque de développer une borréliose de Lyme après une morsure de tique (0.8%) et en concluent qu'une prophylaxie antibiotique n'est pas nécessaire (Nahimana et al, 2004). Dans une population suisse à haut risque, les coureurs d'orientation, le taux de séroconversion était de 0.6% à 2.7% et l'incidence clinique de 0.25% à 1% (Zhioua et al, 1998). De tels résultats ne justifient pas non plus une prise d'antibiotiques en prophylaxie. En Angleterre, une étude a montré un faible risque d'infection dans une zone forestière où le nombre de piqûres est pourtant élevé et les auteurs en arrivent à la même conclusion, un traitement antibiotique prophylactique ne se justifie pas (Robertson et al, 2000a). Cependant, aux USA, plusieurs travaux préconisent une telle prophylaxie, dans le cas où la tique est porteuse de *Borrelia*, si l'incidence d'infection des tiques d'une région dépasse 40%, en cas de grossesse et dans le cas où la tique est restée attachée longtemps (Rahn et Malawista, 1991 ; Wormser, 1996 ; Nadelman et al, 2001). Récemment, la société américaine des maladies infectieuses (Infectious Diseases Society of America) a recommandé une prophylaxie antibiotique par dose unique de doxycycline dans les cas où les critères suivants sont respectés : (a) la tique attachée doit être identifiée comme étant un adulte ou une nymphe d'*I. scapularis* et doit être restée attachée plus de 36 heures ; (b) la prophylaxie doit être administrée au maximum 72 heures après la piqûre de tique ; (c) la prévalence d'infection par *B. burgdorferi* ss des tiques de la région doit être supérieure ou égale à 20% ; (c) la doxycycline ne doit pas être contre-indiquée (elle ne doit pas être administrée chez les femmes enceintes et chez les enfants de moins de 8 ans) (Wormser et al, 2006).

La vaccination constitue une autre voie de prévention. Des vaccins basés sur l'immunisation par l'antigène OspA ont été développés (Gern et al, 1997 ; Nadelman et al, 2001 ; Kamradt, 2002, Evison et al, 2005c). Le mode de fonctionnement de ce vaccin est

intéressant. Pendant le repas sanguin, les anticorps anti-OspA de l'hôte immunisé détruisent les spirochètes dans l'intestin de la tique, bloquant ainsi leur migration vers les glandes salivaires et par conséquent leur transmission à l'hôte. Le premier vaccin, LYMERix™ a été commercialisé aux USA en 1998, mais retiré du marché en 2002, à cause de son rapport coût/efficacité/bénéfice défavorable et de son acceptation insuffisante (Nadelman et al, 2001 ; Kamradt, 2002, Evison et al, 2005c). En Europe, le développement d'un vaccin basé sur l'OspA semblait plus difficile, à cause de la grande hétérogénéité de l'OspA chez les trois génoespèces pathogènes. Un vaccin trivalent composé d'antigènes OspA recombinants provenant de *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss a cependant été développé (Gern et al, 1997). Ce vaccin s'est avéré efficace dans la protection de souris contre les 3 génoespèces pathogènes et compatible avec une utilisation chez l'homme. Un vaccin polyvalent composé de différents OspC a été testé cliniquement en Europe (Kamradt, 2002). Actuellement, aucun vaccin protégeant contre la Borréliose de Lyme chez l'Homme n'est disponible.

I.6 Epidémiologie de la borréliose de Lyme

La Borréliose de Lyme ne se rencontre que dans l'hémisphère nord, sur une grande partie de l'Eurasie et en Amérique du Nord, principalement sur la côte est et ouest, où elle représente la plus importante infection humaine transmise par les tiques.

I.6.1 Incidence de la Borréliose de Lyme

L'incidence de la Borréliose de Lyme varie beaucoup d'un pays à l'autre ou même d'une région à l'autre. Par exemple aux Etats-Unis, l'incidence varie de 0.02 à 1009.9 pour 100'000 habitants par année selon la région (Orloski et al, 2000). En Europe, l'incidence de la borréliose de Lyme a nettement augmenté pendant les deux dernières décennies dans plusieurs pays (Randolph, 2001). L'impact de l'homme sur l'habitat et les hôtes sauvages des tiques, ainsi que les changements climatiques, ont engendré des changements dans la dynamique naturelle des zoonoses transmises par les tiques. De plus, la prise de conscience par rapport aux risques liés aux tiques a conduit à des mesures de surveillance et de protection (Randolph, 2001). La borréliose de Lyme est une maladie à déclaration obligatoire dans peu de pays, ce qui fait que l'incidence est certainement sous-évaluée. Dans la plupart des pays, cette incidence est basée sur la déclaration des laboratoires de diagnostic rapportant les cas de patients avec des sérologies positives et sur les études de séroprévalence (O'Connell et al, 1998).

L'incidence annuelle estimée dans plusieurs pays européens est présentée dans le tableau 7.

Pays	Incidence pour 100'000 habitants	Nb annuel de cas
Royaume-Uni	0.3	200
Irlande	0.6	30
France	16.0	7200
Allemagne	25.0	20000
Suisse	30.4	2000
République Tchèque	39.0	3500
Bulgarie	55.0	3500
Suède (sud)	69.0	7120
Slovénie	120.0	2000
Autriche	130.0	14000

Tableau 7. Incidence annuelle estimée de la borréliose de Lyme dans plusieurs pays européens (basée sur le rapport de l'atelier de l'OMS sur le diagnostic et la surveillance de la borréliose de Lyme, Varsovie, Pologne, 20-22 Juin, 1995)

I.6.2 Epidémiologie de la Borréliose de Lyme en Suisse

B. burgdorferi sl est largement répandue dans tous les biotopes de Suisse favorables à *I. ricinus*, jusqu'à une altitude de 1500 m. (Aeschlimann et al, 1987). La prévalence d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl varie selon les régions, les années et le stade de développement des tiques. La prévalence d'infection chez les nymphes se situe entre 9% et 40%, chez les adultes elle se situe entre 22% et 47% (Jouda et al, 2004a). De plus, cette prévalence d'infection décroît avec l'altitude (Aeschlimann et al, 1987 ; Jouda et al, 2004b). Les trois principales génoespèces pathogènes sont trouvées en Suisse: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss et *B. garinii*.

L'épidémiologie de la borréliose de Lyme en Suisse a fait l'objet de nombreuses études. Une étude épidémiologique menée par Chamot (1989) a estimé l'incidence annuelle minimale de la borréliose de Lyme pour l'ensemble du pays à 1.1 cas pour 100'000 habitants en 1984 et 1.8 cas/100'000 habitants en 1985. Dans le canton de Neuchâtel, l'incidence annuelle était de 7.8 cas/100'000 habitants. Toujours d'après cet auteur, l'EM, apparaissant dans 43% des cas, est la manifestation clinique la plus fréquente. Les

manifestations neurologiques sont relevées dans 38% des cas, les symptômes articulaires dans 24% des cas et l'ACA dans 19% des cas. L'EM est observé à fréquence égale dans les différentes classes d'âge, au contraire des complications neurologiques, cardiaques, articulaires et dermatologiques (ACA) qui touchent davantage les personnes âgées.

Gern et al (1989) ont rapporté une séroprévalence des anticorps IgG anti- *B. burgdorferi* sl de 26.6% chez une population de la région d'Aarberg, située sur le Plateau suisse. Dans une population à risque, les coureurs d'orientation, la séroprévalence en IgG a été estimée à 26%, alors que dans deux autres populations dites « à non risque », cette dernière a été évaluée à 3.9% (population vivant à plus de 1000 m d'altitude) et à 6% (population ne pratiquant pas la course d'orientation) (Fahrer et al, 1991 ; Zhioua et al, 1998). Malgré cette séroprévalence élevée chez ces coureurs d'orientation, l'incidence clinique était seulement de 0.8%. Par contre, le nombre de séroconversions asymptomatiques (8.1%) était plus important (Fahrer et al, 1991). Sept ans plus tard, en 1993, 305 coureurs d'orientation séropositifs ont été réexaminés et 15 cas (4.9%) de borréliose de Lyme sont apparus dans ce groupe pendant cette période. L'incidence clinique annuelle de ce groupe séropositif (0.8%) était la même que celle observée dans l'étude de base de 1986 (Fahrer et al, 1998 ; Zhioua et al, 1998). De Marval (1994), dans son étude portant sur le risque d'entrer en contact avec *B. burgdorferi* sl, a étudié la séroprévalence chez des personnes fortement exposées aux piqûres de tiques, comme les forestiers et les bûcherons, et chez des personnes faiblement exposées, comme des donneurs de sang des cantons du Valais et des Grisons. Le groupe des forestiers a présenté une séroprévalence moyenne en IgG de 25.7% et le groupe des donneurs de sang une séroprévalence de 14.7%. Dans une autre étude, des donneurs de sang présentaient une séroprévalence de 10.7% pour les IgG et de 4.1% pour les IgM (Altpeter et al, 1992). Cependant, la spécificité des tests utilisés dans ces différentes études était moins élevée que celle des tests disponibles aujourd'hui, ce qui a probablement conduit à une surestimation de la séroprévalence (Nahimana et al, 2000 ; Evison et al, 2005a).

Plus récemment, une étude menée en Suisse romande de 1996 à 1997 a évalué l'incidence de la borréliose de Lyme. Elle se chiffre à 9 pour 100'000 habitants en Valais (incidence minimale) et à 95/100'000 habitants dans le canton de Neuchâtel, qui est l'incidence maximale pour la Suisse romande (Nahimana et al, 2000). L'EM représente la manifestation clinique principale, avec 46% des cas, les manifestations cliniques des stades II avec 33% des cas et 21% pour les manifestations du stade III chronique. Cette étude démontre également que les manifestations cliniques des stades II et III sont

distribuées de manière relativement égale entre manifestations neurologiques, articulaires et dermatologiques (Nahimana et al, 2000).

Le risque de développer la borréliose de Lyme après une piqûre de tique en Suisse romande a été estimé par Nahimana et al (2004). Dans un groupe de 376 personnes piquées par une tique, 17 (4.5%) ont développé une séroconversion. La majorité est restée asymptomatique (82.3%, 14/17), alors que 3 d'entre eux (17.7%) ont présenté un EM. Le risque est donc faible (0.8%, 3/376) et une prophylaxie antibiotique après une piqûre de tique ne se justifie pas (Nahimana et al, 2004).

I.7 But de l'étude

L'étude épidémiologique menée en Suisse romande par Nahimana et al (2000) démontre clairement que le canton de Neuchâtel est la région présentant la plus haute incidence de borréliose de Lyme (95 cas/100'000 habitants). De plus, la densité de tiques peut y atteindre plus de 300 tiques/100 m² (Jouda et al, 2004b) et leur taux d'infection par *B. burgdorferi* sl y est élevé (jusqu'à 50% des tiques peuvent être infectées) (Jouda et al, 2004b). De ce fait, et sur la base de l'étude relative au risque d'infection par *B. burgdorferi* sl après une morsure de tique en Suisse romande (Nahimana et al, 2004), nous avons mis sur pied une étude similaire au niveau du Littoral neuchâtelois, où la densité de population de tiques et le taux d'infection par les différentes géoespèces de *B. burgdorferi* sl sont surveillés depuis 1996.

L'objectif est d'évaluer le risque de développer une infection subclinique (séroconversion) et clinique par *B. burgdorferi* sl après une piqûre de tique, en corrélation avec l'abondance des tiques et leur infection par *B. burgdorferi* sl.

Les points suivants ont été étudiés :

- L'incidence des séroconversions asymptomatiques.
- L'incidence d'apparition d'un EM après une piqûre de tique.
- Les corrélations entre la densité des tiques libres infectées et les observations cliniques au niveau de la population du bas du canton de Neuchâtel.

Une connaissance précise des événements épidémiologiques est très importante au niveau clinique. En effet, le risque de développer la borréliose de Lyme pourrait être prédit

à partir de la densité de tiques infectées dans les zones très fréquentées du Littoral neuchâtelois.

En se basant sur les observations cliniques et la densité des tiques infectées au cours de l'année, une recommandation pour une prophylaxie antibiotique pourrait être envisagée.

II Matériel et Méthodes

II.1 Récolte des sérums et des tiques des participants

Nous avons informé par courrier tous les médecins concernés, c'est-à-dire les médecins de premier recours (médecins généralistes, internistes et pédiatres), les dermatologues et les polycliniques, ainsi que les pharmaciens du Littoral neuchâtelois. Le Littoral neuchâtelois comprend deux districts, le district de Neuchâtel et le district de Boudry, qui à eux deux représentent une superficie d'environ 207 km² et totalisent une population de 86'000 habitants (figure 3).



Figure 3. Communes faisant partie du Littoral neuchâtelois
(<http://www.neuchatel tourisme.ch/pictures/maps/region1.html>)

La population du bas du canton de Neuchâtel a été invitée par voie de presse (journaux, radio), ainsi que par la pose d'affichettes dans les forêts du Littoral neuchâtelois, à se rendre chez un médecin ou une polyclinique de la ville en cas de piqûre de tique et d'amener, si possible, la tique (conservée dans un récipient contenant un coton imbibé d'eau).

Lors de la consultation, un questionnaire est rempli par le participant (annexe 1), renseignant sur la date de consultation, la date de la piqûre, la localisation géographique du patient au moment de la piqûre, l'endroit de la piqûre sur le corps, par qui la tique a été extraite et si un traitement antibiotique a été prescrit lors de cette visite. Une 1^{ère} prise de sang est effectuée. Le patient doit surveiller attentivement l'endroit de la piqûre pendant 3

à 4 semaines pour voir l'apparition possible d'un érythème migrant ou de toute autre manifestation clinique compatible avec une borréliose de Lyme. Huit semaines plus tard, l'examen clinique est répété, un 2^{ème} questionnaire rempli (annexe 2) renseignant en plus sur le développement éventuel d'une manifestation clinique ou une nouvelle piqûre de tique et une seconde prise de sang est effectuée. Le 1^{er} échantillon sanguin permet de déterminer le statut sérologique de la personne au moment de la piqûre, ce qui permettra, par comparaison sérologique avec la 2^{ème} prise, de déterminer s'il y a eu séroconversion ou séroévolution. Pour les participants présentant une séroévolution ou une séroconversion, ainsi qu'en cas de résultats sérologiques douteux, une troisième prise de sang a été demandée pour confirmer l'évolution.

Cette étude a été approuvée par le comité intercantonal d'éthique (Jura, Fribourg, Neuchâtel).

II.2 Critères d'inclusion dans l'étude

Cette étude a été divisée en trois parties :

- I. *Etude épidémiologique* : comprend toutes les données concernant les participants à la 1^{ère} consultation (nombre de participants, âge, sexe, site anatomique de piqûre, répartition saisonnière des piqûres de tiques) et les données concernant les tiques récoltées sur ceux-ci.
- II. *Etude des traitements antibiotiques préventifs* : comprend les participants chez qui un traitement antibiotique préventif a été administré après la piqûre de tique et chez qui un seul échantillon de sang a été prélevé.
- III. *Etude séroépidémiologique* : Pour être inclus dans l'étude séroépidémiologique, un participant doit répondre aux critères suivants : (a) La piqûre doit avoir eu lieu sur le Littoral neuchâtelois ; (b) deux sérums doivent avoir été prélevés ; (c) un délai maximum de 9 jours entre la piqûre de tique et la première prise de sang est souhaité ; (d) un délai maximum de 12 semaines entre les deux prises de sang est demandé ; (e) le participant ne doit pas avoir reçu de traitement antibiotique ; (f) si le participant a signalé une nouvelle piqûre de tique dans l'intervalle entre les deux prises de sang, il ne peut être inclus, car le risque d'être infecté est doublé ; (g) un participant ne doit pas avoir développé de manifestations cliniques suite à la piqûre de tique.

IV. *Etude clinique* : comprend les participants chez qui deux échantillons de sang ont été prélevés, qui ont développé une manifestation clinique et/ou reçu un traitement antibiotique. Ces participants sont exclus de l'étude séroépidémiologique.

La figure 4 résume les critères d'inclusion dans les différentes parties de l'étude.

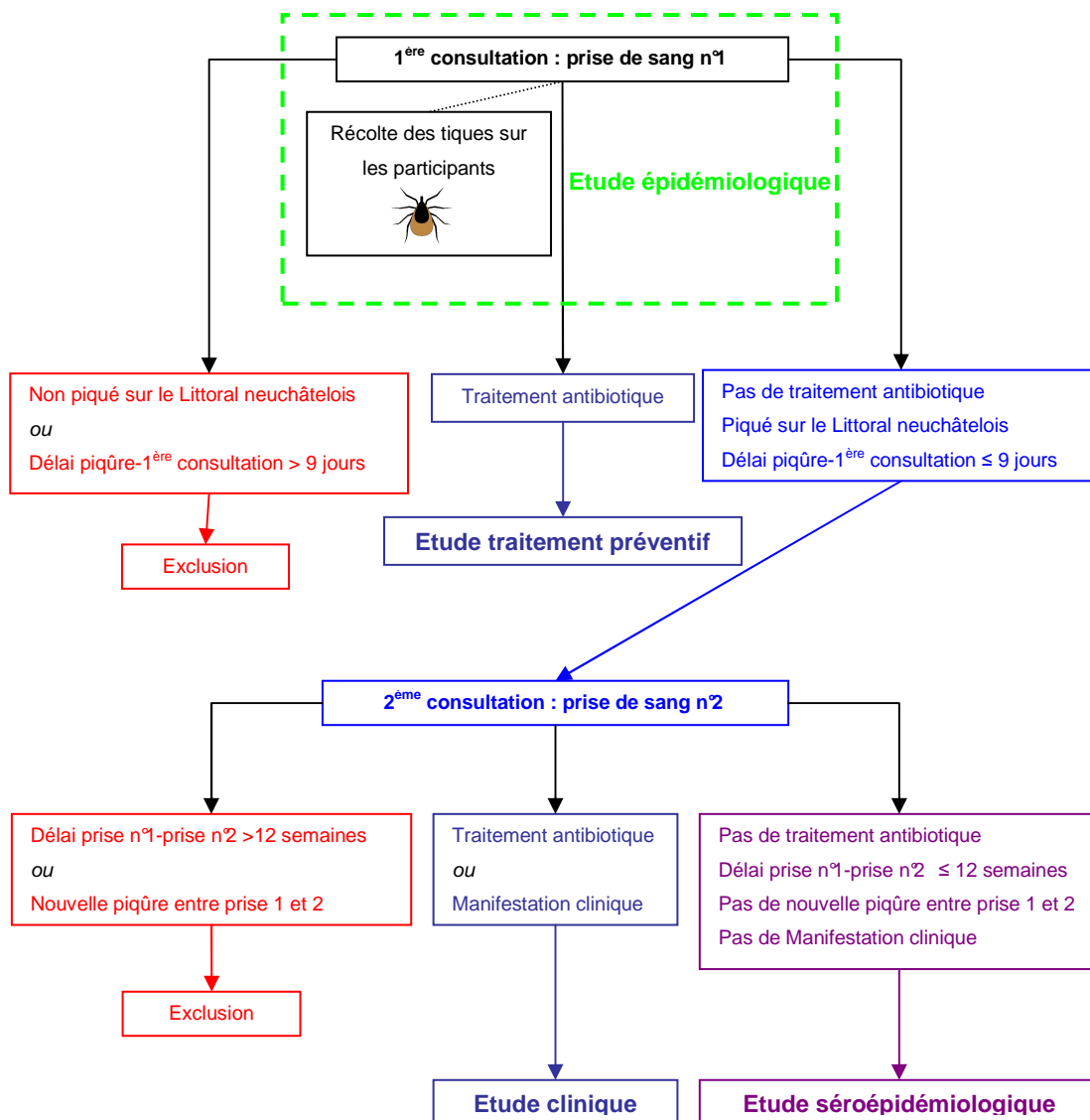


Figure 4 : Schéma d'inclusion des participants dans les différentes parties de l'étude, basée sur les critères suivants : piqûre sur le littoral neuchâtelois, délai entre la piqûre de tique et la 1^{ère} prise de sang, délai entre les deux prises de sang, traitement antibiotique, développement de manifestations cliniques, nouvelle piqûre de tique entre les deux prises de sang.

II.3 Récolte des tiques libres

Parallèlement, une récolte mensuelle des tiques a été réalisée dans la forêt mixte au-dessus de Neuchâtel, plus précisément au Bois-de-l'Hôpital (récolte réalisée par Olivier Rais) (figure 5). L'altitude est d'environ 550m. Ces populations de tiques sont surveillées depuis 1996, afin de suivre l'évolution mensuelle de la densité de population et du taux d'infection par les différentes géoespèces de *B. burgdorferi* sl. La récolte de ces tiques libres est suivie par la caractérisation des stades développementaux et par la détermination du taux d'infection par *B. burgdorferi* sl.

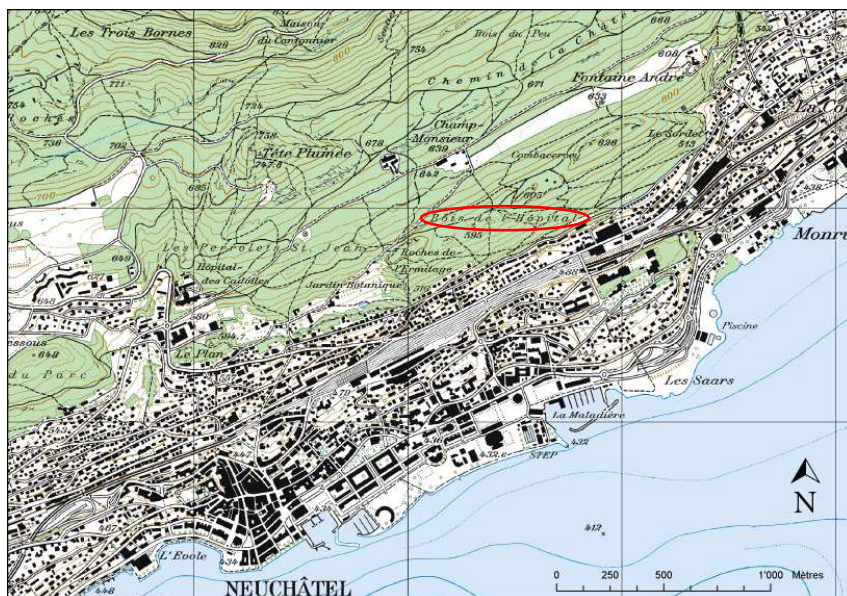


Figure 5. Extrait de la carte topographique N° 1164 et 1144 au 1:25'000 de la région de Neuchâtel (Boschung, 2006). ○ Site de récolte des tiques (Bois-de-l'Hôpital)

Les tiques en quête sur la végétation sont récoltées par la méthode du drapeau, qui consiste à traîner une pièce de tissu blanc de 1m² sur la végétation basse. La zone de récolte est un chemin pédestre circulaire de 1049m de long. La densité des tiques en quête est exprimée par le nombre de tiques trouvées par 100 m². La valeur de la densité annuelle des populations de tiques est appelée « CTD » (cumulated tick density) et correspond à l'aire sous la courbe de densité (figure 6). La densité maximale des tiques en quête est appelée « pic de densité de tique » (PTD) (figure 6) (Jouda et al, 2004a et b). Les tiques sont ensuite analysées par PCR et Reverse Line Blot (voir chapitre II.4). Les

données ainsi recueillies sur le terrain permettront de faire une corrélation avec la situation clinique et sérologique de la population du bas du canton de Neuchâtel.

Densité des tiques en quête par 100 m²

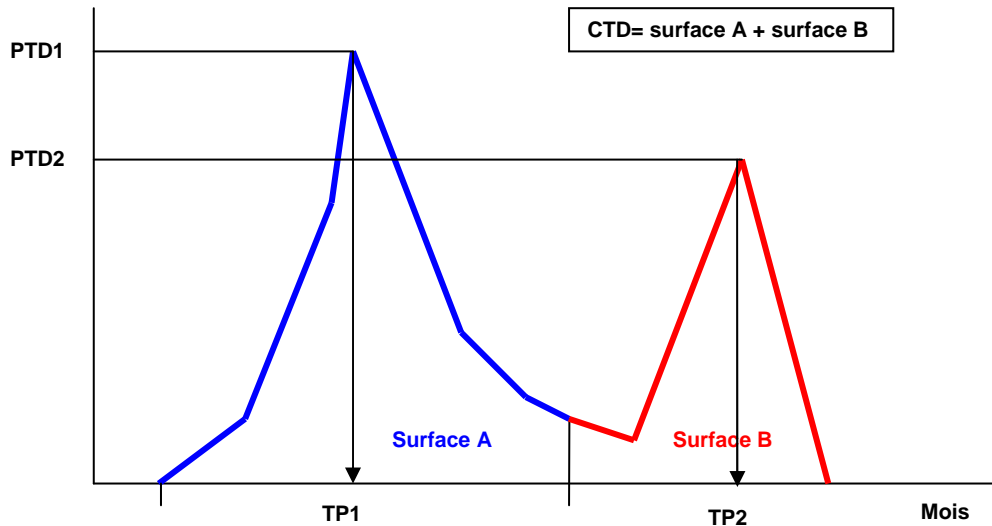


Figure 6. Densité cumulée des tiques en quête (CTD) et pic de densité des tiques (PTD). PTD1 : pic de densité des tiques au printemps ; PTD2 : pic de densité des tiques en automne ; TP1 : pic de printemps ; TP2 : pic d'automne (selon Perret, 2002).

II.4 Analyse des tiques libres récoltées sur le terrain

II.4.1 Immunofluorescence directe, mise en culture et extraction d'ADN

La tique, préalablement désinfectée dans de l'éthanol à 70%, est sectionnée au niveau de l'abdomen. Un échantillon de liquide intestinal est utilisé pour l'immunofluorescence directe (IF) et la tique est placée dans un tube contenant 1.2 ml de milieu BSK-H modifié selon Sinsky et Piesman (1989), dans des conditions stériles. Les tubes sont ensuite mis à incuber à 34°C pendant 7-10 jours. Après ce laps de temps, la croissance des borrelies dans le milieu de culture est contrôlée sous un microscope à fond noir (Wild). En cas de positivité, les cultures sont repiquées dans 3 ml de milieu de culture BSK-H modifié et remis à 34°C pour 7-10 jours.

Pour le test d'immunofluorescence directe, un peu de liquide intestinal est réparti sur les puits d'une lame. Celle-ci est ensuite séchée pendant une nuit à 37°C. Le lendemain, la

lame est fixée dans de l'acétone pendant 15 min. Le conjugué, un anticorps IgG humain anti-*B. burgdorferi* sl marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Peacock et al, 1971), est dilué dans du PBS et une goutte de ce mélange est déposée sur chaque spot. La lame est mise à incuber dans une chambre humide pendant 40 min à 37°C. Après deux lavages de 5 min avec du PBS, la lame est rincée à l' H₂O distillée, puis séchée. Une lamelle est montée sur la lame. La visualisation des spirochètes se fait sous un microscope à fluorescence (Olympus BH-2) à un grossissement de 400 fois.

Les tiques qui se sont avérées positives en IF ou en culture sont analysées par PCR et Reverse Line Blot : Les cultures correspondant à ces tiques sont lavées par PBS-MgCl₂ et centrifugées à 10'000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant est aspiré, puis 1 ml de PBS-MgCl₂ est ajouté. Le tube est ensuite vortexé puis remis à centrifuger 20 min à 10'000 rpm. Cette étape est répétée, puis, une fois le dernier surnageant aspiré, 30 µl d' H₂O nanopure sont ajoutés et le tube est chauffé à 100°C pendant 15 min. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être conservé à -20°C (Postic et al, 1994).

II.4.2 Détection et identification des génoespèces de *B. burgdorferi* sl par Polymerase Chain Reaction (PCR) et Reverse Line Blot (RLB)

II.4.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La technique de PCR est une méthode d'amplification, au travers d'une série de réactions catalysées par l'enzyme Taq polymérase, de segments spécifiques choisis d'ADN compris entre deux régions de séquence connue. Dans notre cas, c'est la séquence de l'espace intergénique entre les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 5S et 23S qui est amplifiée. Deux amorces, 23SBor et B5SBor (amorce biotynillée) (Alekseev et al, 2001), de séquences différentes (tableau 8), complémentaires de celles du double brin d'ADN, se lient à chaque extrémité de la séquence choisie d'acides nucléiques. Par une succession de cycles de dénaturation de l'ADN, fixation des amorces et polymérisation (tableau 9), la quantité d'ADN initialement contenue dans l'échantillon testé sera augmentée exponentiellement. Ce fort pouvoir d'amplification permet la détection de très faibles quantités d'ADN. La préparation du mix est décrite dans le tableau 10.

Primers	Séquence 5'-3'
23S Bor	TCAGGGTACTTAGATGGTTCACCTT
B 5S Bor	5'biotin-GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT

Tableau 8. Séquences des amorces 23SBor et B5SBor (Alekseev et al, 2001)

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	3min	
Dénaturation	94°C	20sec	
Hybridation	60→52°C	30sec	-1°C/cycle
Extension	72°C	30sec	
Dénaturation	94°C	20sec	
Hybridation	52°C	30sec	40 cycles
Extension	72°C	30sec	
Extension finale	72°C	7min	
Conservation	4°C		

Tableau 9. Conditions de la PCR

Mix PCR RLB (50µl)	
Tampon 10x (contient 15mM MgCl ₂)	5µl
dNTPs (10mM)	1µl
Amorce 23S Bor (10µM)	1µl
Amorce B 5S Bor (10µM)	1µl
H ₂ O nanopure	31.85µl
Taq (QIAGEN) (5U/µl)	0.15µl
ADN	10µl

Tableau 10. Préparation du mix pour la PCR précédant la RLB, permettant la détection et l'identification des génoespèces de *B. burgdorferi* sl chez les tiques libres.

II.4.2.2 Reverse Line blot (RLB)

Cette technique est basée sur le protocole de Schouls et al (1999), avec quelques modifications. Le protocole détaillé se trouve dans l'annexe 3.

Cette méthode permet l'identification des différentes génoespèces de *B. burgdorferi* sl par hybridation des échantillons avec différentes sondes oligonucléotidiques. Les sondes SL₁, SL₂ et SL₃ ne sont pas spécifiques et s'hybrident avec toutes les génoespèces de *B. burgdorferi* sl. Les autres sont spécifiques à une génoespèce (tableau 11). Celles-ci sont attachées de manière covalente à une membrane chargée négativement à la Biodyne C (Pall Biosupport) en lignes parallèles à l'aide d'un miniblottter (Immunetics). Après

l'attachement des sondes, la membrane est retirée du miniblottter et tournée à 90°. Les puits du miniblottter qui sont maintenant perpendiculaires aux lignes oligonucléotidiques sont remplis avec les échantillons à tester (produits PCR biotinylés). L'hybridation des sondes et des échantillons d'ADN est ensuite visualisée en utilisant la streptavidine couplée à la peroxydase (Boehringer Mannheim), qui interagit avec la biotine des échantillons, suivi par la détection avec une solution ECL (Amersham International).

Sondes	Séquence 5'-3'	Génoespèce ciblée
SL1	5' amino-CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	<i>B. burgdorferi</i> sl
SL2	5' amino-CTTCCATCTCTATTTAGCCAATTT	<i>B. burgdorferi</i> sl
SL3	5' amino-TATTTTTATCTTCCATCTCTATTTT	<i>B. burgdorferi</i> sl
SS	5' amino-AACACCAATATTTAAAAACATAA	<i>B. burgdorferi</i> ss
GA	5' amino-AACATGAACATCTAAAAACATAA	<i>B. garinii</i>
GANE	5' amino-CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA	<i>B. garinii</i>
AF	5' amino-AACATTTAAAAATAATTCAAGG	<i>B. afzelii</i>
VSNE	5' amino-TATATCTTTTGTTCATCCATGT	<i>B. valaisiana</i>
LusiNE	5' amino-TCAAGATTTGAAGTATAAAATAAAA	<i>B. lusitaniae</i>

Tableau 11. Séquences des 9 sondes oligonucléotidiques utilisées pour la RLB (Schouls et al, 1999 ; Alekseev et al, 2001 ; Poupon et al, 2006). Toutes les sondes oligonucléotides sont synthétisées avec un groupe 5' amino permettant la liaison covalente des oligonucléotides à une membrane chargée négativement à la Biodyne C.

II.5 Analyse des tiques récoltées sur les participants

II.5.1 Extraction de l'ADN par l'Hydroxyde d'Ammonium (NH₄OH)

Cette méthode a été adaptée de la publication de Kirstein et al (1997a).

La tique entière encore congelée est lavée à l'éthanol et placée dans un tube eppendorf. Une solution 0.7M d'hydroxyde d'ammonium est fraîchement préparée et 100µl d'hydroxyde d'ammonium 0.7M sont pipetés dans chaque tube eppendorf (la tique doit être immergée). Les tubes eppendorf sont ensuite incubés à 100°C pendant 15mn dans un bloc chauffant. Puis ils sont retirés, laisser à refroidir pendant une minute et centrifugés

brèvement, afin d'éliminer toute condensation dans le couvercle. Les tubes sont ouverts, placés dans le bloc chauffant pendant 15mn à 100°C pour permettre l'évaporation jusqu'à un volume de 30µl. Après refroidissement à température ambiante, l'ADN est conservé à -20°C.

II.5.2 Détection et identification des génoespèces de *B. burgdorferi* si par PCR et Reverse Line Blot

Ces deux méthodes sont identiques à celles utilisées pour les tiques récoltées sur le terrain (voir II.4.2.1 et II.4.2.2). Le seul changement réside dans la préparation du mix pour la PCR, où la quantité d'ADN et d'H₂O nanopure diffèrent: 20 µl d'ADN et 21.85 µl d'H₂O nanopure.

II.5.3 Real Time PCR

En supplément de la PCR et de la RLB, toutes les tiques récoltées sur les participants ont également été analysées par Real Time PCR (annexe 4). Cette technique permet d'amplifier et de quantifier simultanément l'ADN. La séquence cible est un fragment du gène codant pour la flagelline, amplifiée grâce à deux primers, FlaF1A et Fla R1, et une sonde, FlaProbe1, spécifiques (Schwaiger et al, 2001) (tableau 12). Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient l'ADN dénaturé, les primers et la sonde contenant deux fluorochromes : à l'extrémité 3', le fluorochrome FAM (6-carboxyfluorescein) et à l'extrémité 5', le fluorochrome TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine). Après l'hybridation des amorces, les fluorochromes se lient au double-brin d'ADN et ceci se traduit par une augmentation de la fluorescence qui est mesurée à la fin de chaque cycle. La fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée. Les conditions, ainsi que la préparation du mix sont détaillées dans les tableaux 13 et 14.

Désignation	Séquence 5'→ 3'
Amorce en avant FlaF1A	AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A
Amorce inverse FlaR1	GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA
Sonde FlaProbe1	TGC TAC AAC CTC ATC TGT CAT TGT AGC ATC TTT TAT TTG

Tableau 12. Séquences des amorces et de la sonde utilisées pour la RT PCR (Schwaiger et al, 2001)

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	10min	
Amplification	95°C	15sec	45 cycles
Hybridation	60°C	1 min	

Tableau 13. Conditions de la RT-PCR (Schwaiger et al, 2001)

Mix RT-PCR	
Tampon 10x (avec MgCl ₂)	2.25µl
dNTPs(10mM)	0.45µl
MgCl ₂	0.9 µl
Amorce FlaF1A (20µM)	0.45µl
Amorce FlaR1 (20µM)	0.45µl
Sonde FlaProbe1	0.45µl
H ₂ O nanopure	12.93µl
Hotstart Taq polymérase	0.113µl
ADN	2µl

Tableau 14. Préparation du mix pour la RT-PCR (Boschung, 2006)

Les échantillons testés sont quantifiés grâce à une courbe standard, générée par les standards (préalablement quantifiés grâce au clonage du gène de la flagelline). Ceux-ci permettent de calibrer les résultats et de déterminer le nombre de copies de Borréliés contenue dans l'échantillon, en l'occurrence 2µl. En connaissant le volume total extrait de la tique (20 à 30µl), il est possible d'extrapoler le nombre de copies présentes dans la tique.

II.5.4 Détermination du degré de gorgement des tiques récoltées sur les participants

La durée du repas sanguin d'une tique est un facteur important pour évaluer le risque de transmission de la borréliose de Lyme. Cette durée peut être estimée par l'établissement d'un indice, l'indice scutal (rapport entre la longueur du corps, l'idiosome, et la largeur du scutum) (Falco et al, 1996). Cet indice a été établi par Falco et al (1996) afin de déterminer la durée de gorgement d'*I. scapularis*. Comme *I. scapularis* et *I. ricinus* présentent probablement des différences de corrélation entre l'indice scutal (IS) et la durée d'attachement, nous avons déterminé l'IS en fonction du temps de gorgement chez *I. ricinus* et développé des équations de régression non linéaire afin de déterminer la durée d'attachement des nymphes et des femelles d'*I. ricinus* à partir de l'IS. Des

nymphes et des femelles d'*I. ricinus* ont été placées sur des animaux de laboratoire, puis détachées à des intervalles déterminés afin de calculer cet IS.

Un modèle de régression non linéaire a été appliqué avec le programme S-Plus (réalisé par Jacqueline Moret, Université de Neuchâtel) afin d'évaluer la durée d'attachement (gorgement) d'une tique à partir de l'IS.

II.5.4.1 Récolte des tiques

Des nymphes et des femelles d'*I. ricinus* ont été récoltées par la méthode du drapeau dans la forêt en périphérie de Neuchâtel (St-Blaise et Hauterive). Deux récoltes ont été effectuées, une en automne et une au printemps suivant. Les tiques ont été gardées dans des tubes, avant l'infestation des animaux de laboratoire. Vingt nymphes et vingt femelles d'*I. ricinus* de chaque récolte saisonnière ont été conservées dans de l'éthanol à 70% comme individus de contrôle non gorgés.

II.5.4.2 Infestation des animaux de laboratoire

Environ 25 nymphes ont été placées sur chacune des quatre souris de souche « swiss ». Les tiques ont été déposées dans des capsules collées sur le dos de l'animal, ceci permettant un détachement plus facile des tiques, ainsi que l'évitement de la perte d'individus par le comportement de « grooming » des hôtes.

Dix femelles ont été placées sur chacune des oreilles de 2 lapins de souche « New Zealand White » en primo infestation. Chaque oreille a été recouverte d'un fourreau de tissu.

Les tiques qui ne se sont pas fixées ont été retirées. Cette expérience a été réalisée une première fois en automne avec les tiques récoltées à cette saison, puis une deuxième fois au printemps avec celles récoltées à ce moment-là.

II.5.4.3 Détachement et conservation des tiques

Les tiques, nymphes et femelles, ont été détachées à différents intervalles et conservées dans de l'éthanol à 70% jusqu'à la mesure :

- Vingt nymphes ont été détachées d'une souris après 24 heures d'attachement. Les nymphes gorgées sur les trois autres souris, soit 20 nymphes par souris, ont été détachées de la même façon, respectivement après 48, 72 et 98 heures.

- Neuf femelles attachées sur la première oreille d'un lapin ont été détachées après 24 heures. Les femelles gorgées sur les autres oreilles de lapins, soit 9 femelles par oreille, ont été détachées de la même façon, respectivement après 48, 72 et 98 heures.

II.5.4.4 Mesure des tiques et détermination du degré de gorgement (indice scutal)

Les tiques ont été mesurées à l'aide d'un microscope Olympus SZX12 relié à une caméra et les mesures ont été faites par le programme Analysis[®] Image Processing. L'indice scutal a été calculé pour les nymphes et les femelles, par la mesure de la longueur du corps, de la base du capitulum jusqu'à l'extrémité de l'abdomen (idiosome), et de la largeur du scutum à son point le plus large (figure 7), d'après la méthode mise au point par Falco et al (1996). L'indice scutal est le rapport entre la longueur de l'idiosome et la largeur du scutum. Pendant le repas sanguin, l'idiosome s'allonge, alors que la largeur du scutum reste constante. Ainsi cet indice fournit une mesure de l'accroissement du corps par rapport à la taille initiale d'une tique non gorgée.

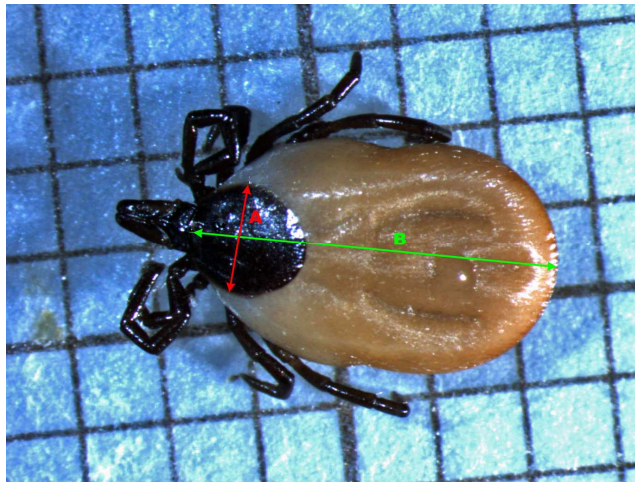


Figure 7. Vue dorsale d'une femelle d'*I. ricinus* montrant les mesures réalisées. A= longueur de l'idiosome, B= largeur du scutum.

Remarque: pour effectuer la mesure du gorgement des tiques, les tiques récoltées sur les patients doivent être intactes.

II.6 Analyse des sérums

II.6.1 Dosage immunoenzymatique microparticulaire (MEIA) sur IMx® (Abbott, 2002)

Le dosage « IMx Borréliose de Lyme » est une méthode qualitative pour la mesure des anticorps IgM et IgG dirigés contre *B. burgdorferi* sI dans le sérum. Pour la mesure des IgM, les microparticules sont recouvertes de lysat à partir de cellules *B. burgdorferi* sI entières (isolat européen ATCC35211, *B. burgdorferi* ss génotype 1), partiellement purifiées par extraction alcaline, avec un fragment interne P41, recombinant et de l'OspC recombinant (préparé à partir de l'isolat américain ATCC35210, *B. burgdorferi* ss génotype 1). Pour la mesure des IgG, les microparticules sont recouvertes de lysat à partir de cellules *B. burgdorferi* sI entières (isolat européen ATCC35211, *B. burgdorferi* ss génotype 1), partiellement purifiées par extraction alcaline, avec un fragment interne P41, recombinant (préparé à partir de l'isolat américain ATCC35210, *B. burgdorferi* ss génotype 1).

Le dosage « IMx Borréliose de Lyme » fournit un indice qui est la valeur de l'échantillon par rapport à la valeur du calibrateur.

Pour le dosage des IgM anti-*Borrelia*, la valeur seuil est déterminée en multipliant par 0.8 la valeur du calibrateur. Les échantillons présentant un indice inférieur à 0.650 sont considérés comme négatifs. Ceux présentant un indice supérieur ou égal à 0.650 mais inférieur à 0.8 sont considérés comme équivoques. Les résultats supérieurs ou égaux à 0.8 sont interprétés comme positifs.

Pour le dosage des IgG anti-*Borrelia*, la valeur seuil est déterminée en multipliant par 0.9 la valeur du calibrateur. Les indices inférieurs à 0.7 sont considérés comme négatifs. Ceux supérieurs ou égaux à 0.7 mais inférieurs à 0.9 sont considérés comme équivoques. Des résultats supérieurs ou égaux à 0.9 sont interprétés comme positifs.

Les sérums de patients atteints d'autres maladies à spirochètes (par ex. syphilis, leptospirose, fièvres récurrentes, maladie du paradonte) peuvent également présenter des résultats positifs. Une réactivité croisée peut également être observée chez des patients atteints d'autres infections bactériennes ou virales (par ex. fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses, virus d'Epstein Barr, cytomégalovirus, VIH) ou les patients souffrant de maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, anticorps anti-nucléaires, lupus érythémateux disséminé) (Abbott, 2002).

II.6.2 Séroévolution significative et séroconversion

Une évolution sérologique significative (séroévolution) a été définie en utilisant une population de contrôle, formée de 21 personnes. Chez ces personnes, deux sérums ont été prélevés à 8 semaines d'intervalle, pendant la saison de faible activité des tiques (hiver). Ces volontaires n'avaient pas souvenir d'avoir été piqués par des tiques durant l'année passée. D'après la distribution des différences d'indice entre les deux sérums de ces personnes, la valeur de la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la distribution a été calculée (cf. chapitre III.3.2), pour avoir 95% de ces différences en-dessous de cette valeur. Une augmentation entre deux sérologies dans la population d'étude égale ou supérieure à cette valeur a été considérée comme une séroévolution significative ($p < 0.05$).

Une séroconversion est définie comme le passage de négatif à positif, selon les seuils d'interprétation fournis par le dosage d'anticorps du test MEIA. Le passage d'équivoque à positif ou de négatif à équivoque est considéré comme une séroconversion si la différence entre les deux sérums est égale ou supérieure à la valeur de la limite supérieure de l'intervalle de confiance.

II.6.3 SDS-Page et Western Blot

En cas de séroconversion (ou de séroévolution), un test WB est réalisé, utilisant les 3 souches pathogènes, *B. afzelii* (NE17), *B. burgdorferi* ss (B31) et *B. garinii* (NE83) comme antigènes. Cette technique permet l'identification des anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes présents dans un échantillon protéique. Les protéines des 3 souches de *B. burgdorferi* si citées plus haut sont fragmentées sur un gel d'électrophorèse et transférées sur une feuille de nitrocellulose. Après blocage des sites non spécifiques, le sérum à tester est ajouté, puis le conjugué qui se fixe sur le complexe antigène-anticorps fixé sur la nitrocellulose. La révélation (transformation du substrat ajouté en produit coloré) fait apparaître les bandes correspondant aux antigènes contre lesquels les anticorps spécifiques ont été formés.

II.6.3.1 Préparation de l'antigène

Les souches B31 et NE83 ont été isolées à l'Université de Neuchâtel à partir de tiques libres, NE17 à partir d'une tique prélevée sur un hôte sauvage et ces 3 souches ont été identifiées par PCR et Restriction Fragment Length Polymorphism (Postic et al, 1994).

Les spirochètes ont été maintenus en culture dans le milieu BSK-H modifié (Sinsky et Piesman, 1989) à 34°C. Après 7 à 10 jours, les cultures sont centrifugées à 3'000 t/min pendant 10 minutes et lavées 3 fois dans PBS-MgCl₂ 5 mM à 3'000 t/min. Pour un volume de milieu de culture de départ de 175 ml, le dernier culot est ensuite suspendu dans 0.5 ml PBS-MgCl₂ et le volume est complété à 10 ml avec le tampon d'échantillon (tableau 15). L'antigène, concentré 17.5x, est prêt à être utilisé.

Tampon d'échantillon (1 ml)	
Mercapto-Ethanol	100µl
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	250µl
Glycérol 50%	250µl
SDS 10%	400µl
Bleu de bromophénol 1 %	10µl

Tableau 15. Préparation du tampon d'échantillon

II.6.3.2 SDS Page et Western Blot

Dans cette étude, un système de grand gel a été utilisé (9.5-11 cm/10-14 cm) :

- Gel de séparation : gel de polyacrylamide de 12.5% coulé à une hauteur de 12 cm ; 0.75 mm d'épaisseur ; acrylamide / bis-acrylamide 30 :1 (Bio-Rad laboratories); 1 heure de polymérisation.
- Gel de concentration : gel de polyacrylamide de 6% ; 20 minutes de polymérisation.

Les antigènes sont fragmentés par migration sur gel d'électrophorèse 12.5%, à 30 mA pendant 1 h, puis à 40 mA pendant 2 h 30. Le transfert sur filtre de nitrocellulose 0.2 µm (Schleicher & Schuell) est effectué par électrotransfert en milieu semi-sec, utilisant le système Novablot, à 120 mA pendant 1 h.

Le filtre de nitrocellulose est coloré pendant 5 min au rouge ponceau et coupé immédiatement en bandelettes de 11cm maximum. Avant de les utiliser avec les sérums à tester, les deux bandelettes externes de chaque lot ont été contrôlées avec un sérum de référence (POS-G-02 : pool de sérums positifs en IgG) fourni par le laboratoire de

diagnostic parasitaire de l'Université de Neuchâtel. Les sites non spécifiques sont saturés pendant 30 minutes dans du PBS-lait 5%. Les bandelettes sont mises à incuber avec 10 μ l de sérum à tester dans du PBS-lait 5% (Immunoblot IgM) ou PBS-lait 1% (Immunoblot IgG). Deux bandelettes sont ajoutées pour le sérum positif de contrôle (IB IgG : POS-G-02, POS-G-03 ; IB IgM : POS-M-02, POS-M-03) et pour le sérum négatif de contrôle. Après plusieurs rinçages, le conjugué anticorps anti-IgG ou IgM marqué à la phosphatase alcaline (MaProline GmbH) est ajouté dans le tampon de dilution (PBS-lait 5% ou PBS-lait 1%) et incubé pendant 2 h (Immunoblot IgG) ou 1h45 (Immunoblot IgM). Pour révéler la réaction immunologique, une solution de révélation est ajoutée et incubée pendant 20 minutes (annexe 5).

II.6.3.3 Lecture et interprétation des résultats

II.6.3.3.1 Immunoblot IgG

Pour l'interprétation de l'IB IgG, nous nous sommes basés sur les critères du laboratoire de diagnostic parasitaire (Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, 1999 ; adaptés des critères de Dressler et al, 1993):

- Pour chaque bande protéique (antigène) révélée sur la bandelette correspond un certain nombre de points : par exemple, pour la bande protéique (antigène) correspondant à 90 kDa, 10 points sont attribués (tableau 16).

10 points	5 points	1 point
90 (93)	72	Les autres
31(OspA)	65 (66)	
21/OspC (21)	58 (58)	
	56	
	43 (45)	
	39 (39)	
	34 (OspB)	
	30 (30)	
	29 (28)	
	18 (18)	

Tableau 16. Score du western blot IgG (diagnostic parasitaire, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, 1999)

La somme des points pour chaque bandelette est effectuée et d'après le score, l'interprétation est la suivante:

≥ 46 points:	contact certain avec <i>B. burgdorferi</i> sl.
35-45 points:	contact équivoque avec <i>B. burgdorferi</i> sl.
≤ 34 points:	pas de contact avec <i>B. burgdorferi</i> sl.

En cas de séroconversion ou de séroévolution significative observée en MEIA, les critères permettant de confirmer une séroconversion ou une séroévolution sont l'apparition de nouvelles bandes protéiniques au niveau du 2^{ème} sérum par rapport au 1^{er}, ou l'augmentation de l'intensité des bandes présentes au niveau du 1^{er} sérum.

II.6.3.3.2 Immunoblot IgM

Comme pour l'interprétation de l'IB IgG, nous nous sommes basés sur les critères du laboratoire de diagnostic parasitaire (Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, 1999 ; adaptés des recommandations de Engström et al, 1995) :

Pour l'interprétation de l'IB IgM, l'intensité des bandes protéiques révélées sur la bandelette est estimée ainsi:

- S'il n'y a qu'une trace de la bande protéique, 0.5 points sont attribués.
- Si l'intensité de la bande protéique est faible, 1 point est attribué.
- Si l'intensité de la bande est forte, 2 points sont attribués.
- Si l'intensité de la bande est très forte, 3 points sont attribués

Le contrôle positif et le contrôle négatif servent de point de comparaison. Par exemple, si une réaction a lieu sur l'OspC avec le sérum négatif, cette réaction est considérée comme seuil pour la lecture de la série. L'intensité des bandes sur les bandelettes contrôles doivent être les suivantes (seules les réactions sur p41 (fla), p39 (BmpA) et p21 (OspC) sont considérées) :

- Contrôle positif: L'intensité de la p21(OspC) doit être très forte (3 points).
L'intensité de la p41 (fla) doit être forte (2 points).
Eventuellement trace de la p39 (BmpA) (0-0.5 points)

- Contrôle négatif: Pas de trace de la p21 (OspC)
L'intensité de la p41 (fla) doit être faible (1 points)
Pas de trace de la p39 (BmpA) (0 points)

Une bandelette correspondant à un sérum est considérée comme positive si :

1. Ces 3 bandes sont présentes, même faiblement.
2. L'intensité de la p21 (OspC) est forte ou très forte.
3. Le score total de la bandelette est égal ou supérieur à 3 avec la présence de 2 bandes.

De plus:

1. Si le score total de la bandelette est égal ou supérieur à 4.5, la positivité est forte.
2. Si le score total de la bandelette est compris entre 1.5–2.5, la positivité est faible.
3. Si une hésitation a lieu sur l'intensité d'une bande et que ce choix influence le résultat (positif ou négatif), la bandelette est jugée comme équivoque.

En cas de séroconversion ou de séroévolution significative observée en MEIA, les critères permettant de confirmer une séroconversion ou une séroévolution sont l'apparition de nouvelles bandes protéiniques au niveau du 2^{ème} sérum par rapport au 1^{er}, ou l'augmentation de l'intensité des bandes présentes au niveau du 1^{er} sérum, correspondant à la p41, p39 ou OspC.

II.7 Analyses statistiques

Les données ont été traitées avec le logiciel de statistique S-Plus (analyses réalisées par Jacqueline Moret, Université de Neuchâtel). Les tests de statistique utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- Le test du chi carré a permis de comparer les prévalences d'infection des tiques libres et des tiques récoltées sur les participants selon l'année, les temps d'attachement entre femelles et nymphes, les séroprévalences du groupe contrôle et de la population d'étude, les séroprévalences chez les femmes et chez les

hommes, les séroprévalences initiales de la population d'étude selon l'année, le nombre d'EM selon l'année.

- Le test exact de Fischer a permis l'analyse du site de piqûre en fonction de l'âge de la victime, l'analyse du temps d'attachement des tiques en fonction de l'âge de la victime, l'analyse du temps d'attachement des tiques en fonction du site de piqûre, l'analyse des séroconversions asymptomatiques en fonction de l'année.
- Le test de corrélation de Pearson a permis d'établir la corrélation entre la densité des tiques infectées, le nombre de séroévolutions significatives et le nombre d'érythèmes migrants selon l'année.
- Le test binomial a permis la comparaison de la sensibilité de l'IF avec celle de la culture, de la sensibilité de la RT PCR avec celle de la RLB.
- La relation entre l'indice scutal et le temps d'attachement d'une tique a été calculée par un modèle de régression non-linéaire.
- L'analyse de variance a permis de démontrer l'effet du temps d'attachement des tiques sur l'indice scutal.

III Résultats

III.1 Analyse des tiques libres récoltées sur le terrain

III.1.1 Nombre de tiques récoltées

De 2003 à 2005, 11217 tiques *I. ricinus* ont été récoltées au Bois-de-l'Hôpital (Neuchâtel) par O. Rais et se répartissent ainsi selon les années :

- En 2003, 4812 tiques au total, soit 4157 nymphes, 495 adultes, 160 larves.
- En 2004, un total de 4137 tiques, soit 3170 nymphes, 613 adultes, 354 larves.
- En 2005, un total de 2268 tiques, soit 1874 nymphes, 294 adultes, 100 larves.

III.1.2 Densité des populations de tiques

La densité annuelle cumulée des tiques (CTD, nombre de tiques par an et par 100 m²) et le pic de densité des tiques (PTD, nombre de tiques maximal par 100m² obtenu sur l'année) ont été calculés pour les nymphes et les adultes *I. ricinus* récoltés au Bois-de-l'Hôpital (tableau 17) (D. Pérez, communication personnelle). Le CTD (12054 nymphes/100 m²) et le PTD (163 nymphes/100 m²) les plus élevés des nymphes sont observés en 2003, puis ils diminuent au cours des 3 années sur le site de l'étude (tableau 17). Pour les adultes, le CTD (1783 adultes/100 m²) et le PTD (14 adultes/100 m²) les plus élevés sont observés en 2004. Pour les nymphes et les adultes, le CTD minimum est observé en 2005 (tableau 17).

Pour les trois années, un pic d'activité des nymphes est atteint au printemps, soit en avril pour 2003 (figure 8) et en mai pour 2004 et 2005 (figure 9 et 10). Un deuxième pic d'activité en automne est seulement observé en 2005 (figure 10).

En résumé, la densité de tiques la plus élevée est observée en 2003.

III.1.3 Prévalence d'infection des tiques libres déterminée par IF, culture et PCR

Un total de 2151 tiques *I. ricinus* ont été examinées pour la présence de *B. burgdorferi* si:

- En 2003, 680 tiques : 480 nymphes, 89 femelles, 111 mâles.
- En 2004, 690 tiques : 469 nymphes, 110 femelles, 111 mâles.
- En 2005, 781 tiques : 548 nymphes, 113 femelles, 120 mâles.

Quand seuls les résultats de l'IF sont pris en considération, la prévalence de *B. burgdorferi* si chez les tiques est de 28% (603/2151) (tableau 18). La prévalence d'infection est plus élevée chez les adultes que chez les nymphes pour les trois années (test du chi carré, $p=0$). Chez les femelles, la prévalence la plus haute est observée en 2005 avec 43.4%, puis en 2003 avec une prévalence de 39.3%. La prévalence d'infection chez les femelles diffère significativement selon l'année (test du chi carré, $p=0.04$). Chez les nymphes, la plus haute prévalence d'infection est également observée en 2005 avec 27.6%, cependant, aucune différence significative n'est trouvée chez les nymphes selon l'année (test du chi carré, $p=0.989$).

En culture, seules 401 tiques sur 2151 (18.6%) se sont avérées infectées (tableau 19). Toute tique positive en IF et/ou en culture a ensuite été testée en PCR. Ainsi un total de 610 tiques sur 2151 (28.4%) a donc été testé en PCR. Parmi elles, 394 sur 610 (64.6%) étaient infectées en IF, en culture et PCR, 209/610 (34.3%) positives seulement en IF et 7/610 (1.1%) positives seulement en culture (tableau 19). En 2003, 2004 et 2005, l'IF démontre une plus grande sensibilité que la culture (test binomial, $p=0$). Cent tiques ont démontré une infection en IF, mais qui n'a pas été observée en culture et en PCR (tableau 19).

La prévalence d'infection chez les nymphes par l'une ou l'autre de ces techniques varie de 22.2% en 2004 à 27.6% en 2005 (tableau 20), mais la différence de prévalence entre les trois années est non significative (test du chi carré, $p=0.1338$). Chez les adultes, la prévalence varie de 30.3% en 2004 à 41.6% en 2005. La différence entre les 3 années est significative (test du chi carré, $p=0.03$). La prévalence d'infection est plus élevée chez

les adultes que chez les nymphes pour les trois années (test du chi carré, $p=0$) (tableau 20).

En résumé, la prévalence d'infection des nymphes déterminée par l'une ou l'autre de ces méthodes ne présente pas de différences significatives au cours des 3 années. Chez les adultes, la prévalence d'infection la plus élevée est observée en 2005, avec 41.6% des adultes infectés par *B. burgdorferi* sl. Les adultes sont plus infectés que les nymphes.

III.1.4 Densité de tiques infectées par *B. burgdorferi* sl

La densité des tiques infectées par 100 m² a été calculée lorsque la densité des tiques est maximale (PTD) pour chaque année de l'étude en multipliant le PTD par le pourcentage de tiques infectées (infection déterminée par IF et culture). Le PTDi des nymphes varie beaucoup d'une année à l'autre : la plus haute densité atteint 42.4 nymphes infectées par 100 m² en 2003 et la plus basse est observée en 2005 avec 13.8 nymphes infectées par 100 m² (tableau 21). Ainsi, le risque de rencontrer une nymphe infectée est maximal en 2003 et diminue ensuite de 2004 à 2005. Chez les adultes, le PTDi des adultes est maximal en 2005 (5.4 adultes infectés/100 m²) (tableau 21). Le risque de rencontrer un adulte infecté est plus faible que le risque de rencontrer une nymphe infectée.

La densité cumulée des tiques infectées (CTDi : nombre de tiques infectées par an et par 100 m²) a été obtenue en multipliant la densité cumulée des tiques (CTD) par le pourcentage de tiques infectées. La densité cumulée de nymphes infectées la plus élevée est observée en 2003 avec 3134 nymphes infectées par 100 m² (tableau 22). Elle diminue ensuite de 2004 à 2005. Chez les adultes, la densité cumulée la plus élevée est observée en 2005 et est plus faible que la densité cumulée des nymphes infectées (tableau 22).

En résumé, le risque de rencontrer une tique infectée (nymphes et adultes ensemble) est le plus élevé en 2003.

III.1.5 Prévalence d'infection des tiques libres par les différentes génoespèces de *B. burgdorferi* sl déterminée par RLB

Au total, chez 510 tiques sur 610 trouvées infectées, les génoespèces de *B. burgdorferi* sl les infectant ont été caractérisées par RLB.

Au cours des 3 années, une prédominance de *B. afzelii* est observée chez les nymphes, suivie de *B. garinii*, puis de *B. burgdorferi* ss (figure 11). Chez les adultes, de 2003 à 2005, la prédominance varie entre *B. afzelii* et *B. garinii*, suivi soit de *B. burgdorferi* ss, soit de *B. valaisiana* (figure 11).

Une seule nymphe, récoltée en 2003, était infectée par *B. lusitaniae* (1%, 1/97). Les génoespèces infectant 54 nymphes et 8 adultes n'ont pu être déterminées (*B. burgdorferi* sl) (figure 11).

Les infections mixtes suivantes ont été trouvées : *B. garinii* et *B. valaisiana* (5), *B. afzelii* et *B. garinii* (4), *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* (9), *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* (1) (figure 11).

III.2 Etude épidémiologique

III.2.1 Nombre de participants, âge et sexe

Sur les trois années de l'étude, 474 personnes se sont rendues chez un médecin après une piqûre de tique pour participer à l'étude. Trois cents soixante et un participants (76.2%) sont revenus à la 2^{ème} consultation :

- En 2003, 141 participants (70 femmes, 71 hommes), dont 99 (70.2%) sont revenus à la 2^{ème} consultation (48 femmes, 51 hommes).
- En 2004, 182 participants (87 femmes, 94 hommes, 1 inconnu), dont 141 (77.5%) sont revenus à la 2^{ème} consultation (65 femmes, 76 hommes).
- En 2005, 151 participants (80 femmes, 71 hommes), dont 121 (80.1%) sont revenus à la 2^{ème} consultation (65 femmes, 56 hommes).

De 2003 à 2005, 237 femmes (50%, 237/474) et 236 hommes (49.8%, 236/474) ont participé à l'étude. Un total de 178 femmes (75.1%, 178/237) et 183 hommes (77.5%, 183/236) sont revenus à la deuxième consultation.

Parmi ces 474 participants, toutes les catégories d'âge sont représentées. Le plus jeune participant est un bébé de 3 mois et le plus âgé un retraité de 94 ans. La moyenne d'âge est de 43 ans. La catégorie d'âge des 50-59 ans (19.6%) est la plus représentée, suivie de celle des 40-49 ans (15.8%) (figure 12). Environ 8 % des participants ont moins de 10 ans. La classe d'âge des 80 ans et plus (2.1%) est la moins représentée (figure 12).

III.2.2 Sites de piqûre, âge et sexe

Parmi les 474 participants, 495 piqûres de tiques ont été enregistrées. Aucune différence significative n'est observée si on compare le site de piqûre en fonction du sexe de la victime (test exact de Fischer, $p=0.113$). Les jambes sont le site de piqûre majoritaire pour les femmes (40.7%, 100/246) et les hommes (44.4%, 110/248) (figure 13) et pour toutes les catégories d'âge (figure 14). Cependant, les enfants de moins de 10 ans sont piqués majoritairement à la tête (41.2%, 7/17) et au cou (38.5%, 10/26) et la différence avec les personnes de plus de 10 ans est très significative (test du chi carré, $p<0.0001$).

III.2.3 Répartition saisonnière des piqûres de tiques

La majorité des piqûres ont été enregistrées de mai à juillet pour les 3 années. De plus, beaucoup de piqûres ont lieu en automne, particulièrement en 2004 et 2005 (figure 15). En 2003, le nombre maximal de piqûres de tique est décalé de deux mois par rapport au pic d'activité des tiques (figure 16). En 2004, ce décalage est d'un mois (figure 17) et en 2005, il n'a pas été observé (figure 18).

III.2.4 Analyse des tiques récoltées sur les participants

III.2.4.1 Nombre de tiques récoltées sur les participants

Un total de 352 tiques a pu être obtenu à partir des 474 participants à l'étude de 2003 à 2005. Parmi elles, 67.9% (239/352) étaient des nymphes et 29.8% (105/352) des

femelles. En 2003, 0.6 tique par participant ont été obtenu, 0.7 tique par participant en 2004 et 0.8 tique par participant en 2005.

Dix-neuf participants ont apporté deux tiques les ayant piqués simultanément, un autre en a apporté trois.

III.2.4.2 Prévalence d'infection des tiques récoltées sur les participants par les différentes génoespèces de *B. burgdorferi* si déterminée par RLB

Un total de 333 tiques (94.6%, 333/352), prélevées sur les 474 participants, a pu être analysé par RLB (227 nymphes, 99 femelles, 3 mâles et 4 larves). Parmi ces tiques, 59 (17.7%) se sont avérées positives en RLB (37 nymphes (37/227, 16.3%), 21 femelles (21/99, 21.2%) et une larve (1/4, 25%)). Les 3 mâles n'étaient pas infectés.

En 2003, 91 tiques ont été récoltées sur les participants (65 nymphes, 24 femelles et 2 larves). Parmi elles, 18 tiques (19.8%, 18/91) ont démontré une infection par *B. burgdorferi* si. Il s'agit de 9 femelles et de 9 nymphes. Une prédominance de *B. afzelii* et de *B. garinii* est observée chez les nymphes. Chez les femelles, *B. afzelii* prédomine également. Une infection mixte, *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii*, est observée chez une femelle (figure 19).

En 2004, 125 tiques ont été récoltées sur les participants (88 nymphes, 35 femelles, 1 mâle et 1 larve). Parmi elles, 25 tiques (20%, 25/125) ont démontré une infection par *B. burgdorferi* si. Il s'agit de 9 femelles et de 16 nymphes. Une prédominance de *B. afzelii* est observée chez les nymphes et chez les femelles. Deux infections mixtes, une par *B. afzelii* et *B. garinii* et une par *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii*, ont été détectées chez une nymphe et une femelle (figure 19).

En 2005, 117 tiques ont été récoltées sur les participants (74 nymphes, 40 femelles, 2 mâles et 1 larve). Parmi elles, 16 tiques (13.7%, 16/117) ont démontré une infection par *B. burgdorferi* si. Il s'agit de 3 femelles, de 12 nymphes et d'une larve. Les nymphes sont principalement infectées par *B. afzelii*, alors que chez les 3 femelles, aucune prédominance n'est observée (figure 19).

En résumé, pour les trois années de l'étude, *B. afzelii* prédomine chez les tiques récoltées sur les participants, comme elle prédomine également chez les tiques libres, mais cette prédominance est beaucoup plus marquée chez les tiques récoltées sur les patients.

III.2.4.3 Prévalence d'infection des tiques récoltées sur les participants par *B. burgdorferi* s/ déterminée par Real Time PCR

Sur les 333 tiques analysées par RLB, 272 tiques (83 femelles, 183 femelles, 3 mâles, 3 larves) ont également été analysées par RT PCR (analyses réalisées par F. Jouda). Soixante et un échantillons de tiques n'ont pu être analysés, car ils étaient épuisés. Cinquante et une tiques (18.75%, 51/272) se sont avérées positives, dont 34 nymphes (66.6%) et 17 femelles (33.3%).

Soixante tiques sur 272 (22.1%) se sont avérées infectées en RLB et/ou en RT PCR. Parmi elles, 30 sur 60 (50%) étaient infectées en RLB et en RT PCR, 9/60 (15%) positives seulement en RLB et 21/60 (35%) positives seulement en RT PCR (tableau 23). La RT PCR est significativement plus sensible que la RLB (test binomial, $p=0.0428$).

Parmi les tiques positives en RT-PCR, 50% des tiques démontre une quantité d'ADN inférieure à 5000 Borrélie/ 2 μ l et 28 % une quantité d'ADN supérieure à 50'000 borrelies/ 2 μ l (tableau 24). Chez les tiques positives en RLB et en RT PCR, la quantité d'ADN détecté varie de 158 à 33'800'000 borrelies/2 μ l et 59.9% des tiques présentent plus de 10'000 borrelies/2 μ l (tableau 25). Chez les tiques positives en RT-PCR mais négatives en RLB, les quantité d'ADN varient de 33.9 à 2'340'000 borrelies/2 μ l et 90.5% de ces tiques présentent moins de 5'000 borrelies/2 μ l (tableau 26). Pour connaître la quantité approximative de borrelies par tique, les résultats donnés en RT PCR (représentatifs de 2 μ l de solution d'extraction d'ADN) sont multipliés par 15, puisque l'extraction d'ADN d'une tique produit environ 30 μ l d'une solution contenant l'ADN.

Les taux d'infection des tiques récoltées sur les participants, avec l'une ou l'autre des méthodes, sont les suivants :

- En 2003, 16.9% (11/65) des nymphes et 41.7% (10/24) des femelles récoltées sur les participants sont infectées par *B. burgdorferi* sl.
- En 2004, 20.5% (18/88) des nymphes et 28.6% (10/35) des femelles sont infectées par *B. burgdorferi* sl.
- En 2005, 33.8% (25/74) des nymphes et 12.5% (5/40) des femelles sont infectées.

Le taux d'infection des nymphes récoltées sur les participants en 2005 est significativement le plus élevé (test du chi carré, $p=0.04$), alors que chez les femelles, c'est en 2003 que ce taux est le plus grand (test du chi carré, $p=0.03$).

En comparant les taux d'infection des tiques (nymphe et femelle) récoltées sur les participants avec les taux d'infections des tiques libres (nymphe et adulte) selon l'année, aucune différence significative n'est observée (test du chi carré, $p > 0.05$), à l'exception des femelles de l'année 2005, où 12.5% des femelles récoltées sur les participants sont infectées, contre 41.6% d'adultes libres (test du chi carré, $p = 0.0008$).

III.2.4.4 Détermination du degré de gorgement des tiques récoltées sur les participants

Cent nymphes et quarante femelles d'*I. ricinus* ont été placées sur des animaux de laboratoire, puis détachées à des intervalles déterminés afin d'évaluer la durée d'attachement d'une tique à partir de son indice scutal.

III.2.4.4.1 Analyse par régression non linéaire

Un modèle de régression non linéaire a été appliqué avec le programme S-Plus (réalisé par Jacqueline Moret, Université de Neuchâtel) afin d'évaluer la durée d'attachement (gorgement) d'une tique à partir de l'indice scutal (IS). Pour les nymphes et les femelles, une relation positive est obtenue entre l'indice scutal et la durée d'attachement : $IS = A + B / (1 + \exp(-C(t - t_0)))$, où IS est une fonction à 4 paramètres du temps de gorgement (figure 20). Les paramètres A, B, C and t_0 sont reportés dans le tableau 27.

Pour les nymphes, l'équation non linéaire résultante est la suivante (figure 21): $IS = 1.95867 + 2.62168 / (1 + \exp(-0.105958(t - 51.6475)))$.

Pour les femelles, l'équation non linéaire résultante est la suivante (figure 22): $IS = 1.75865 + 3.18091 / (1 + \exp(-0.0455605(t - 74.978)))$.

III.2.4.4.2 Repas sanguin des tiques

L'indice scutal moyen (\pm erreur standard (ES)) des différents temps d'attachement des nymphes nourries expérimentalement sur les animaux de laboratoire est donné dans le tableau 28. L'analyse de variance sur les données distribuées de manière normale indique qu'il existe un effet significatif du temps d'attachement des nymphes sur l'indice scutal ($p < 0.05$). Par contre, l'analyse de variance de l'indice scutal des nymphes détachées à 0 et 24 heures de gorgement ne démontre pas d'effet significatif du temps sur leur taille ($p > 0.05$). Cependant, en comparant la taille des nymphes à 24 et 48 heures, 48 et 72 heures, ainsi qu'à 72 et 96 heures, on observe une différence significative pour chaque groupe de temps ($p < 0.05$).

L'indice scutal moyen (\pm erreur standard (ES)) des différents temps d'attachement des femelles nourries expérimentalement sur les animaux de laboratoire est donné dans le tableau 28. L'analyse de variance sur les données distribuées de manière normale indique qu'il existe un effet significatif du temps d'attachement des femelles sur l'indice scutal ($p < 0.05$). Comme pour les nymphes, l'analyse de variance ne démontre pas de différence significative entre des femelles attachées 0 h et des femelles attachées 24 h ($p > 0.05$). Mais en comparant la taille des femelles à 24 et 48 heures, 48 et 72 heures, ainsi qu'à 72 et 96 heures, on observe une différence significative pour chaque groupe de temps ($p < 0.05$).

III.2.4.4.3 Tiques récoltées sur les participants à l'étude épidémiologique

Pour que la durée d'attachement d'une tique puisse être estimée, celle-ci devait être intacte. Ainsi, l'état de conservation des tiques reçues a été estimé comme « vivante », « morte et intacte » et « morte et partielle » (tableau 29). Au total, 67.4% (161/239) des nymphes et 81.9% (86/105) des femelles étaient intactes (vivantes ou mortes), 36.4% (87/239) des nymphes et 51.4% (54/105) des femelles étaient vivantes.

Les durées d'attachement des nymphes récoltées sur les participants ($n=474$) ont été calculées à partir de l'équation de régression non linéaire (figure 21) pour 171 nymphes. La durée d'attachement moyenne des nymphes est de 31.6 heures ($+2.6$ (ES)). Parmi ces nymphes, 36.3% (62/171) sont restées attachées moins de 24 heures et 63.7% (109/171) ont été enlevées après 24 heures (tableau 30). Si le temps d'attachement est analysé en fonction de l'âge de la victime, aucune différence significative n'est observée (test exact de Fisher, valeur $p > 0.05$), bien que la classe d'âge des 10-19 ans compte le plus grand pourcentage de nymphes attachées plus de 24 heures (85.7%), suivi par celle des 50-59 ans avec 80.6% des nymphes attachées plus de 24 h (tableau 31). Lorsque le site d'attachement des tiques est pris en considération, aucune différence significative n'est trouvée en fonction de la durée d'attachement (test exact de Fisher, valeur $p > 0.05$), bien que le cou et le tronc présentent de hauts pourcentages de nymphes attachées plus de 24 heures (tableau 32).

Les durées d'attachement des femelles ont été calculées à partir de l'équation de régression non linéaire (figure 22) pour 90 femelles d'*I. ricinus* récoltées sur les participants à l'étude. La durée d'attachement moyenne des femelles est de 29.6 heures ($+3.2$ (ES)). Parmi ces femelles, 57.8% (52/90) ont été enlevées avant 24 heures d'attachement et 42.2% (38/90) ont été enlevées après 24 heures (tableau 30). Comme

pour les nymphes, aucune différence significative n'est trouvée lorsque la durée d'attachement est analysée en fonction de l'âge de la victime (test exact de Fisher, valeur $p > 0.05$), bien que la classe d'âge des 0-9 ans présente le plus haut pourcentage de femelles attachées plus de 24 heures (83.3%) (tableau 31). Lorsque le site d'attachement est examiné, il n'y a aucune différence significative en fonction de la durée d'attachement (test exact de Fisher, valeur $p > 0.05$), bien que la zone du cou (66.7%) démontre un haut pourcentage de femelles attachées pour plus de 24 heures (tableau 32).

On observe que la plupart des nymphes sont enlevées après 24 heures de repas sanguin (63.7%, 109/171), au contraire des femelles qui sont détectées plus vite et enlevées avant 24 heures (57.8%, 52/90) (test du chi carré, $p=0.001$). Les participants ont-ils détecté les tiques plus ou moins rapidement selon l'année ? Si les durées d'attachement des tiques sont comparées d'année en année, on remarque qu'en 2004, environ 74% des nymphes ont été enlevées après 24 heures, alors qu'en 2003 et 2005, environ 60% des nymphes ont été détectées à ce moment (tableau 33). Mais les différences entre ces 3 années ne sont pas significatives (test du chi carré, $p=0.12$). Quant aux femelles, 18.2% ont été retirées après 24 heures en 2003, ce qui est bien moins que ce qui a été observé en 2004 et 2005, respectivement 54.2% et 47.7% (test du chi carré, $p=0.02$) (tableau 33).

III.3 Etude séroépidémiologique

III.3.1 Critères d'inclusion à l'étude sérologique

Comme mentionné dans le chapitre matériel et méthodes, des critères d'inclusion à l'étude sérologique ont été fixés. Un délai maximum de 6 jours entre la piqûre de tique et la première prise de sang était souhaité. Ce délai a été étendu à 9 jours et toutes les personnes présentant un délai entre la piqûre de tique et la première prise de sang jusqu'à 9 jours ont donc été incluses dans l'étude sérologique. Un délai de 8 semaines entre les deux prises de sang était également demandé. Ce délai a été étendu à 12 semaines maximum.

Un certain nombre de participants n'ont pas pu être inclus : ceux pour qui le délai de 9 jours entre la piqûre de tique et la première prise de sang était dépassé (8 participants), ceux dont le délai entre les 2 prises de sang était supérieur à 12 semaines (33 participants), ceux qui ont reçu un traitement antibiotique à la première consultation (18

participants) ou entre les 2 consultations (13 participants), ceux présentant des manifestations cliniques (19 participants) et ceux ayant subi une nouvelle piqûre de tique entre les deux consultations (26 participants). Un total de 64 personnes n'a pu être inclus, car elles se sont fait piquer ailleurs que sur le Littoral neuchâtelois. Six personnes ont dû être exclues, car un des deux sérums était épuisé et n'a donc pu être analysé. Plusieurs participants ont démontré plusieurs critères d'exclusion.

Un total de 255 personnes, remplissant tous les critères, ont été inclus dans l'étude sérologique : en 2003, 74 participants (37 femmes et 37 hommes) ont pu être inclus dans l'étude sérologique, 95 participants (47 femmes, 47 hommes et 1 inconnu) en 2004 et 86 participants (48 femmes et 38 hommes) en 2005. La moyenne d'âge est de 43 ans, le plus jeune participant ayant une année et le plus âgé 94 ans. La première prise de sang a eu lieu en moyenne 2 jours après la piqûre de tique (selon la réponse du participant dans le premier questionnaire) et la période séparant les deux prises de sang est de 9 semaines en moyenne. Parmi ces 255 participants, 9 (3.5%) ont été piqués à plusieurs reprises, 7 personnes piquées à 2 reprises, ont donné 4 échantillons de sang. Deux autres personnes, piquées à 3 reprises, ont donné, respectivement, 6 et 4 échantillons de sang. A chaque nouvelle déclaration de piqûre, ces personnes ont été enregistrées comme nouveau participant, car elles avaient déjà donné un deuxième échantillon de sang pour la piqûre précédente.

Cinquante-deux participants n'ont pas pu rapporter la date à laquelle ils se sont fait piquer. Si les autres critères demandés étaient remplis, ils ont quand même été inclus dans l'étude sérologique (36 participants).

III.3.2 Séroprévalence chez la population de contrôle et calcul du seuil de séroconversion

La population de contrôle est composée de 14 femmes et 7 hommes, âgés de 20 à 43 ans. Deux sérums leur ont été prélevés à 8 semaines d'intervalle, pendant la saison de faible activité des tiques (hiver). Ces volontaires n'avaient pas souvenir d'avoir été piqués par des tiques durant l'année passée, ni d'avoir développé des symptômes de Borréliose de Lyme. Parmi eux, 20 personnes sont des collaborateurs de l'Institut de Zoologie de l'Université de Neuchâtel et une autre personne est un militaire professionnel. Trois de ces personnes (14.3%) ont présenté un taux positif d'IgM dans la 1^{ère} prise, ainsi que

dans la deuxième en MEIA (figure 23). Les résultats de WB confirment la positivité chez un de ces volontaires, donnant une séroprévalence en IgM de 4.8% (1/21). Une personne (4.8%) a présenté un taux positif d'IgG dans la 1^{ère} et 2^{ème} prise en MEIA (figure 24) et l'analyse en WB confirme la positivité de ses deux sérums, donnant une séroprévalence en IgG de 4.8% (1/21) également.

D'après la distribution des différences d'indice en MEIA entre les deux sérums de la population de contrôle, la valeur de la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la distribution a été calculée, pour avoir 95% de ces différences en-dessous de cette valeur. Cette limite supérieure vaut 0.236 pour les IgM et 0.077 pour les IgG ($p=0.05$) (figure 25). Une augmentation de plus de 0.236 entre deux sérologies pour les IgM et 0.077 pour les IgG a été considérée comme une séroévolution significative ($p=0.05$).

III.3.3 Séroprévalence chez la population d'étude

III.3.3.1 Séroprévalence initiale en IgM et en IgG pour les 3 années de l'étude

Pour rappel, chaque participant s'est vu prélever deux échantillons de sang : le premier a permis d'établir le statut sérologique initial de la personne au moment de la piqûre de tique ; le deuxième, prélevé entre 8 et 12 semaines après la première prise de sang, a pour but de détecter une éventuelle infection asymptomatique par *B. burgdorferi* sl. Lorsque le premier sérum a présenté un taux équivoque ou positif d'anticorps IgM ou IgG en MEIA, ou une séroévolution significative, un test de confirmation par WB a été effectué sur la paire de sérums. L'établissement de la séroprévalence initiale en IgM ou IgG est basé sur les résultats obtenus en WB.

Parmi les 255 participants, 16 personnes, dont 5 hommes (4.1%, 5/122), 11 femmes (8.3%, 11/132), avaient des anticorps IgM anti-*B. burgdorferi* sl dans le premier sérum, donnant une séroprévalence initiale de 6.3% (figure 26). Il n'existe pas de différence significative entre la séroprévalence en IgM observée chez le groupe contrôle et la séroprévalence initiale chez la population d'étude (test du chi carré, $p=0.34$), de même qu'entre la séroprévalence initiale chez les femmes et chez les hommes (test du chi carré, $p=0.25$). La majorité des sérums de 1^{ère} prise est négative en IgM par le test MEIA (85.1%, 217/255) (figure 26).

Pour les IgG, la séroprévalence initiale est de 2.7% (7/255), avec 6 femmes (4.5%, 6/132) et 1 homme (0.8%, 1/122), présentant des anticorps IgG anti-*B. burgdorferi* sl au niveau

de la première prise de sang. En MEIA, la majorité des sérums de 1^{ère} prise est également négative en IgG (92.6%, 236/255) (figure 27). La différence entre la séroprévalence en IgG observée chez le groupe contrôle et la séroprévalence initiale chez la population d'étude n'est pas significative (test du chi carré, $p=0.88$), de même que celle observée entre les femmes et les hommes (test du chi carré, $p=1$). Parmi les 255 participants, 1 personne a démontré dans le premier sérum un taux positif en IgM et en IgG, confirmé en WB (0.4%, 1/255).

Les séroprévalences initiales (confirmées par WB) selon l'année sont résumées dans le tableau 34. Il n'existe aucune différence significative entre les séroprévalences initiales en IgM et en IgG d'après l'année (test exact de Fischer, $p>0.05$).

III.3.4 Séroconversions et séroévolutions significatives asymptomatiques

Un des principaux buts de cette étude est de déterminer la prévalence des séroconversions et des séroévolutions significatives asymptomatiques après une piqûre de tique. Pour rappel, une séroconversion a été définie comme le passage d'un indice négatif à un indice positif par le dosage MEIA. Le passage de négatif à équivoque ou d'équivoque à positif est considéré comme étant une séroconversion si la différence d'indice entre les deux sérums est égale ou supérieure à la valeur de la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la distribution, calculée à partir du groupe contrôle négatif (cf. chapitre III.3.2). Cette limite supérieure vaut 0.236 pour les IgM et 0.077 pour les IgG ($p=0.05$). Donc, une augmentation de plus de 0.236 entre deux sérologies pour les IgM et 0.077 pour les IgG a été considérée comme une séroévolution significative.

Un test de confirmation par WB a été effectué sur chaque paire de sérums ayant présenté une séroconversion ou une séroévolution significative en MEIA. L'établissement du taux de séroconversions et de séroévolutions significatives en IgM ou IgG est basé sur les résultats obtenus en WB.

III.3.4.1 Séroconversions et séroévolutions significatives asymptomatiques en IgM

Seize participants (6.3%, 16/255) ont présenté un mouvement sérologique significatif au niveau des IgM en MEIA, sans avoir développé de manifestations cliniques (tableau 35).

Parmi ces 16 mouvements sérologiques significatifs, deux catégories principales sont distinguées :

- I. *Séroconversions* : 11 personnes (4.3%) sur 255 ont démontré une séroconversion en MEIA (tableau 35). Parmi ces 11 participants, seules 5 personnes ont montré une évolution sérologique visible en WB. Les seconds sérums de ces 5 personnes (participants n°14, 28, 44, 161, 439) ont démontré soit une augmentation de l'intensité des bandes correspondant à p41 et à OspC, soit l'apparition de la bande correspondant à p41 (figure 28). Il est intéressant de noter que ces 5 participants sont passés en MEIA d'un indice négatif à positif, avec une différence de taux entre les deux sérums supérieure à 0.363. De plus, un de ces 5 participants (n°161) a également manifesté des taux positifs d'IgG avec une séroévolution positive. Chez 4 autres personnes, les résultats en WB sont positifs (score total de la bandelette ≥ 3 pts), mais il n'y a pas de différences visibles entre les deux sérums. Ceci s'explique peut-être par le fait que, en MEIA, leur premier sérum présentait un taux équivoque et le deuxième un taux positif. A noter qu'une paire de sérum, celle qui est passé d'un indice négatif à équivoque, n'a pu être testée à cause de l'épuisement du 2^{ème} sérum.

Donc, 5 séroconversions en IgM sur 11 ont pu être confirmées par WB : 3 (4.1%, 3/74) en 2003, 1 (1.1%, 1/95) en 2004 et 1 (1.2%, 1/86) en 2005. Il s'agit de quatre hommes (3.3%, 4/122) et 1 femme (0.8%, 1/132), dont l'âge varie de 6 à 78 (médiane : 52 ans). La classe d'âge la plus touchée est celle des 70-79 (40%, 2/5).

De plus, un participant (n°236) a présenté une séroconversion en WB, qui n'apparaissait pas comme séroconversion en MEIA, la différence entre les deux sérums étant inférieure à 0.236 (0.149). Les résultats en WB démontrent l'apparition des bandes correspondant à la p41 et à la p18 sur la souche B31 dans la deuxième prise.

Ainsi, 6 séroconversions en IgM ont été observées en WB.

- II. *Séroévolutions significatives*: Cinq participants (2%, 5/255) ont développé une séroévolution significative en MEIA (tableau 35). Parmi eux, seul un participant (n°131), avec des taux positifs dans les deux sérums (respectivement 4.5 pts et 5.5 pts en WB sur les 3 souches), a vu son évolution en MEIA confirmée par WB. Les bandes correspondant à p60 (sur la souche NE83), p41 (sur les 3 souches) et OspC (sur la souche NE83) ont augmenté d'intensité dans le 2^{ème} sérum (figure 29). Chez

les 4 autres participants, des taux négatifs dans les deux sérums ont été observés en MEIA.

A noter le cas d'un sixième participant présentant des taux positifs dans les deux sérums (respectivement 5.5 pts et 7 pts en WB sur la souche NE17), mais chez qui une séroévolution significative n'a pu être définie en MEIA (la différence de taux entre ces 2 sérums est égale à 0.214). Cependant, un renforcement des bandes protéiques correspondant à p41 et à OspC (sur les souches B31, NE83 et NE17) et à p39 (sur la souche NE17) est clairement observé au niveau du 2^{ème} sérum (figure 29). En se basant donc sur ces résultats, une séroévolution significative est démontrée chez ce participant.

Deux séroévolutions significatives en IgM ont donc été confirmées par WB : une (1.4%, 1/74) a été observée en 2003 et une (1.2%, 1/86) en 2005. Il s'agit de 2 femmes (1.5%, 2/132), âgées de 11 et 42 ans.

En résumé, parmi les 16 mouvements sérologiques significatifs détectés en MEIA, huit (50%) ont été confirmés par WB : 4 ont été observés en 2003, 2 en 2004 et 2 en 2005. Ce qui représente 5.4% des participants (4/74) pour 2003, 2.1% (2/95) pour 2004 et 2.3% (2/86) pour 2005.

III.3.4.2 Séroconversions et séroévolutions significatives asymptomatiques en IgG

Vingt-cinq participants (9.8%, 25/255) ont développé un mouvement sérologique significatif au niveau des IgG en MEIA, sans avoir développé de manifestations cliniques (tableau 35). Parmi ces 25 mouvements sérologiques significatifs, seule une séroconversion a été confirmée par WB et a été observée en 2003.

- I. *Séroconversions* : Une seule personne (0.4%, 1/255), une femme de 83 ans, a présenté une séroconversion asymptomatique en IgG détectée en MEIA (tableau 35). Cette séroconversion a été confirmée par WB, où l'intensité de plusieurs bandes a augmenté au niveau du deuxième sérum (figure 30). Lorsque la souche B31 a été utilisée, les bandes protéiques correspondant à p90, p41, p39, ont augmenté en intensité. Les bandes correspondant à p72, p60, p54, p43 sont apparues (figure 30). Lorsque la souche NE83 est utilisée, p90, p56, p43, p39, p30 et OspC ont augmenté en intensité (figure 30). Lorsque la souche NE17 est utilisée, p90, p60, p56, p39, OspA, p30 et OspC ont augmenté en intensité dans le

2^{ème} sérum. Celles correspondant à p43, et OspB n'ont pas changé en intensité (figure 30). Les scores des deux bandelettes sont supérieures à 46 pts sur les souches NE17 et NE83.

- II. *Séroévolutions significatives* : Vingt-quatre personnes (9.4%) ont démontré une séroévolution significative en IgG détectée en MEIA (tableau 35). Parmi ces 24 personnes, 6 avaient des indices d'IgG positifs dans les deux sérums. La positivité de ces sérums a été confirmée par WB (score total des bandelettes supérieur à 46 pts sur les souches NE17 et NE83) (figure 31). Aucune de ces 24 séroévolutions n'a été confirmée en WB.

Toujours parmi ces 24 personnes, 18 personnes présentaient des taux négatifs dans les deux sérums en MEIA. Les résultats en WB de ces 18 participants étaient négatifs, mais pour 3 d'entre eux (participants n° 5, 59, 191), l'apparition ou le renforcement d'une bande au niveau du 2^{ème} sérum a été observé : renforcement de p39 dans deux cas (respectivement sur les souches B31 et NE83) et apparition de la p30 (sur la souche NE17) et de la p72 (souche NE83) dans le troisième cas (figure 32).

En résumé, neuf mouvements sérologiques ont été confirmés par les résultats de WB (8 en IgM et 1 en IgG). Nous obtenons donc un taux de séroconversions et de séroévolutions significatives asymptomatiques global en IgM et IgG de 3.5% (9/255), variant entre 6.8% (5/74) en 2003, 2.1% (2/95) en 2004 et 2.3% (2/86) en 2005.

III.3.5 Séroversions et séroévolutions négatives significatives

Chez 5 participants (2%, 5/255), une séroréversion en IgM est observée en MEIA, dont 2 ont été confirmées par WB. Quatre personnes (1.5%) ont développé une séroévolution négative significative détectée en MEIA (tableau 36), mais celles-ci ne sont pas confirmées par WB.

Cinq participants (2%, 2/255) ont manifesté une séroréversion en IgG. Une seule de ces séroréversions a été confirmée par WB. Vingt-six participants (10.2%, 26/255) ont présenté une séroévolution négative significative (tableau 36), mais aucune n'a été confirmée par WB.

III.3.6 Troisième prise de sang

Pour les participants présentant une séroévolution ou une séroconversion, ainsi qu'en cas de résultats sérologiques douteux, une troisième prise de sang a été demandée pour confirmer l'évolution. Treize personnes (30.2%, 13/43) ont accepté de donner un 3^{ème} échantillon de sang.

Parmi les 11 personnes ayant développé une séroconversion en IgM décelée en MEIA, 4 participants ont donné un troisième échantillon de sang (environ 40 semaines après la 2^{ème} prise de sang). Ces quatre personnes ont présenté une baisse significative dans leur taux d'IgM.

Parmi les 5 personnes ayant développé une séroévolution significative en IgM (taux positifs dans les 2 sérums), le participant n°131 a accepté un troisième prélèvement. Celui-ci est resté positif et le résultat en WB confirme cette positivité (score total de 5.5 pts avec la présence de 5 bandes).

Quatre personnes avec deux taux positifs en IgM, mais sans séroévolution significative, sont restées positives dans la 3^{ème} prise. Les résultats en WB pour ces 4 sérums de 3^{ème} prise attestent de la positivité de ces sérums. Deux autres personnes ayant présenté des taux équivoques en IgM dans les deux premiers sérums, ont développé respectivement un taux négatif dans la 3^{ème} prise et un taux toujours équivoque.

En ce qui concerne les IgG, un participant avec des taux positifs dans les deux premiers sérums et ayant présenté une séroévolution significative, est devenu équivoque au niveau de la 3^{ème} prise. Un autre participant, avec des taux positifs en IgG dans les deux premiers sérums, mais sans séroévolution positive significative, est devenu équivoque dans la 3^{ème} prise. Pour ces deux participants, les résultats en WB attestent d'un résultat équivoque.

En résumé, aucun de ces 13 participants n'a présenté d'augmentation d'anticorps dans ce troisième prélèvement. Six d'entre eux ont démontré des taux constants d'IgM au niveau du 3^{ème} sérum, les 7 autres ont vu leur taux diminuer. Les 2 participants avec des taux d'IgG positifs dans les deux premières prises ont également vu leur taux diminuer.

III.3.7 Evolution sérologique des participants piqués par une tique infectée par *B. burgdorferi* sl

Parmi les 255 participants à l'étude sérologique, 57 personnes (22.4%) ont été piquées par une tique infectée par *B. burgdorferi* sl (15 femelles, 28 nymphes, 1 mâle et 1 larve).

Parmi elles, quatre (7%, 4/57) ont démontré un mouvement sérologique significatif en IgM diagnostiqué en MEIA, mais un seul (1.8% ; 1/57) de ces mouvements a été confirmé par WB :

1. Le participant n°236 a présenté un indice négatif dans le 1^{er} sérum et un indice équivoque dans le 2^{ème}, mais la différence entre les deux sérums est inférieure à 0.236 (0.149) et ne peut donc pas être strictement considérée comme séroconversion en MEIA. Par contre, les résultats en WB confirment une séroconversion par l'apparition des bandes correspondant à la p41 et à la p18 sur la souche B31. Cette personne a été piquée par une nymphe infectée (gorgée environ 28 heures), mais la génoespèce de *B. burgdorferi* sl n'a pu être déterminée.
2. Le participant n°125 a été piqué par une femelle infectée par *B. afzelii*. D'après son indice scutal, cette femelle a fait un repas sanguin très court (temps de gorgement égal à 0). Testés en MEIA, le 1^{er} sérum démontre un indice équivoque d'IgM et le 2^{ème} un indice positif. Les résultats en WB sur les 3 souches attestent que les deux sérums sont positifs, mais la séroconversion n'est pas visible au niveau des bandes protéiques (figure 33).
3. Le participant n°356 a été piqué par une nymphe découverte infectée par RT PCR, avec un nombre faible de borrelies (12345 borrelies) et qui s'est gorgée pendant environ 29 heures. Une séroconversion, observée en MEIA, n'a par contre pas été observée en WB, bien que le WB sur la souche NE83 atteste d'un résultat positif pour les deux prises de sang (la bande correspondant à l'OspC est forte) (figure 33).
4. Une quatrième personne, le participant n°32, a développé une évolution sérologique significative en IgM diagnostiquée en MEIA entre les deux sérums, bien que ces deux sérums présentent un indice négatif. Elle a été piquée par une nymphe détectée positive en RT-PCR (nombre de borrelies très faible : environ

508 borrélie), mais dont l'indice scutal n'a pas pu être déterminé. Les résultats en WB sont négatifs.

Les résultats plus détaillés pour ces 4 participants sont résumés dans le tableau 37.

Six personnes (10.5%, 6/57) piquées par une tique infectée ont présenté des taux positifs en IgM mais constants dans les deux prélèvements. L'analyse en WB atteste de la positivité dans les deux sérums, mais ne permet pas de déceler une évolution sérologique significative. L'indice scutal des tiques a pu être déterminé chez quatre d'entre elles et les temps de gorgement obtenus sont 0 heure, 22.6 heures, 33.4 heures et 48.6 heures. Ces 4 tiques étaient infectées respectivement par *B. afzelii*, par une génoespèce indéterminée et les deux dernières ont été trouvées infectées en RT PCR (839 et 6510 borrélie/tique). Les deux tiques dont l'indice scutal n'a pu être déterminé étaient infectées par *B. afzelii*.

Une autre personne a démontré des taux équivoques dans les deux sérums, sans séroévolution significative (confirmée par WB). Le temps de gorgement de la tique incriminée est de 25 heures et la génoespèce n'a pu être déterminée (*B. burgdorferi* sl).

Les taux d'IgM décelés chez les 46 autres personnes piquées par une tique infectée par *B. burgdorferi* sl étaient négatifs (80.7%, 46/57).

Si on considère les participants qui ont développé un mouvement sérologique significatif et dont la tique incriminée n'était pas infectée, on constate que 4/8 participants ayant développé des IgM confirmés par WB avaient amené la tique et que 3/4 n'étaient pas infectées.

Au total, 43.3% des nymphes et des 69.2% des femelles infectées récoltées sur les participants à l'étude sérologique ont été enlevées avant 24 heures d'attachement (figure 34). *B. afzelii* a été identifiée chez près de 50% des tiques qui se sont gorgées pendant moins de 24 heures (figure 35). Le nombre de génoespèces qui n'ont pu être déterminées était plus grand parmi les tiques qui se sont gorgées pendant plus de 24 heures.

En résumé, si on considère les participants ayant présenté un mouvement sérologique significatif en IgM, la majorité des tiques récoltées sur eux n'était pas infectée. La plupart des tiques femelles et près de la moitié des nymphes infectées ont été détectées durant les 24 premières heures d'attachement. *B. afzelii* représentait près de 50% des infections chez ces tiques.

III.4 Etude des traitements préventifs

Treize participants ont reçu un traitement antibiotique préventif à la première consultation et n'ont pas développé de manifestations cliniques. Les antibiotiques prescrits sont la tétracycline (7.7%, 1/13), la doxycycline (69.2%, 9/13), la supracycline (15.4%, 2/13), l'amoxicilline (23.1%, 3/13) et l'augmentine (amoxicilline + acide clavulanique) (7.7%, 1/13). La durée de ces traitements préventifs varie d'une dose unique à 21 jours. Un participant a été traité localement à la Fucidine pendant 7 jours.

III.5 Etude clinique : manifestations cliniques et traitement antibiotique

Parmi les 361 participants chez qui deux sérums ont été prélevés, 19 cas cliniques ont été signalés (incidence clinique de 5.3%). L'EM est la manifestation clinique la plus fréquente, avec 15 cas (78.9%), dont 13 EM confirmés par un médecin et 2 diagnostiqués comme probables. Un des 2 cas d'EM estimés comme probables a été confirmé par les tests sérologiques, puisqu'une séroconversion en IgM est clairement visible en WB.

De plus, quatre participants ont déclaré les manifestations cliniques suivantes : arthralgies des doigts et des orteils (5.3%, 1/19), myalgies (5.3%, 1/19), arthralgie du poignet (5.3%, 1/19), articulations douloureuses et céphalées (5.3%, 1/19).

Si seules les manifestations cliniques certaines de la borréliose de Lyme (EM confirmés par le médecin ou par WB) sont prises en considération, l'incidence clinique pour la totalité des participants est de 3.9% (14/361). En fonction de l'année, cette incidence varie : 6.1% (6 EM sur 99) en 2003, 3.6% (5/141) en 2004, 2.5% (3/121) en 2005. Cependant, aucune différence significative n'est observée selon l'année (test du chi carré, $p = 0.1664$).

La répartition selon le sexe est équilibrée : 9 femmes (47.4%) et 10 hommes (52.6%) présentent des manifestations cliniques. L'âge des participants avec une manifestation clinique varie entre 4 et 73 ans (moyenne : 46 ans) (tableau 38).

La fréquence des manifestations cliniques selon les catégories d'âge est de 5.3% (1/19) pour les 0-9 ans, les 20-29 ans et 70-79 ans, 15.8% (3/19) pour les 30-39 ans, 21% (4/19) pour les 40-49 ans, 36.8% (7/19) pour les 50-59 ans, 10.5% (2/19) pour les 60-69 ans. La

majorité des participants avec une manifestation clinique ont entre 30 et 69 ans (figure 36).

Parmi les 14 personnes ayant développé un EM confirmé, 10 ont reçu un traitement antibiotique lors de la 1^{ère} consultation ou entre les 2 consultations. Probablement que pour les 5 autres cas d'EM, le médecin a attendu les résultats sérologiques pour administrer le traitement antibiotique. Les antibiotiques administrés sont la tétracycline (10%, 1/10), la doxycycline (40%, 4/10) et la supracycline (30%, 3/10). Pour deux patients, le nom de l'antibiotique n'a pas été indiqué. L'arthralgie des doigts et des orteils a été traitée à l'amoxicilline. La durée des traitements varie de 7 à 21 jours (tableau 39).

Sept participants ont été traités par antibiotiques entre la 1^{ère} et 2^{ème} consultation. Ces traitements ont été administrés pour traiter d'autres affections ou des surinfections au niveau de la piqûre de tique.

Au niveau sérologique, 4 participants avec un EM confirmé n'ont pas reçu de traitement antibiotique lors des consultations. L'un d'eux présente clairement une séroconversion en IgM, confirmée par Western blot. Une troisième prise de sang démontre une séroconversion en IgG. Le deuxième cas reste négatif en IgM au niveau du 2^{ème} sérum, mais présente une séroévolution positive en IgG, c'est-à-dire que le taux en IgG de son premier sérum est positif et qu'il augmente dans son deuxième sérum. Le 3^{ème} cas démontre une positivité en IgM pour les deux sérums (mais diminution du taux dans le deuxième), avec un délai de 2 jours entre la piqûre et la première prise de sang. Les résultats en WB confirment cette positivité. Le 4^{ème} cas, l'EM qui n'était pas confirmé au départ, donc sans traitement rapporté, présente une séroconversion en IgM, confirmée par WB.

Parmi les EM traités, un cas démontre un début de positivité en IgM dans le premier sérum (délai de 2 jours entre la piqûre et la 1^{ère} prise de sang), puis redevient négatif dans le deuxième sérum, sans doute suite au traitement antibiotique. Les 9 autres EM traités démontrent des taux d'IgM négatifs et sans séroévolution. Le participant avec des myalgies présente des taux élevés d'IgG, avec une augmentation au niveau du deuxième sérum. Le test de WB confirme ce résultat.

Parmi les 14 personnes ayant manifesté un EM confirmé, 8 participants avaient conservé la tique incriminée. Parmi eux, 4 ont eu une piqûre de tique infectée. Pour 3 d'entre eux, la durée de gorgement de la tique a duré plus de 24 heures. *B. afzelii* infectait 3 d'entre elles et *B. garinii* la quatrième. Le nombre de *Borrelia* n'a pu être déterminé seulement

chez deux d'entre elles. L'évolution sérologique de ces 4 participants est résumée dans le tableau 40.

En résumé, nous obtenons une incidence clinique (EM) de 3.9% (n=14). La moitié des 8 tiques conservées par les personnes ayant développé un EM était infectée, la majorité était infectée par *B. afzelii* et avait pris un repas de sang de plus de 24 heures.

III.6 Risque d'infection clinique et subclinique

Parmi les 186 personnes chez qui on a suivi l'évolution sérologique ou l'évolution clinique après la piqûre de tique et dont la tique a été examinée à la recherche de *B. burgdorferi* sl, 61 ont été piquées par une tique infectée et 125 par une tique non infectée.

Dans le groupe des personnes piquées par des tiques infectées, une (1.6%, 1/61) a démontré un mouvement sérologique significatif en IgM, confirmé par WB. Toujours parmi ces 61 participants, 4 (6.6%, 4/61) ont développé un EM.

A l'inverse, parmi les 125 personnes piquées par une tique non infectée, 3 (2.4%, 3/125) ont développé un mouvement sérologique significatif en IgM, confirmé par WB. Dans ce même groupe de personnes, 4 (3.2%, 4/125) ont développé un EM.

En résumé, le risque de développer une infection asymptomatique ou une infection clinique après une piqûre de tique infectée s'élève à 1.6% et 6.6%, respectivement, donnant un risque global de 8.2%. Dans le cas d'une piqûre de tique non infectée, le risque d'une infection subclinique s'élève à 2.4% et celui de développer une manifestation clinique est de 3.2%, soit un risque global de 5.6%.

III.7 Corrélation entre la densité des tiques infectées (CTDi), le nombre de séroévolutions significatives en IgM et le nombre d'érythèmes migrants selon l'année

L'analyse de corrélation entre la densité cumulée des nymphes infectées (CTDni) (tableau 22) et le nombre de mouvements sérologiques significatifs en IgM de 2003 à 2005 (4 en 2003, 2 en 2004 et 2 en 2005) démontre une forte corrélation (Corrélation de Pearson : $r=0.93$, $p>0.05$) mais non significative, vu le faible nombre de données. Il en est de même entre la densité cumulée des nymphes infectées (CTDni) et le nombre d'EM de 2003 à

2005 (Corrélation de Pearson : $r = 0.94$, $p > 0.05$). La corrélation entre la densité cumulée des adultes infectés (CTDai) (tableau 22) et le nombre de séroévolutions significatives en IgM de 2003 à 2005 est faible et non significative (Corrélation de Pearson : $r = -0.01$, $p = 0.99$). La corrélation entre la densité cumulée des adultes infectés (CTDai) et le nombre d'EM de 2003 à 2005 est également faible et non significative (Corrélation de Pearson : $r = 0.2$, $p > 0.05$).

IV Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié trois paramètres importants pour comprendre l'épidémiologie de la borréliose de Lyme sur le littoral neuchâtelois : la densité des populations de tiques et leur prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sI, l'incidence des séroconversions asymptomatiques et l'incidence d'apparition d'un EM après une piqûre de tique.

IV.1 Densité et prévalence d'infection des tiques libres

Notre étude confirme que Neuchâtel est une zone à risque pour la borréliose de Lyme, premièrement au point de vue de la densité des populations de tiques et de leur prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sI. Les densités de tiques en quête au printemps enregistrées dans la région de Neuchâtel sont parmi les plus élevées mesurées en Europe (Gray et al, 1998 ; Perret et al, 2000). Lors d'une étude sur l'influence de l'altitude sur la densité des populations de tiques, une densité atteignant 300 tiques/100 m² a été mesurée dans la forêt de Chaumont à Neuchâtel pendant le pic printanier (Jouda et al, 2004b). L'évolution de la population de tiques du Bois-de-l'Hôpital près de Neuchâtel est surveillée depuis 1996 et démontre de fortes variations d'une année à l'autre, dépendant principalement des variations climatiques (données non publiées). Pendant les 3 années de l'étude, 2003 a été celle ayant présenté la plus haute densité printanière de tiques, avec 163 nymphes/100 m², puis a diminué graduellement les deux années suivantes. La date à laquelle la densité est maximale dépend de la température des premiers mois de l'année et l'apparition d'un pic d'abondance en automne dépend des températures des mois printaniers (Perret, 2003a). Une année très sèche peut afficher un déficit de saturation élevé au printemps, provoquant ainsi une forte mortalité des tiques, en particulier des nymphes (Perret et al, 2000).

La prévalence annuelle d'infection des tiques diffère d'une année à l'autre et d'une région à l'autre et peut être différente d'une année à l'autre dans une même région. De 2003 à 2005, au Bois-de-l'Hôpital, la prévalence d'infection des nymphes n'a pas présenté de différences significatives (respectivement 26%, 22.2% et 27.6%), alors que chez les adultes, celle-ci était de 41.6% en 2005, significativement plus haute que pour les années 2003 et 2004. Dans la même région, sur la montagne de Chaumont, Jouda et collaborateurs (2004b) ont constaté des taux variant entre 8% et 28% chez les nymphes et entre 19% et 43% chez les adultes. Pour comparaison, les taux d'infection par *B. burgdorferi* sI en Suisse varient de 5% à 48% (Aeschlimann et al, 1987 ; Péter et al,

1995 ; Jouda et al, 2003, 2004a et 2004b). La prévalence d'infection des adultes est plus élevée que celle des nymphes, en raison du plus grand nombre de repas sanguins pris par les tiques arrivant au stade adulte. La combinaison de ces deux notions, soit la densité des populations de tiques et leur prévalence d'infection avec *B. burgdorferi* sl, détermine le risque de rencontrer une tique infectée dans une région. Ainsi, pour les années nous concernant, soit de 2003 à 2005, le risque maximal de rencontrer une tique infectée a été constaté en 2003, avec 42.4 nymphes infectées par 100 m². Ce risque a ensuite diminué graduellement les deux années suivantes. Le nombre de tiques infectées par an et par 100 m² (CTDi) est également le plus élevé en 2003 et diminue graduellement les deux années suivantes. Lors d'une étude entreprise sur plusieurs sites en Suisse de 1999 à 2001, des densités de tiques infectées allant de 2 à 30 tiques infectées par 100 m² ont été rapportées, le risque maximal ayant été observé dans la forêt bordant la ville de Neuchâtel, où 69 tiques par 100 m² étaient infectées (Perret, 2003a; Gern, 2004).

Cinq des six génoespèces de *Borrelia* trouvées en Europe, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae* ont été observées pendant cette étude. La présence simultanée de ces 5 génoespèces dans cette région a déjà été constatée par Jouda et al (2004b). Dans le Bois-de-l'Hôpital, les génoespèces les plus fréquentes sont *B. afzelii* et *B. garinii*, suivi de *B. valaisiana* et de *B. burgdorferi* ss. *B. lusitaniae* n'est trouvée que sporadiquement, en effet dans cette étude, une seule tique, une nymphe, a été trouvée infectée par cette génoespèce, qui n'est pas fréquente en Europe, à l'exception du Portugal (Gern et al, 1999 ; De Michelis et al, 2000 ; Jouda et al, 2004b). La fréquence de ces différentes génoespèces varie d'une année à l'autre dans une même région. Pendant les 3 années de l'étude, la génoespèce prédominante chez les nymphes et les adultes est *B. afzelii*, suivie par *B. garinii*. Ceci corrobore l'observation de Casati et al dans le canton de Neuchâtel, en Valais et au Tessin (Casati et al, 2004), où *B. afzelii* était la génoespèce prévalente. Jouda et al ont observé de 1999 à 2001 une prédominance de *B. garinii* sur la montagne de Chaumont (Jouda et al, 2004b), sur le Plateau suisse et dans une vallée alpine (Jouda et al, 2004a), ainsi qu'au Tessin (Jouda et al, 2003). Chez 63 tiques infectées, nous n'avons pas pu déterminer la génoespèce. Ces 63 échantillons se sont hybridés avec les sondes non spécifiques SL₁, SL₂ et SL₃, ce qui montre qu'il s'agit d'une génoespèce appartenant au complexe *B. burgdorferi* sl. Ces tiques pourraient donc être infectées par *B. spielmanii*. En effet, il s'agit de la seule génoespèce présente en Europe dont la présence n'a pu être testée en RLB, par manque de la sonde spécifique.

Cent tiques récoltées au Bois-de-l'Hôpital ont démontré une infection en IF, mais qui n'a pas été décelée en culture et en PCR. Ces tiques pourraient être infectées par des spirochètes ressemblant à ceux des fièvres récurrentes (Richter et al, 2003). Cette nouvelle espèce, désignée comme *Borrelia* nov. sp, est étroitement apparentée à *B. miyamotoi* et a été observée en Amérique du nord et en Europe. Les amorces utilisées en PCR pour détecter une infection par *B. burgdorferi* si ne permettent pas d'amplifier l'ADN de ce spirochète et l'IF ne permet pas de les différencier. En Europe centrale, ce spirochète infecte communément la tique *I. ricinus* en quête, représentant environ 10% de toutes les tiques infectées par des spirochètes (Richter et al, 2003).

IV.2 Etude épidémiologique

L'épidémiologie de la Borréliose de Lyme chez l'homme est régie par trois facteurs principaux : la densité des populations de tiques, leur prévalence d'infection par *B. burgdorferi* si et la fréquentation du milieu forestier. Que ce soit par loisir ou professionnellement, un grand nombre de personnes fréquentent les forêts, surtout pendant les périodes d'activité des tiques (printemps et automne). Durant celles-ci, le nombre de piqûres est important, alors qu'il diminue durant les périodes où les tiques sont inactives (hiver). Un autre facteur important influençant l'exposition aux tiques est le comportement personnel (par exemple tendance ou réticence à quitter les chemins), qui lui-même est influencé par les conditions climatiques saisonnières. Ainsi, pendant le mois de juin 2003, qui a été très chaud, un plus grand nombre d'habitants s'est très certainement rendu en forêt à la recherche de fraîcheur, d'où un nombre de piqûres de tique plus élevé à une période de l'année où la population de tiques libres était pourtant en baisse. De plus, la situation de la ville de Neuchâtel est particulière : bordée au nord par la forêt et au sud par le lac, les sorties « en nature » se font surtout en forêt et l'exposition aux piqûres de tiques s'en trouve alors augmenté.

La population du bas du canton de Neuchâtel a conscience des risques encourus suite à une piqûre de tique, comme l'a montré le nombre de participants à l'étude. En effet, le taux de participation à la deuxième consultation était supérieur à 70% pour les 3 années et 361 personnes ont accepté de se faire prélever deux échantillons de sang. Les participants entre 50 et 59 ans sont les plus nombreux, alors que les enfants de moins de 10 ans ne représentent que 8% des participants. Une étude sur le risque de piqûre de tique et de borréliose de Lyme dans une zone forestière d'Angleterre a rapporté que les enfants étaient plus souvent piqués que les adultes (Robertson et al, 2000a). Il en est de même dans une étude sur la durée des piqûres de tiques dans une région des USA où la

borréliose de Lyme est endémique (Falco et al, 1996). La différence est que, dans ces deux études, aucun échantillon de sang n'était prélevé. Dans notre cas, la difficulté de prélever deux échantillons de sang sur de jeunes enfants a certainement dissuadé un grand nombre de parents et de médecins à les inclure dans l'étude.

Toutes les classes d'âges, à l'exception des enfants de moins de 10 ans, démontrent une majorité de piqûres au niveau des jambes. Les enfants de moins de 10 ans sont piqués majoritairement dans le cou (nuque) et la tête et des observations similaires ont été faites dans l'étude citée précédemment (Robertson et al, 2000a). Ceci s'explique peut-être par le fait que leur tête est plus souvent en contact avec la végétation. Une autre explication serait que les enfants transpirent beaucoup de la tête et ce site représente ainsi un endroit propice à l'attachement des tiques. Les différences de distribution des piqûres de tiques au niveau du corps entre les adultes et les enfants refléteraient donc des différences comportementales et physiologiques entre ces deux groupes de population.

Un total de 353 tiques a pu être obtenu à partir des 474 participants à l'étude de 2003 à 2005. Parmi elles, 67.7% étaient des nymphes et 29.7% des femelles. La fréquence plus élevée des piqûres de nymphes reflète l'abondance plus importante des nymphes par rapport aux femelles. Les piqûres de larves n'ont pas été prises en compte, car, premièrement leur piqûre passe souvent inaperçue et deuxièmement leur repas sanguin est très court. Troisièmement, leur rôle dans la transmission est peu important, la transmission transovarienne étant rare chez *I. ricinus* (Bellet-Edimo et al, 2005).

Si l'état dans lequel les tiques nous sont parvenues est considéré, il ressort que plus de femelles nous sont parvenues entières (81.9% vs 67.4% de nymphes) et vivantes (51.4% vs 36.4% de nymphes) que de nymphes. Ceci est certainement dû à la taille des femelles, qui permet de les enlever plus facilement sans les endommager. L'état des tiques reçues donne une indication quant à l'application correcte des recommandations que nous avons données à la population du Littoral neuchâtelois sur la façon d'enlever et de conserver les tiques. La prévalence d'infection par *B. burgdorferi* si des tiques récoltées sur les participants est relativement proche de celle présentée par les tiques libres, à l'exception des adultes de 2005. Dans d'autres études où les tiques ayant pris un repas sanguin ont été examinées, la prévalence d'infection des tiques récoltées sur les patients était beaucoup plus faible que celle des tiques libres (Robertson et al, 2000a ; Nahimana et al, 2004). Nahimana et al (2004) ont émis deux hypothèses à cela, soit la charge parasitaire a pu être partiellement ou totalement injectée lors du repas sanguin, soit le sang de l'hôte ingéré a pu diminuer la sensibilité des méthodes de détection par un phénomène de dilution. De plus, Gern et al (1996) ont observé que le nombre de tiques infectées chutait durant les premières heures de repas sanguin et que cette diminution pouvait s'expliquer

par trois phénomènes : premièrement, une transmission précoce des spirochètes à l'hôte peut avoir lieu. Deuxièmement, les spirochètes peuvent être détruits dans l'intestin de la tique et troisièmement, les spirochètes peuvent être éliminés de l'intestin via les fèces. Ainsi, les tiques avec un grand nombre de spirochètes dans l'intestin ont plus de chance de conserver l'infection pendant les premières heures critiques du repas sanguin, que celles avec peu de spirochètes (Gern et al, 1996). Dans notre cas, la technique de la Real Time PCR (RT PCR) a été utilisée en complément de la RLB et a permis de détecter un faible nombre de borrelies dans les tiques, ce qui expliquerait que la prévalence d'infection des tiques prélevées sur les participants se rapproche de celle des tiques libres. Malheureusement, plusieurs échantillons n'ont pu être analysés en RT-PCR, pour cause d'épuisement des échantillons. Il aurait donc été plus judicieux d'effectuer les analyses en RT-PCR et en RLB parallèlement. Pour les trois années de l'étude, *B. afzelii* prédomine chez les tiques récoltées sur les participants, comme elle prédomine également chez les tiques libres, cependant la prédominance est beaucoup plus importante chez les tiques prélevées chez les participants.

Un des plus importants facteurs de risque de transmission de *B. burgdorferi* si après une piqûre de tique est la durée d'attachement. En effet, le risque de transmission augmente avec la durée d'attachement (Crippa et al, 2002). Dans cette étude, on observe que la plupart des nymphes sont enlevées après 24 heures de repas sanguin (63.7%, 109/171), au contraire des femelles qui sont détectées plus vite et enlevées avant 24 heures (57.8%, 52/90). La petite taille des nymphes leur permet de se gorger plus longtemps avant d'être détectées et enlevées (Logar et al, 2002). Le risque de transmission est donc plus grand après une piqûre de nymphe qu'après une piqûre de femelle, même si les femelles présentent une prévalence d'infection plus élevée (Jouda et al, 2004a et b). De plus, le risque d'être piqué par une nymphe est plus grand, vu leur plus grande abondance comparée à celle des femelles (Jouda, 2004a et b). Il est intéressant de voir que les participants ont détecté les tiques plus ou moins rapidement selon l'année. En 2004 et 2005, un plus grand nombre de femelles gorgées plus de 24 heures nous est parvenu, en comparaison avec 2003. Ceci démontre peut-être que les habitants du Littoral n'ont pas été plus sensibilisés à rechercher d'éventuelles piqûres en cours d'étude puisque les tiques femelles ont été détectées toujours plus tard. La détection de « grosses » tiques les auraient alors incités à consulter par peur de développer une maladie à laquelle ils sont sensibilisés. Par contre, cette constatation ne se retrouve pas au niveau des piqûres de nymphes qui ont pu paraître moins dangereuses.

Si on considère la durée d'attachement en fonction de l'âge de la victime, aucune différence significative n'est observée. Cependant, les enfants de moins de 10 ans, ainsi

que la classe d'âge des 30-39 ans, représentent ceux qui ont détecté et enlevé le plus de nymphes avant 24 h d'attachement (respectivement 50% et 43%). Dans une étude sur la durée des piqûres de tiques dans une zone endémique des Etats-Unis, les auteurs ont observé que la durée d'attachement augmentait significativement avec l'âge de la victime (Falco et al, 1996). Ainsi, les jeunes enfants représentent la classe d'âge avec le moins de nymphes attachées plus de 48 heures, ce qui démontre qu'ils sont inspectés à la recherche de tiques durant les mois d'été. Par contre, ces derniers comptent parmi ceux, avec la classe d'âge des 60 ans et plus, qui ont le plus de femelles attachées plus de 48 heures. La même observation est faite dans notre étude, bien qu'il n'y ait pas de différences significatives. En effet, 83.3% des femelles ayant piqué les enfants de moins de 10 ans ont été enlevées après 24 heures d'attachement. Il en est de même chez les personnes de plus de 60 ans (62%).

Un autre facteur influençant la durée d'attachement d'une tique est le site anatomique de piqûre. En effet, une tique fixée sur la tête, la nuque (cou) ou dans le dos est plus difficilement décelable, en particulier pour une nymphe. Bien qu'il n'y ait pas de différences significatives, la proportion la plus élevée de nymphes attachées plus de 24 h a été trouvée dans la région du cou et de la tête. En ce qui concerne les femelles, c'est sur le cou et la tête que la plus grande proportion a été enlevée après 24 h d'attachement, mais comme pour les nymphes, ces données ne sont pas significativement différentes. Falco et ses collaborateurs ont observé dans leur étude que la durée d'attachement des tiques *I. scapularis* était influencée par le site anatomique d'attachement (Falco et al, 1996).

La durée d'attachement des tiques a pu être évaluée par l'établissement de l'indice scutal (rapport entre la longueur du corps, l'idiosome, et la largeur du scutum) (Falco et al, 1996). Un effet significatif du temps d'attachement des nymphes et des femelles est observé sur cet indice. En comparant la taille des nymphes et des femelles à 24 et 48 heures, 48 et 72 heures, ainsi qu'à 72 et 96 heures d'attachement, on constate une différence significative pour chaque groupe de temps. Par contre, l'indice scutal des nymphes et des femelles détachées à 0 et 24 heures de gorgement ne démontre pas d'effet significatif du temps sur leur taille. En effet, l'indice scutal démontre qu'il y a peu de changements dans les dimensions du corps entre 0 et 24h d'attachement et que cet indice est imprécis dans les premières heures de gorgement. Ce manque de sensibilité, à ce moment-là, est problématique dans le cas d'*I. ricinus*, puisque la transmission peut se faire avant 24 heures de gorgement (Crippa et al, 2002). Gray et al (2005) ont développé un nouvel indice, l'indice coxal, qui détecte les changements pendant les premières heures d'attachement. Ils ont remarqué que la largeur de l'abdomen se modifiait plus tôt

que la longueur de l'abdomen et l'indice coxal est déterminé par le rapport entre la largeur du scutum et la distance entre les quatrièmes coxae (base de la quatrième paire de pattes). Cet indice présente une plus grande sensibilité pendant les premières 24 heures que l'indice scutal, mais cette sensibilité se perd après 48 heures de gorgement (Gray et al, 2005). Un autre avantage de l'utilisation de l'indice coxal est que des tiques endommagées peuvent être mesurées, alors que pour définir l'indice scutal, les parties antérieure et postérieure de la tique doivent être intactes. A l'avenir, il serait plus approprié de combiner ces deux indices, afin d'évaluer plus précisément la durée du repas sanguin.

IV.3 Etude séroépidémiologique

Cette étude avait pour principal objectif d'évaluer le risque de développer une infection subclinique (séroconversion) et clinique par *B. burgdorferi* sl après une morsure de tique sur le Littoral neuchâtelois, en corrélation avec l'abondance des tiques et leur infection par *B. burgdorferi* sl. L'incidence des séroconversions asymptomatiques, l'incidence d'apparition d'un EM après une piqûre de tique et les corrélations entre la densité des tiques libres infectées et les observations cliniques au niveau de la population du bas du canton de Neuchâtel ont été étudiées afin de déterminer ce risque.

Un total de 255 personnes, remplissant tous les critères, a pu être inclus dans l'étude sérologique. Aucun symptôme de borréliose de Lyme n'a été observé chez ces participants et aucun d'eux n'a reçu de traitement antibiotique entre la 1^{ère} consultation et la deuxième, ceci étant un critère d'inclusion dans l'étude sérologique. En 2003, 74 participants ont été inclus dans l'étude sérologique, 95 participants en 2004 et 86 participants en 2005.

La sensibilité et la spécificité du test MEIA utilisé dans cette étude ont été évaluées dans une étude portant sur l'évaluation de plusieurs kits de diagnostic de la Borréliose de Lyme (Cermakova et al, 2005). Un des deux meilleurs résultats a été obtenu par ce test, avec une spécificité de 83% et une sensibilité de 74% (Cermakova et al, 2005). Cependant, une spécificité minimale de 90% est recommandée pour un test ELISA (http://www.oeghmp.at/eucalb/diagnosis_serology-minstandards.html), d'où la nécessité de pratiquer un test de confirmation par WB. Le test MEIA n'est actuellement plus utilisé dans les laboratoires de diagnostic, car des tests plus performants sont disponibles aujourd'hui. La confirmation par le WB est donc indispensable afin de palier à d'éventuels

problèmes de performance et c'est pourquoi seuls les résultats confirmés par WB ont été pris en compte.

La séroprévalence des anticorps anti-*B. burgdorferi* sI IgM et IgG chez la population de contrôle est de 4.8% (1/21), en se basant sur les résultats de WB. Lors d'une étude précédente en Suisse, la séroprévalence en IgG a été évaluée dans deux populations dites « à non risque » : une population vivant à plus de 1000 mètres d'altitude a présenté une séroprévalence de 3.9% et un groupe de population ne pratiquant pas la course d'orientation a démontré une séroprévalence de 6% (Fahrer et al, 1991 ; Zhioua et al, 1998). Dans une autre étude, des donneurs de sang des régions de Bâle, Berne, Zürich et Lausanne, présentaient une séroprévalence de 10.7% pour les IgG et de 4.1% pour les IgM (Altpeter et al, 1992). Cependant, la comparaison de la séroprévalence de notre population de contrôle avec celle de ces différents groupes doit être faite avec prudence, car les tests utilisés dans ces précédentes études sont différents. La détermination de la séroprévalence de la population dite de contrôle permet de donner une indication quant à la fréquence des piqûres de tiques au sein de cette population. En comparant la séroprévalence initiale du groupe de personnes étudiées (6.3% pour les IgM et 2.7% pour les IgG en WB) et celle de la population de contrôle, aucune différence significative n'a été observée. Ce résultat démontre que les participants à cette étude ne sont pas soumis à un plus grand risque de se faire piquer par une tique infectée que la population générale du Littoral neuchâtelois. Au sein de cette population, aucune différence significative de séroprévalence initiale n'a été observée entre les hommes et les femmes. Les hommes et les femmes n'ont apparemment pas de comportements distincts qui conduiraient à une plus grande exposition aux piqûres de tiques. De plus, on observe que notre population d'étude ne représente pas une population à risque particulier, car la séroprévalence observée dans ce groupe est plus faible que celle observée dans des populations exposées régulièrement aux piqûres de tiques. En effet, plusieurs études ont établi que la séroprévalence dépendait essentiellement des contacts réguliers avec le milieu forestier et du nombre de piqûre de tiques. Ainsi, les forestiers et les coureurs d'orientation, représentent clairement les populations les plus exposées, avec une séroprévalence en IgG entre 26 et 35% (Nadal et al, 1989 ; Gern et al 1989 ; Fahrer et al, 1991 et 1998; Zhioua, 1998 ; De Marval, 1994). Le risque encouru par les autres populations à faible risque est plus variable et dépend principalement de la densité des populations de tiques et de leur infection par *B. burgdorferi* sI (De Marval, 1994). La séroprévalence en IgG chez ces populations varie de 4 à 15% (Fahrer et al, 1991 ; Zhioua, 1998 ; Altpeter et al, 1992 ; De Marval, 1994).

Le développement d'un mouvement sérologique significatif suite à la piqûre de tique permet de détecter une éventuelle infection subclinique. Les mouvements sérologiques au niveau des IgM sont les marqueurs d'une infection récente, alors que les anticorps IgG sont les marqueurs d'une infection plus ancienne. Cependant, en cas de réinfection, une augmentation significative des IgG peut être observée, sans qu'il y ait apparition d'IgM spécifiques (Eiffert et al, 1996). Le prélèvement du deuxième échantillon a eu lieu entre 8 et 12 semaines après le premier, le développement d'anticorps spécifiques prenant place plusieurs semaines après l'infection (Steere, 1989). Les paires de sérums ont tout d'abord été testées en MEIA, puis les paires ayant présenté des taux positifs ou équivoques d'anticorps anti-*B. burgdorferi* sI, ou un mouvement sérologique significatif ont été testées en WB. Afin de déterminer le taux de mouvements sérologiques significatifs (réelles séroconversions et séroévolutions significatives), nous nous sommes basés uniquement sur les résultats de WB, afin d'exclure les variations dues aux caractéristiques intrinsèques du test MEIA. Ainsi, seules 45.5% (5/11) des séroconversions en IgM observées en MEIA ont pu être confirmées en WB. Il est intéressant de noter que ces 5 paires de sérums, ayant démontré une séroconversion en IgM confirmée en WB, sont passées d'un indice négatif à positif en MEIA. Une séroconversion supplémentaire a été découverte en WB, donnant ainsi 6 séroconversions confirmées par WB. Les 4 paires de sérums, qui sont passées d'un indice équivoque à positif en MEIA, n'ont pu être confirmées comme séroconversion en WB. Par contre, les résultats en WB montrent que ces 4 paires sont positives. Il est probable que la faible différence de taux d'anticorps entre les deux sérums (différence d'indice entre 0.236 et 0.357) en MEIA ne permette pas de détecter une différence visible entre les deux sérums en WB.

Parmi les séroévolutions significatives en IgM (n=5) et en IgG (n=24) observées en MEIA, une seule séroévolution significative en IgM (1/29, 3.5%) a été confirmée en WB. Pour les autres paires de sérums, la variation de taux observée en MEIA est peut-être uniquement due à la variabilité intrinsèque du test. Si ces paires avaient été testées plusieurs fois, cette variation de taux n'aurait peut-être pas été observée en MEIA. En se basant sur les résultats en WB, un mouvement sérologique significatif en IgM supplémentaire a été découvert, la différence entre les deux sérums n'étant pas significative en MEIA.

Le faible taux de confirmation obtenu par WB démontre que le seuil de séroévolution significative est trop bas. La population de contrôle formée de 21 volontaires est trop petite pour permettre l'établissement d'un seuil significativement valable.

Nous obtenons donc un taux de séroconversions asymptomatiques en IgM et IgG de 3.5% (9/255), variant entre 6.8% (5/74) en 2003, 2.1% (2/95) en 2004 et 2.3% (2/86). Plusieurs études ont évalué les taux de séroconversions dans différentes populations : un

taux de séroconversions asymptomatiques de 4.6% a été observé dans une population d'une région endémique de Suède (Gustafson, 1992). Des taux plus faibles (1.5%) ont été reportés chez des militaires hollandais (Vos et al, 1994). A l'inverse, une population de forestiers allemands a démontré un taux de séroconversion plus élevé, de l'ordre de 5-7% (Rath et al, 1996). Cependant, peu d'études ont porté sur le risque d'infection suivant une piqûre de tique : une étude comparable à la nôtre a été effectuée en Suisse Romande, où un taux de séroconversions asymptomatiques de 4.5% après une piqûre de tique a été observé (Nahimana et al, 2004). Mais la comparaison de ces différents taux doit être faite avec prudence, les protocoles d'études n'étant pas similaires. Premièrement, les périodes entre les deux prises de sang peuvent différer d'une étude à l'autre : une année dans l'étude de Gustafson (1992), 2 mois dans celle de Nahimana (2004) et 9-12 mois dans l'étude de Vos (1994). Deuxièmement, les critères d'inclusion ne sont pas les mêmes : dans l'enquête de Nahimana (2004), seules les personnes avec une sérologie négative dans la 1^{ère} prise ont été incluses. Troisièmement, la comparaison de tests sérologiques différents est difficile, les souches de *B. burgdorferi* si utilisées comme antigènes et les critères d'interprétation n'étant pas les mêmes (Guy et al, 1998 ; Nahimana et al, 2004). Les séroconversions asymptomatiques semblent être fréquentes en Suisse, où la séroprévalence est relativement élevée parmi les populations des zones endémiques et parmi les populations dites à risque (Gern et al, 1989 ; Fahrner et al, 1991, 1998 ; Nahimana et al, 2004). Les sujets séropositifs et asymptomatiques ne semblent pas avoir un plus grand risque de développer des manifestations cliniques tardives. Fahrner et al (1998) n'ont pas observé de risque plus élevé de développer des symptômes chez de tels sujets sur une période de 7 ans. Dans notre étude, il serait également très intéressant de suivre les personnes ayant développé une séroconversion asymptomatique.

Six paires de sérums (2.4%, 6/255) se sont avérées positives en MEIA et en WB au niveau des IgG. Cependant, une séroévolution significative n'a pu être confirmée. Ces sérologies positives peuvent être dues à un contact antérieur avec *B. burgdorferi* si et n'atteste pas forcément que l'infection est active. Il a été démontré que les taux en IgG diminuent lentement, même avec un traitement antibiotique (Glatz et al, 2006). Les IgG peuvent persister pendant des années, mais ne semblent ni protéger, ni prédisposer à des manifestations tardives (Fahrner et al, 1998).

Une personne a présenté une séroévolution significative en IgM, alors que son 1^{er} sérum présentait déjà un taux positif. Un autre participant a présenté une séroconversion en IgM et des taux positifs d'IgG avec une séroévolution significative. Ces deux cas sont peut-être l'indication d'une réinfection. En effet, un épisode précédent de borréliose de Lyme

ou un titre élevé d'anticorps ne semble pas protéger contre une réinfection (Gustafson, 1992).

Dix participants (4%) ont présenté une diminution significative du taux d'anticorps, conduisant à une séroréversion entre les deux prises. Un taux de séroréversion de 7% a été observé chez des coureurs d'orientation suisses (Fahrer et al, 1998), alors que des taux de séroréversion allant de 23 à 53% ont été enregistrés chez des travailleurs de plein air aux Etats-Unis (Schwartz et al, 1994). Une explication à ce phénomène serait que *I. ricinus* en Suisse est infecté par 5 différentes génoespèces et que l'une ou l'autre de ces génoespèces induirait peut-être une production d'anticorps durable (Fahrer et al, 1998). Une autre explication serait que ces séroréversions sont dues simplement à une fluctuation naturelle des taux d'anticorps. Ce phénomène s'observe également chez les 13 participants qui ont accepté de donner un 3^{ème} échantillon de sang. Aucune augmentation d'anticorps n'a été observée dans ce troisième prélèvement, cinq participants ayant démontré des taux constants d'IgM au niveau du 3^{ème} sérum et huit autres des taux d'IgM ou d'IgG en diminution. En effet, il a été démontré que les taux d'IgM reviennent en général à la normale dans les 1 à 3 mois (Péter et Zwahlen, 2001).

Parmi les 255 participants, 57 personnes (22.4%) ont été piquées par une tique infectée par *B. burgdorferi* sl. Ce chiffre est sous-estimé, puisqu'un grand nombre de participants n'ont pas gardé la tique incriminée et qu'une centaine de tiques sont arrivées dans un état ne permettant pas leur analyse. Cependant, chez les 57 personnes chez qui une piqûre par une tique infectée a pu être confirmée, une seule (1.8%) a démontré un mouvement sérologique significatif en IgM confirmé par WB. Le temps de gorgement a pu être estimé chez 3 tiques, l'état de la quatrième n'ayant pas permis de déterminer l'indice scutal. Chez deux d'entre elles, la durée d'attachement a été estimée à plus de 24 heures. L'estimation du temps de gorgement de la troisième tique avoisine 0h, mais comme vu précédemment, l'indice scutal est imprécis pendant les premières heures de gorgement. Cette tique a donc pu se gorger suffisamment longtemps pour permettre la transmission. Un autre paramètre intéressant dans ce cas est qu'elle était infectée par *B. afzelii*, Crippa et al (2002) ont en effet démontré que *B. afzelii* était transmis plus tôt (avant 24 heures) et qu'*I. ricinus* semblait être un meilleur vecteur pour *B. afzelii* que pour *B. burgdorferi* ss.

Si on considère les participants ayant développé un mouvement sérologique significatif en IgM, mais dont les tiques ne se sont pas avérées infectées, les durées d'attachement ont dépassé pour la plupart 24 heures. Comme discuté précédemment, Nahimana et al (2004) ont émis plusieurs hypothèses à ce phénomène: une diminution de la détection de l'infection chez les tiques en train de se nourrir ou la tique observée n'était pas la tique incriminée. Dans notre cas, la méthode de détection de l'infection des tiques semble être

fiable, puisque la prévalence d'infection des tiques récoltées sur les participants et celle des tiques libres sont relativement proches. Par contre, une diminution de la diversité des génoespèces a été observée avec l'augmentation de la durée du repas sanguin des tiques récoltées sur les participants. Une hypothèse à ce phénomène pourrait être que certaines génoespèces sensibles au système complément de l'homme sont attaquées dans l'intestin de la tique. Les sondes utilisées en RLB n'arrivent ainsi plus à identifier l'ADN dégradé des spirochètes, augmentant ainsi le nombre de génoespèces indéterminées.

Nous avons voulu savoir s'il existait un lien entre la densité de tiques libres infectées et le nombre de séroconversions asymptomatiques. Rappelons que 5 séroconversions ont été observées en 2003, 2 en 2004 et 2 en 2005 et que le risque maximal de rencontrer une tique infectée a été constatée en 2003, avec 42.4 nymphes infectées par 100 m². Ce risque a ensuite diminué graduellement les deux années suivantes. Il existe une forte corrélation entre la densité des nymphes infectées et le nombre de séroévolutions significatives en IgM de 2003 à 2005. Nous pouvons ainsi dire que l'incidence des séroconversions asymptomatiques dépend fortement de la densité de nymphes infectées, même si la différence n'est pas significative.

IV.4 Etude clinique : Manifestations cliniques

Dix-neuf cas cliniques ont été signalés pendant toute la durée de l'étude. Parmi ces cas, l'érythème migrant est la manifestation clinique la plus fréquente, puisque 13 EM (68.4% des cas) ont été confirmés par un médecin. Un cas d'EM estimé comme probable au début a été confirmé par les tests sérologiques, puisqu'une séroconversion en IgM est clairement visible en WB. L'incidence clinique de l'EM pour les trois années de l'étude est donc de 3.9% (14/361). En fonction de l'année, cette incidence varie entre 6.1% (6 EM sur 99) en 2003, 3.6% (5/141) en 2004 et 2.5% (3/121) en 2005. Un point important à souligner est que l'incidence clinique est peut-être sous-estimée. En effet, sur un suivi de 2 mois, il n'a pas été possible de recenser les manifestations plus tardives de la borréliose de Lyme. Une surveillance des participants sur plusieurs mois, aurait peut-être conduit à une incidence clinique plus élevée.

Comme pour l'incidence des séroconversions asymptomatiques, l'incidence annuelle des EM la plus élevée est observée en 2003, année où la plus forte densité de nymphes libres infectées a été observée. Ainsi l'incidence annuelle des EM correspond étroitement à l'abondance des nymphes libres infectées. La même constatation a été faite dans une étude menée dans l'Etat du Connecticut (Stafford et al, 1998) où l'incidence de la

borréliose de Lyme était positivement corrélée avec l'abondance des nymphes *I. scapularis* et l'abondance des tiques *I. scapularis* infectées.

Par contre, cette constatation ne se retrouve pas entre l'incidence annuelle de l'EM et la prévalence d'infection des nymphes récoltées sur les participants, où seulement 16.9% d'entre elles se sont avérées infectées en 2003, contre 20.5% en 2004 et 33.8% en 2005. Cette différence s'explique peut-être par le fait qu'en 2003, nous avons obtenu moins de tiques à partir des participants (0.6 tique/participant en 2003, 0.7 tique/participant en 2004 et 0.8 tique/participant en 2005).

Parmi les 14 EM observés, 10 ont été traités par antibiotiques pendant la période d'étude de 2 mois. Aucune séroconversion ne s'est développée chez ces personnes, ceci confirme que le traitement antibiotique peut interrompre la production d'anticorps (Gustafson, 1992). De plus, la sérologie est souvent négative au moment où l'EM apparaît (Evison et al, 2005b), les examens sérologiques étant négatifs dans 50 % des cas (Rahn et Malawista, 1991). L'une de ces personnes a présenté un taux équivoque d'IgM au niveau du premier sérum avec un délai de 2 jours entre la piqûre et la 1^{ère} prise de sang. La tique incriminée n'a pas été envoyée. Suite au traitement antibiotique, ce taux est devenu négatif dans le 2^{ème} sérum. Parmi les 4 EM non traités, 2 ont présenté une séroconversion en IgM. Le troisième présente une séroévolution positive en IgG avec des taux élevés, alors que ces taux d'IgM sont négatifs. Il peut s'agir d'un cas de réinfection, comme l'ont décrit Eiffert et al (1996). Ils ont rapporté le cas d'une femme de 64 ans, chez qui une arthrite de Lyme a été diagnostiquée. Un traitement antibiotique lui a été administré et un suivi sérologique a été effectué. Les IgM ont été détectés pendant 10 mois après le traitement, alors que les IgG ont persisté pendant 2 ans et demi. La longue persistance des IgG après une antibiothérapie est typique chez les patients avec des manifestations tardives de borréliose de Lyme. Trois ans plus tard, cette patiente a développé un EM suite à une piqûre de tique. Une augmentation significative des IgG a été observée, alors qu'aucun IgM spécifique n'a été détecté, ce qui est compatible avec un effet de stimulation (« booster reaction »). L'effet de stimulation consiste en une réactivation de la réponse immunitaire avec pour conséquence une apparition plus rapide des anticorps que lors d'une première infection. Il est possible que cette seconde infection ait été causée par une autre génoespèce de *B. burgdorferi* si et que la réponse immunitaire, qui semble être spécifique à une génoespèce, ne protège pas d'une nouvelle infection si celle-ci est provoquée par une génoespèce différente (Eiffert et al, 1996).

Un participant, souffrant de myalgies, a présenté des taux positifs d'IgG dans ses deux sérums, avec une forte augmentation du taux dans le 2^{ème}. Il est difficile de diagnostiquer

une borréliose de Lyme dans ce cas, car les myalgies sont des symptômes aspécifiques. Une sérologie positive n'augmente que de très peu la probabilité que ces symptômes soient réellement dus à la borréliose de Lyme (Nahimana et al, 2000).

La majorité des participants ayant présenté une manifestation clinique ont entre 30 et 69 ans. La plus faible fréquence est observée chez la classe d'âge des moins de 10 ans, des 20-29 ans et des 70-79 ans. Il est donc difficile d'établir ici une relation entre l'âge et la fréquence des manifestations cliniques. Plusieurs études ont démontré que cette fréquence augmentait avec l'âge (Nadal et al, 1989 ; Zhioua, 1993). L'âge peut être un facteur de risque, car il reflète une longue fréquentation du milieu forestier et se traduit par un cumul des risques d'infection par les piqûres de tiques (Zhioua, 1993). D'autres études ont observé une distribution bimodale, la plupart des cas apparaissant chez les enfants de moins de 15 ans et chez les personnes âgées (Huppertz et al, 1999 ; Berglund et al, 1995). D'autres études n'ont en outre pas montré d'association entre l'âge et la distribution des manifestations cliniques (Gern et al, 1989).

Une prophylaxie antibiotique après une piqûre de tique n'est pas recommandée actuellement en Suisse, car l'incidence clinique reportée dans les précédentes études était faible. Ainsi Zhioua (1993) a reporté une incidence clinique chez les coureurs d'orientation fluctuant de 0 à 1% et Nahimana et al (2004) ont observé une incidence clinique de 0.8% en Suisse romande. Dans cette étude, une incidence clinique de 3.9% a été observée sur les 3 années de l'étude, pouvant atteindre 6.1% en 2003.

Plusieurs publications américaines ont démontré la nécessité d'une telle prophylaxie (Rahn et Malawista, 1991 ; Wormser, 1996 ; Nadelman et al, 2001). Récemment, la société américaine des maladies infectieuses (Infectious Diseases Society of America) a indiqué qu'une prophylaxie antibiotique par une dose unique (200 mg) de doxycycline pouvait être recommandé dans les cas où tous les critères suivants sont présents : (a) la tique attachée doit être identifiée comme étant un adulte ou une nymphe d'*I. scapularis* et doit être restée attachée plus de 36 heures ; (b) la prévalence d'infection par *B. burgdorferi* ss des tiques de la région doit être supérieure ou égale à 20% ; (c) la doxycycline ne doit pas être contre-indiquée (elle ne doit pas être administrée chez les femmes enceintes et chez les enfants de moins de 8 ans) (Wormser et al, 2006). Cependant, la situation épidémiologique en Europe est différente de celle des Etats-Unis et le modèle américain ne peut pas être reproduit tel quel en Europe. Premièrement, seule *B. burgdorferi* ss est présente aux Etats-Unis, alors qu'en tout cas 3 génoespèces pathogènes sont présentes en Europe. Si seules ces génoespèces pathogènes sont prises en considération, soit *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss, ainsi que les

gènespèces non déterminées (pouvant correspondre à *B. spielmanii*, décrite comme pathogène), nous obtenons une prévalence d'infection des tiques libres pour le Littoral neuchâtelois de 20.7% (141/680) en 2003, 15.6% (108/690) en 2004 et 28.4% (222/781) en 2005. Deuxièmement, la transmission par *I. ricinus* d'au moins une de ces 3 gènespèces pathogènes survient plus tôt, environ après 24 heures de repas sanguin (Crippa et al, 2002).

Un des arguments allant à l'encontre de la recommandation d'une prophylaxie antibiotique est la fréquence des effets secondaires. Dans une étude réalisée dans l'Etat de New-York, où une prophylaxie était administrée dans les 72 heures suivant une piqûre de tique, un taux d'effets secondaires de 30% a été observé (Nadelman et al, 2001). La fréquence des effets secondaires est importante, alors que l'EM est facilement traitable. De plus, environ 50% des piqûres de tiques passent inaperçues (Evison et al, 2005c), particulièrement chez les enfants qui se font le plus souvent piqués sur le cuir chevelu. Ainsi, même avec une prophylaxie antibiotique prescrite après chaque piqûre de tique, une réduction importante de l'incidence de la borréliose de Lyme chez l'enfant ne serait pas observée.

Cette étude a démontré que sur le Littoral neuchâtelois, l'incidence clinique et le taux de séroconversions asymptomatiques étaient importants, que la densité de tiques infectées y était élevée et que la prévalence d'infection des tiques libres par les gènespèces pathogènes dépassait les 20%. Sur la base de ces données, une prophylaxie antibiotique sur le Littoral neuchâtelois pourrait être recommandée après une piqûre de tique de plus de 24 heures, le risque de transmission augmentant avec la durée d'attachement de la tique. Cependant, pratiquement, il est difficile de recommander une prophylaxie après une piqûre de tique seulement pour cette partie du canton de Neuchâtel. Pour justifier une recommandation de prophylaxie antibiotique après une piqûre de tique au niveau suisse, il faudrait étendre cette étude à chaque région de Suisse, afin d'établir l'incidence clinique et sérologique des populations, ainsi que la densité et la prévalence d'infection des populations de tiques propres à chaque canton. De plus, cette étude n'a pas permis d'établir l'incidence des manifestations cliniques tardives, qui sont plus difficilement traitables que l'érythème migrant. Ainsi, un échec thérapeutique en présence d'un érythème migrant étant rare, la prise unique d'une dose de doxycycline après chaque piqûre de tique est difficilement justifiable.

L'autre possibilité serait d'administrer de manière préventive des antibiotiques, mais après analyse de la tique. Cependant, nos résultats montrent clairement que cela est peu recommandable. En effet, nous avons observé que 8.2% des personnes piquées par des tiques infectées développaient des signes d'infection et que 5.6% des personnes piquées

par des tiques non infectées développaient également des signes d'infection. Nous pouvons donc constater qu'une recommandation de traitement antibiotique en se basant uniquement sur l'analyse de la tique incriminée n'est pas justifiée non plus.

Une éventuelle vaccination des personnes fréquemment en contact avec le milieu forestier serait plus facilement recommandable. En effet, la durée de protection est de plusieurs années, au contraire de la prophylaxie antibiotique qui ne protège que contre une piqûre de tique. La vaccination pourrait également prévenir le développement de manifestations tardives qui sont plus difficiles à traiter et qui peuvent survenir lorsqu'une manifestation précoce, comme l'EM, n'est pas détectée et traitée.

V Conclusion

Le risque d'être infecté par *B. burgdorferi* sl dépend de quatre facteurs principaux, la densité des populations de tiques, leur prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sl, la fréquentation du milieu forestier et la durée d'attachement de la tique. Notre étude confirme que Neuchâtel est une zone à risque, la densité des populations de tiques y étant élevée, ainsi que leur prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sl. Le risque de transmission augmentant avec la durée d'attachement, il est plus élevé après une piqûre de nymphe qu'après une piqûre de femelle, leur petite taille leur permettant de prendre un repas sanguin plus long avant d'être découverte et enlevée. De plus, le risque d'être piqué par une nymphe est plus grand, vu leur plus grande abondance comparée à celle des femelles. Une inspection minutieuse du corps après chaque sortie en forêt et un retrait rapide d'une tique attachée diminuent fortement le risque de transmission.

Cette étude séroépidémiologique nous a permis de déterminer un taux de séroconversions asymptomatiques de 3.5% et une incidence clinique de 3.9% après une piqûre de tique sur le Littoral neuchâtelois.

En se basant sur la densité des tiques libres infectées et les observations cliniques, nous avons observé que le risque de développer une infection clinique ou subclinique (séroconversions asymptomatiques) était élevé et que ce risque était corrélé avec la densité de nymphes infectées sur le Littoral neuchâtelois.

En considérant les recommandations faites aux USA, un traitement prophylactique après une piqûre de tique sur le Littoral neuchâtelois pourrait donc se justifier, dans le cas où le temps d'attachement de la tique serait supérieur à 24 heures. Cependant, en prenant en compte le fait que les résultats thérapeutiques en présence d'EM sont excellents et que leur traitement prévient le développement de manifestations cliniques tardives, une prophylaxie antibiotique après chaque piqûre de tique ne semble pas nécessaire.

Cette étude nous a permis d'apporter des informations importantes sur les risques de développer une infection après une piqûre de tique. Cependant, un point important à développer serait la détermination de l'incidence des manifestations cliniques tardives de la borréliose de Lyme, car ce sont les cas de maladie en stade plus tardif qui posent problèmes. Ainsi, le suivi des participants à cette étude sur plusieurs années pourrait fournir des informations primordiales en vue d'une future recommandation de prophylaxie antibiotique après une piqûre de tique.

VI Résumé

Le Littoral neuchâtelois est une zone à risque pour la Borréliose de Lyme, due à une densité élevée de tiques *Ixodes ricinus* infectées par *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Dans cette étude, nous avons évalué le risque de développer une infection clinique et subclinique (séroconversion asymptomatique) après une piqûre de tique dans cette région de 2003 à 2005, en corrélation avec l'abondance des tiques et leur infection par *B. burgdorferi* sl.

Une récolte mensuelle des tiques libres a été réalisée au Bois-de-l'Hôpital à Neuchâtel, afin de suivre l'évolution de la densité des tiques et de la prévalence d'infection par les différentes génoespèces de *B. burgdorferi* sl.

Les habitants du Littoral neuchâtelois ont été invités, par l'intermédiaire des médias, à consulter un médecin après une piqûre de tique. Deux échantillons de sang ont été prélevés chez les participants entre 8 à 12 semaines d'intervalle. Un test de dépistage pour les IgM et les IgG (IMx® de chez Abbott) a été effectué. En cas de séroconversion, un test de confirmation par Western blot a été réalisé. Les tiques récoltées à partir des participants et les tiques libres ont été analysées par Reverse Line Blot et par Real Time PCR afin de détecter une infection par *B. burgdorferi* sl.

La densité annuelle de nymphes libres infectées la plus élevée a été observée en 2003 (12054 tiques/100 m²), puis a diminué les deux années suivantes (respectivement 9152 et 5144 tiques/100 m²). La prévalence d'infection des nymphes libres était de 26% en 2003, 22.2% en 2004 et 27.6% en 2005. Chez les adultes, 33% étaient infectés en 2003, 30.3% en 2004 et 41.6% en 2005. Pour les 3 années de l'étude, la génoespèce prédominante chez les tiques libres est *B. afzelii*, suivie par *B. garinii*. Parmi les tiques récoltées sur les participants, 23.6% des tiques se sont avérées infectées en 2003, 22.8% en 2004 et 26.3% en 2005. *B. afzelii* prédomine fortement chez ces tiques.

Sur les trois années de l'étude, 474 personnes ont consulté un médecin après une piqûre de tique, dont 361 participants (76.2%) sont revenus à la 2^{ème} consultation.

Un taux de séroconversions asymptomatiques en IgM et IgG de 3.5% a été déterminé, variant entre 6.8% en 2003, 2.1% en 2004 et 2.3% en 2005. L'incidence clinique de l'érythème migrant est de 3.9%, variant entre 6.1% en 2003, 3.6% en 2004 et 2.5% en 2005. Le risque global de développer une infection asymptomatique ou une infection clinique après une piqûre de tique infectée s'élève à 8.2%. Dans le cas d'une piqûre de tique non infectée, le risque global d'une infection subclinique ou clinique est de 5.6%.

En se basant sur la densité des tiques libres et les observations cliniques, le risque de développer une infection clinique ou subclinique après une piqûre de tique est élevé et est corrélé avec l'abondance des nymphes infectées sur le Littoral neuchâtelais.

Mots-clés : Borréliose de Lyme - *Borrelia burgdorferi* sensu lato – piqûre de tique - *Ixodes ricinus* – incidence d'infection – Littoral neuchâtelais – infection clinique – infection subclinique – séroconversion

VII Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui par leur soutien, leur aide, leur confiance et leur générosité ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Plus particulièrement, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr Lise Gern, qui m'a permis de réaliser ce travail de thèse sous sa direction. Je tiens à la remercier sincèrement pour son aide indispensable, ses précieux conseils, sa grande disponibilité et son soutien permanent.

Je tiens à remercier le Prof. Bruno Betschart, pour m'avoir offert la possibilité de travailler dans le laboratoire de parasitologie et pour son aide dans l'organisation des travaux pratiques.

Je remercie également Yves Moosmann, pour ses précieux conseils en matière de diagnostic sérologique et son aide.

Je tiens également à remercier les Dr Philippe Erard et Dr Raffaele Malinverni, qui, avec le Dr Lise Gern et Yves Moosman, ont mis sur pied et organisé cette étude. Je les remercie également pour tous leurs conseils d'ordre médical et leur soutien.

Je remercie également Dr Floriane de Marval, Prof. Benoît Jaulhac et Prof. Michel Brossard qui ont accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les participants à cette étude, qui ont accepté de subir des prises de sang, afin que cette étude puisse se faire.

Mes sincères remerciements s'adressent également aux médecins, aux assistantes médicales, aux infirmières et aux policliniques du canton de Neuchâtel, qui ont participé activement à la collecte des échantillons de sang pour permettre la réalisation de cette étude.

Un grand merci aux pharmaciens neuchâtelois, à M. Hubert (l'Express) et à la radio RTN pour leur information à la population neuchâteloise sur le déroulement de l'étude.

Un grand merci à Jacqueline Moret, conseillère en statistiques, pour son aide précieuse dans l'analyse des résultats.

Je tiens à remercier Fabrice Camus, Sandra Da Costa et Thomas Kohler de l'Ecole Supérieure Neuchâteloise d'Informatique de Gestion pour la réalisation d'une application de base de données.

Un chaleureux merci à Olivier Rais, pour son aide dans la récolte des échantillons de sang, pour la récolte des tiques sur le terrain, les tests IF et la mise en culture des tiques et pour m'avoir appris un grand nombre de techniques. Merci également à Ludivine Pugin et Morgane Kottelat qui ont aidé Olivier Rais pour la mise en culture.

Je remercie David Pérez pour le calcul des densités annuelles de tiques dans le Bois-de-l'Hôpital.

Je remercie également Fatima Jouda, Nadège Matthey-de-L'endroit et Caroline Burri, qui m'ont fourni une aide importante dans l'analyse d'échantillons.

Un grand merci à Romain Bessire, qui a résolu tous les problèmes informatiques que j'ai rencontrés.

Je tiens à remercier mes collègues du Labo, Francisca Moran-Cadenas, Caroline Burri, Olivier Rais, David Pérez, Fatima Jouda, ainsi que tous ceux qui y travaillent ou qui y ont travaillé, pour leur sympathie et les bons moments passés ensemble.

Un grand merci à Natacha Schneiter et Brigitte Cattin, pour leur sympathie et leur disponibilité.

Je remercie infiniment Gilles, pour son aide et son soutien inconditionnel et pour l'amour qu'il me porte.

Je tiens également à remercier sincèrement mes parents, Jocelyne et Werner, pour m'avoir soutenue pendant tant d'années, afin je puisse arriver à cet aboutissement.

Ma vive gratitude va également :

- A la maison Abbott, qui nous a mis gracieusement à disposition l'appareil IMx pour nos sérologies.
- A l'entreprise pharmaceutique Glaxo Smith Kline, pour son appui financier.

VIII Bibliographie

Abbott, diagnostics division. 2002. IMx Borréliose de Lyme. Notice d'utilisation. Réf. 4D14-20.

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

Aeschlimann A., Chamot E., Gigon F., Jeanneret J.-P., Kessler D., Walther C. 1987. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zentralblatt für Bakteriologie. 263: 450-458.

Afzelius A. 1910. Verhandlung der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Archives of Dermatological Research. 101: 404-406.

Aguero-Rosenfeld M.E., Nowakowski J., Bittker S., Cooper D., Nadelman R.B., Wormser G.P. 1996. Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. Journal of Clinical Microbiology. 34(1): 1-9.

Alekseev A.N., Dubinina H.V., Van de Pol I., Schouls L.M. 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. Journal of Clinical Microbiology. 39(6): 2237-2242.

Altpeter E.S., Meier C. 1992. Epidemiological aspects of neurological complications of Lyme borreliosis in Switzerland. A case-control study. Schweizerische Medizinische Wochenschrift. 122: 22-6.

Anderson J.F. 2001. Epizootiology of Lyme Borreliosis. Scandinavian Journal of Infectious Disease Supplement. 77: 23-34.

Anthonissen F.M., De Kesel M, Hoet P.P., Bigaignon GH. 1994. Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. Research in Microbiology. 145: 327-331.

Assous M.V., Postic D., Paul G. et al. 1993 Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of *Borrelia* strains used as antigens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 12: 261-268.

Balmelli T., Piffaretti J.C. 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Research in Microbiology*. 146(4): 329-40.

Bannwarth A. 1941. Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und Rheumatismus. Ein Beitrag zum Problem "Allergie und Nervensystem". *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 113: 284-376.

Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., Grimont P.A. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42(3): 378-83.

Baranton G., Seinost G., Theodore G., Postic D., Dykhuizen D. 2001. Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. *Research in Microbiology*. 152(2):149-56.

Barbour A.G., Burgdofer W., Hayes S.F., Péter O., Aeschlimann A. 1983. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Current Microbiology*. 8: 123-126.

Bellet-Edimo R., Betschart B., Gern L. 2005. Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles*. 128: 117-125.

Benach J.L., Bosler E.M., Hanrahan J.P., Coleman J.L., Habicht J.S., Bast T.P., Cameron D.J., Ziegler J.L., Barbour A.G., Burgdorfer W., Edelman R., Kaslow R. 1983. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *New England Journal of Medicine*. 308: 740-742.

Berglund J., Eitrem R., Ornstein K., Lindberg A., Ringnér A., Elmrud H., Carlsson M., Runehagen A., Svanborg C., Norrby R. 1995. An Epidemiologic Study of Lyme Disease in Southern Sweden. *New England Journal of Medicine*. 333: 1319-1324.

Bergström S., Noppa L., Gylfe A., Östberg Y. 2002. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Ed. CAB International. 47-90.

Binder E., Doepfmer R., Hornstein O. 1955. Experimentelle Übertragung des Erythema chronicum migrans von Mensch zu Mensch. *Hautarzt*. 6 (11) : 494-496.

Boschung N. 2006. Survie de la tique *Ixodes ricinus* en fonction de paramètres climatiques et de l'infection par *Borrelia burgdorferi sensu lato* détectée par Real Time PCR et Reverse Line Blot. Travail de Master, Laboratoire d'écoépidémiologie, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.

Bruckbauer H, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. 1992. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 11:1-9.

Buchwald A. 1883. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Vierteljahresschrift Dermatologie und Syphilis*. 10 : 553-556.

Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.J., Grunwaldt E., Davis J.P. 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*. 216: 1317-1319.

Busch U, Hizo-Teufel C, Boehmer R, Fingerle V, Hitschko H, Wilske B, Preac-Mursic V. 1996. Three species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii* and *B.garinii*) identified from the cerebrospinal fluid isolates by pulse-field gel electrophoresis and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 1072-1078.

Casati S., Bernasconi M.V., Gern L., Piffaretti J.C. 2004. Diversity within *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. *FEMS Microbiology Letters*. 238: 115–123.

Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Recommendations for test performance and interpretation from the second national Conference on serologic diagnosis of Lyme disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 44:590.

Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports*. 46:1-55.

Cermakova Z., Ryskova O., Honegr K., Cermakova E., Hanovcova I. 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis using enzyme immunoanalysis. *Medical science monitor.* 11(4): 121-125.

Chamot E. 1989. Contribution à l'étude de l' « Erythema migrans Krankheit » (maladie de Lyme) en Suisse. Thèse. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.

Cinco M., Padovan D., Murgia R., Poldini L., Frusteri L., van de Pol I., Verbeek-De Kruif N., Rijpkema S., Maroli M. 1998. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 17(2): 90-4.

Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schäfer S.M., Vitorino L., Gonçalves L., Baptista S., Vieira M.L., Cunha C. 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology.* 1316-1318.

Constantin C., Peter O., Cerottini J., Derighetti M., Panizzon R., Guggisberg D. 2000. Erythema migrans with multiple lesions. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie.* 127:513-6.

Crippa M., Rais O., Gern L. 2002. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector borne and zoonotic disease.* 2: 3-11.

De Marval F. 1994. Etude séroépidémiologique de l'Encéphalite à tiques et de la Borréliose de Lyme en Suisse. Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel.

De Michelis S., Sewell H.S., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Schouls L.M., Benes V., Holmes E.C., Kurtenbach K. 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *Journal of Clinical Microbiology.* 38(6): 2128-33.

Dressler F., Ackermann R., Steere A. C. 1994. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. *Journal of Infectious Diseases.* 169:313-318.

Dressler F., Whalen J. A., Reinhardt B. N., Steere A. C. 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases*. 167:392-400.

Edlow J.A. 2002. Erythema migrans. *Medical Clinics of North America*. 86:239-60.

Eiffert H, Hanefeld F, Thomssen R, Christen H-J. 1996. Reinfection in Lyme borreliosis. *Infection*. 24:437-439.

Engström S.M., Shoop E., Johnson R.C. 1995. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:419–27.

Evison J., Aebi C., Francioli P., Péter O., Bassetti S., Gervaix A., Zimmerli S., Weber R. 2005a. Abklärung und Therapie der Lyme-Borreliose bei Erwachsenen und Kindern. Teil 1: Epidemiologie und Diagnostik. *Bulletin des médecins suisses*. 86 (41): 2332-2338.

Evison J., Aebi C., Francioli P., Péter O., Bassetti S., Gervaix A., Zimmerli S., Weber R. 2005b. Abklärung und Therapie der Lyme-Borreliose bei Erwachsenen und Kindern. Teil 2: Klinik und Therapie. *Bulletin des médecins suisses*. 86 (42): 2375-2384.

Evison J., Aebi C., Francioli P., Péter O., Bassetti S., Gervaix A., Zimmerli S., Weber R. 2005c. Abklärung und Therapie der Lyme-Borreliose bei Erwachsenen und Kindern. Teil 3: Prävention, Schwangerschaft, Immundefizienz, Post-Lyme-Syndrom. *Bulletin des médecins suisses* 86 (43): 2422-2428.

Fahrer H., van der Linden S.M., Sauvain M.-J., Gern L., Zhioua E., Aeschlimann A. 1991. The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme Borreliosis in a population at risk. *Journal of Infectious Disease*. 163 : 305-310.

Fahrer H., Sauvain M.-J., Zhioua E., Van Hoecke C., Gern L. 1998. Longterm survey (7 years) in a population at risk for Lyme borreliosis: What happens to the seropositive individuals? *European Journal of Epidemiology*. 14: 117-123.

Falco R., Fish D., Piesman J. 1996. Duration of tick bites in a Lyme disease-endemic area. *American Journal of Epidemiology*. 143(2). 187-192.

Fawcett P.T., Gibney K.M., Rose C.D., Dubbs S.B., Doughty R.A. 1992 Frequency and specificity of antibodies that crossreact with *Borrelia burgdorferi* antigens. *Journal of Rheumatology*. 19(4):582–587.

Ferquel E., Garnier M., Marie J., Bernède-Bauduin C., Baranton G., Pérez-Eid C., Postic D. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* Members in *Ixodes ricinus* Ticks in Alsace, a Focus of Lyme Borreliosis Endemicity in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(4): 3074–3078.

Fingerle V., Michel H., Schulte-Spechtel U., Göttner G., Hizo-Teufel C., Hofmann H. et al. 2004. A14S - a new *Borrelia burgdorferi* sl genospecies as relevant cause of human disease. *International Journal of Medical Microbiology*. 294 (Suppl 1):207.

Földvári G., Róbert Farkas R., Lakos A. 2005. *Borrelia spielmanii* Erythema Migrans, Hungary. *Emerging Infectious Diseases*. 11(11). 1794-1795.

Garin Ch., Bujadoux M. 1922. Paralyse par les tiques. *Journal de Médecine de Lyon*. 71: 765-767.

Gern L. 2004. Tiques et borréliose de Lyme en Suisse occidentale. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles*. 127 : 5-21.

Gern L., Estrada-Pena A., Frandsen F., Gray J.S., Jaenson T.G.T., Jongejan F., Kahl O., Korenberg E., Mehl R., Nuttall P.A. 1998. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 287: 196-204.

Gern L., Frossard E., Walter A., Aeschlimann A. 1989. Presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in a population of the Swiss Plateau. Lyme borreliosis II, *Zentralblatt für Bakteriologie supplement 18* (ed. Stanek), Gustav Fischer: 321-328.

Gern L., Hu C.M., Voet P., Hauser P., Lobet Y. 1997. Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against *Ixodes ricinus* tick bites infected by *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. afzelii*. *Vaccine*. 15 (14): 1551-1557.

Gern L., Hu C.M., Kocianova E., Vyrostekova V., Rehacek J. 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *European Journal of Epidemiology*. 15(7): 665-9.

Gern L., Humair P.F. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: *Lyme Borreliosis: Biology*, E.a.C. (Ed.), Gray J. S., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK. pp. 149-174.

- Gern L., Lebet N., Moret J.** 1996. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. *Experimental & Applied Acarology*. 20: 649-658.
- Gern L., Rais O.** 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 33(1): 189-92.
- Gern L., Zhu Z., Aeschlimann A.** 1990. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 65(2): 89-93.
- Gerster J.C., Guggi S., Perroud H., Bovet R.** 1981. Lyme arthritis appearing outside the United States: a case report from Switzerland. *British Medical Journal*. 283 (6297): 951-952.
- Gigon F.** 1985. Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le Plateau suisse- Une contribution à l'écologie de ce vecteur. Thèse, Université de Neuchâtel.
- Glatz M., Golestani M., Kerl H., Müllegger R.R.** 2006. Clinical Relevance of Different IgG and IgM Serum Antibody Responses to *Borrelia burgdorferi* After Antibiotic Therapy for Erythema Migrans. *Archives of Dermatology*. 142:862-868.
- Gray J.S.** 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme Borreliosis. *Review of Medical and Veterinary Entomology*. 79: 323-333.
- Gray J.S., Kahl O., Robertson J.N., Daniel M., Estrada-Pena A., Gettinby G., Jaenson T.G., Jensen P., Jongejan F., Korenberg E., Kurtenbach. K, Zeman P.** 1998. Lyme borreliosis habitat assessment. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 287(3):211-28.
- Gray J., Stanek G., Kundi M., Kocianova E.** 2005. Dimensions of engorging *Ixodes ricinus* as a measure of feeding duration. *International Journal of Medical Microbiology*. 295: 567-572.
- Grimm D., Tilly K., Byram R., Stewart P.E., Krum J.G., Bueschel D.M., Schwan T.G., Policastro P.F., Elias A.F., Rosa P.A.** 2004. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 101(9): 3142-7.

- Gustafson R., Svenungsson B., Forsgren M., Gardulf A., Granström M.** 1992. Two-year survey of the incidence of Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis in a high-risk population in Sweden. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 11(10): 894:900.
- Guy E.C., Robertson J.N., Cimmino M., Gern L., Moosmann Y., Rijpkema SG, et al.** 1998. European interlaboratory comparison of Lyme borreliosis serology. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 287:241–247
- Hansen K, Lebech A-M.** 1991. Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnosis assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi* - specific immunoglobulin G, A, and M. *Annals of Neurology*. 30:197-205.
- Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B.** 1997. Interpretation criteria for standardized Western Blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Journal of Clinical Microbiology*. 35 (6): 1433-1444.
- Hengge U.R., Tannapfel A., Tyring S.K., Erbel R., Arendt G., Ruzicka T.** 2003. Lyme borreliosis. *Lancet Infectious Diseases*. 3: 489-500.
- Herzer P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Schattenkirchner M, Zöllner N.** 1986. Lyme arthritis: clinical features, serological and radiographic findings of cases in Germany. *Klinische Wochenschrift*. 64:206-215.
- Hubalek Z., Halouzka J.** 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European Journal of Epidemiology*. 13(8): 951-7.
- Hu C.M., Humair P.F., Wallich R., Gern L.** 1997. *Apodemus* sp rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area of Switzerland. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 185: 558-564.
- Hu C.M., Wilske B., Fingerle V., Lobet Y., Gern L.** 2001. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 1169-1171.
- Huegli D., Hu C.M., Humair P.F., Wilske B., Gern L.** 2002. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(12): 4735-7.

- Humair P.F., Gern L.** 1998a. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Tropica*. 69(3): 213-27.
- Humair P.F., Postic D., Wallich R., Gern L.** 1998b. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 287(4): 521-38.
- Humair P.F., Rais O., Gern L.** 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology*. 118 (Pt 1): 33-42.
- Humair P.F., Turrian N., Aeschlimann A., Gern L.** 1993a. *Ixodes ricinus* immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis. *Folia parasitologica*. 40: 237-242.
- Humair P.F., Turrian N., Aeschlimann A., Gern L.** 1993b. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia parasitologica*. 40: 65-70.
- Huppertz H.I., Bohme M., Standaert S.M., Karch H., Plotkin S.A.** 1999. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 18(10):697-703.
- Jaenson T.G.T., Talleklint L.** 1992. Incompetence of roe deer as reservoir of the Lyme borreliosis spirochete. *Journal of Medical Entomology*. 29: 813-817.
- Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., Brenner D.J.** 1984. *Borrelia burgdorferi* sp nov.: etiologic agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34(4): 496-497.
- Jouda F.** 2003. Etude écologique de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, agent de la borréliose de Lyme en Suisse et au Maroc : distribution et prévalence d'infection chez *Ixodes ricinus*. Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel.
- Jouda F., Perret J.L., Gern L.** 2004a. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland : spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne and Zoonotic Disease*. 4: 23-32.

Jouda F., Perret J.L., Gern L. 2004b. *Ixodes ricinus* density, distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. Journal of Medical Entomology. 41: 162-170.

Kahl O., Janetzki-Mittmann C., Gray J.S., Jonas R., Stein J., de Boer R. 1998. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. Zentralblatt für Bakteriologie. 287: 41-52.

Kaiser R. 1998. Neuroborreliosis. Journal of Neurology. 245:247-55.

Kamradt T. 2002. Lyme disease and current aspects of immunization. Arthritis Research. 4: 20-29.

Kirstein F., Rijkema S., Molkenboer M., Gray S. 1997a. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. Applied and Environmental Microbiology. 63(3): 1102-1106.

Kirstein F., Rijkema S., Molkenboer M., Gray J.S. 1997b. The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. European Journal of Epidemiology. 13(1): 67-72.

Korenberg E.I., Gorelova N.B., Kovalevski Y.V. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. In: Lyme Borreliosis: Biology, E.a.C. (Ed.), Gray J. S., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK. pp. 175-200.

Kurtenbach K., Peacey M., Rijkema S.G., Hoodless A.N., Nuttall P.A., Randolph S.E. 1998a. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. Applied and Environmental Microbiology. 64(4): 1169-74.

Kurtenbach K., Sewell H.S., Ogden N.H., Randolph S.E., Nuttall P.A. 1998b. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. Infection and Immunity. 66(3): 1248-51.

Kurtenbach K., De Michelis S., Etti S., Schafer S.M., Sewell H.S., Brade V., Kraiczky P. 2002. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-the key role of host complement. Trends in Microbiology. 10(2): 74-9.

Lagal V., Postic D., Ruzic-Sabljić E., Baranton G. 2003. Genetic Diversity among *Borrelia* Strains Determined by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the *OspC* Gene and Its Association with Invasiveness. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(11): 5059-5065.

Lebet N., Gern L. 1994. Histological examination of *Borreliae burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Experimental and Applied Acarology*. 18: 177-183.

Lenhoff C. 1948. Spirochaetes in aetiologically obscure diseases. *Acta Dermato-Venereologica*. 28: 295- 324.

Leuba-Garcia S., Kramer R., Wallich R., Gern L. 1994. Characterization of *Borreliae burgdorferi* isolated from organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 280. 468-475.

Liang F. T., Aberer E., Cinco M., Gern L., Hu C. M., Lobet Y. N., Ruscio M., Voet P. E., Weynants V. E., Philipp M. T. 2000. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the *VlsE* lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* s.l. *Journal of Infectious Diseases*. 182:1455-1462.

Lipschütz B. 1913. Über die seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Archives of Dermatology and Syphilology*. 118: 349.

Logar M., Ruzic-Sabljić E., Strle F. 2002. Comparison of self-assessment and scutal index for the duration of *Ixodes ricinus* tick attachment. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 114 (13-14):489-92.

Magnarelli L.A., Anderson J.F., Johnson R.C. 1987. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *Journal of Infectious Diseases*. 156(1):183-8.

Magnarelli L. A., Fikrig E., Berland R., Anderson J. F., Flavell R A. 1992. Comparison of whole-cell antibodies and an antigenic flagellar epitope of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(12): 3158–3162.

Magnarelli L. A., Fikrig E., Padula S. J., Anderson J. F., Flavell R. A. 1996. Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(2): 237–240.

Maraspin V., Cimperman J., Lotric-Furlan S., Ruzic-Sabljić E., Jurca T., Picken RN. 2002. Solitary borrelial lymphocytoma in adult patients. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 114:515-23.

Marconi R.T., Liveris D., Schwartz I. 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 2427–2434.

Miyamoto K., Masuzawa T. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. In: *Lyme Borreliosis: Biology*, (Ed.), Gray J. S., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK. 201-222.

Nadal D., Wunderli W., Briner H, Hansen K. 1989. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers and blood donors from the same region in Switzerland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 8(11): 992-995.

Nadelman R.B., Nowakowski J., Fish D., Falco R.C., Freeman K., McKenna D., Welch P., Marcus R., Agüero-Rosenfeld M.E., Dennis D.T., Wormser G.P. 2001. Tick bite study group. 2001. Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an *Ixodes scapularis* tick bite. *New England Journal of Medicine*. 345: 79-84.

Nahimana I., Gern L., Péter O., Praz G., Moosmann Y., Francioli P. 2000. Epidemiology of Lyme borreliosis in French-speaking Switzerland. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. 130:1456-61.

Nahimana I., Gern L., Blanc D.S., Praz G., Francioli P., Péter O. 2004. Risk of *Borrelia burgdorferi* infection in Western Switzerland following a tick bite. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 23: 603-608.

Nocton J.J., Steere A.C. 1995. Lyme disease. *Advances in Internal Medicine*. 40:69-117.

- O'Connell S., Granström M., Gray J.S., Stanek G.** 1998. Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 287(3):229-40.
- Ohnishi J., Piesman J., de Silva A.M.** 2001. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 98(2): 670-5.
- Olsen B., Jaenson T.G., Bergstrom S.** 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato- infected ticks on migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3082-3087.
- Orloski K.A., Hayes E.B., Campbell G.L., Dennis D.T.** 2000. Surveillance for Lyme disease—United States, 1992–1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 49:1–11.
- Pal U., de Silva A.M., Montgomery R.R., Fish D., Anguita J., Anderson J.F., Lobet Y., Fikrig E.** 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *Journal of Clinical Investigation*. 106(4): 561–569.
- Pal U., Yang X., Chen M., Bockenstedt L.K., Anderson J.F., Flavell R.A., Norgard M.V., Fikrig E.** 2004. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *Journal of Clinical Investigation*. 113(2): 220-30.
- Papadopoulos B., Humair P.F., Aeschlimann A., Vaucher C., Büttiker W.** 2002. Ticks on birds in Switzerland. *Acarologia*. 42: 3-19.
- Parola P., Raoult D.** 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*. 32(6): 897-928.
- Peacock M., Burgdorfer W., Ormsbee, R.A.** 1971. Rapid fluorescent-antibody conjugation procedure. *Infection and Immunity*. 3(2): 355-357.
- Perret J.L., Guigoz E., Rais O., Gern L.** 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* ticks questing activity in a Lyme borreliosis- endemic area (Switzerland). *Parasitology Research*. 86: 554-557.
- Perret J.L.** 2003a. Computer-assisted laboratory observations and field studies of the host-finding behaviour of the tick *Ixodes ricinus* (Acarina: Ixodidae): ecological implications of climate and light. Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel.

Perret J.-L., Guerin P., Diehl, P.-A., Vlimant M., Gern L. 2003b. Darkness favours mobility and saturation deficit limits questing duration in *Ixodes ricinus*, the tick vector of Lyme disease in Europe. *Journal of Experimental Biology*. 206:1809-1815.

Perret J.-L., Rais O. and Gern L. 2004. Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *Journal of Medical Entomology*. 41: 361-365.

Péter O., Bretz A.-G., Bee D. 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodid ticks of Valais, Switzerland. *European Journal of Epidemiology*. 11: 463-467.

Péter O., Bretz A.G., Postic D. And E. Dayer. 1997. Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clinical Microbiology and Infection*. 3 : 423-31.

Péter O., Zwahlen A. 2001. La borréliose de Lyme: 5 espèces en Europe. Document. Institut Central des Hôpitaux Valaisans, Sion, Suisse, 1999 (Révision 2001). www.ichv.vsnet.ch.

Pick P.J. 1895. Ueber eine neue Krankheit "Erythromelie". *Vehr. Ges. Dtsch. Naturf.* 66 Verslg. Wien, 1894. II. P336. Leipzig.

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. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(4): 743-752.

Postic D., Ras N.M., Lane R.S., Hendson M., Baranton G. 1998. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *Journal of Clinical Microbiology*. 36(12): 3497-504.

Poupon M.-A., Lommano E., Humair P.-F., Douet V., Rais O., Schaad M., Jenni L., Gern L. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1): 976-979.

- Quessada T., Martial-Convert F., Arnaud S., Leudet de la Vallee H., Gilot B., Pichot J.** 2003. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* species and identification of *Borrelia valaisiana* in questing *Ixodes ricinus* in the Lyon region of France as determined by PCR and RFLP. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 22:165-173.
- Rahn DW, Malawista SE.** 1991. Lyme disease: recommendations for diagnosis and treatment. *Annals of Internal Medicine*. 114:472-81.
- Randolph S.E.** 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*. 356(1411):1045-56.
- Randolph S.E., Storey K.** 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (*Acarini: Ixodidae*): implications for parasite transmission. *Journal of Medical Entomology*. 36 (6): 741-748.
- Rath P.M., Ibershoff B., Mohnhaupt A., Albig J., Eljaschewitsch B., Jürgens D., Horbach I., Fehrenbach F.J.** 1996. Seroprevalence of Lyme borreliosis in forestry workers from Brandenburg, Germany. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 15(5): 372-377.
- Rauter C., Hartung T.** 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 7203-7216.
- Richter D., Schlee D.B., Matuschka F.R.** 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting european vector tick of Lyme disease agent. *Emerging infectious diseases*. 9(6): 697-701.
- Richter D., Schlee D.B., Allgower R., Matuschka F.R.** 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(11): 6414-9.
- Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G.** 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 873-881.

Rijpkema S.G., Herbes R.G., Verbeek-De Kruif N., Schellekens J.F. 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* ss, *Borrelia garinii* and group Vs116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clinical Microbiology and Infection*. 3: 109-116.

Robertson J.N., Gray J.S., Stewart P. 2000a. Tick bite and Lyme Borreliosis at a recreational site in England. *European Journal of Epidemiology*. 16: 647-652.

Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Granström M., Hauser U., Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J. 2000b. A European Multicenter Study of Immunoblotting in Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (6): 2097-2102.

Rosa P.A. 1997. Microbiology of *Borrelia burgdorferi*. *Seminars in Neurology*. 17(1): 5-10.

Ryffel K., Péter O. 2000. From discovery to clinical implications: *Borrelia valaisiana*. *Journal of Spirochetal Tick-Borne Diseases*. 7: 64-72.

Ryffel K., Péter O., Rutti B., Suard A. and E. Dayer. 1999. Scored antibody reactivity by immunoblot shows an association between clinical manifestation and *B.burgdorferi* sensu stricto, *B.garinii*, *B.afzelii* and *B valaisiana* in humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(12): 4086-92.

Sarih M., Jouda F., Gern L., Postic D. 2003. First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 3(3): 133-9.

Schouls L.M., Van De Pol I., Rijpkema S.G., Schot C.S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(7): 2215-22.

Schwaiger M., Péter O., Cassinotti P. 2001. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infections using a real-time PCR assay. *Clinical Microbiology and Infection*. 7(9): 461-469.

Schwartz B.S., Goldstein M.D., Childs J.E. 1994. Longitudinal Study of *Borrelia burgdorferi* Infection in New Jersey Outdoor Workers, 1988–1991. *American Journal of Epidemiology*. 139: 504-512.

- Scrimenti R.** 1970. Erythema chronica migrans. Archives of Dermatology. 102: 104-105.
- Sinsky R., Piesman J.** 1989. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. Journal of Clinical Microbiology. 27: 1723-1727.
- Sonenshine D.E.** 1991a. Biology of Ticks. Vol. 1. Oxford University Press, Inc.
- Sonenshine D.E.** 1991b. Biology of Ticks. Vol. 2. Oxford University Press, Inc.
- Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristoferitsch W., Granstrom M. et al.** 1996. European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. Wiener Klinische Wochenschrift. 108:741-7.
- Stafford III K. C., Cartter M. L., Magnarelli L. A., Ertel S.-H., Mshar P. A.** 1998. Temporal correlations between tick abundance and prevalence of ticks infected with *Borrelia burgdorferi* and increasing incidence of Lyme disease. Journal of Clinical Microbiology. 36(5): 1240-1244.
- Steere A C.** 1989. Medical progress-Lyme disease. New England Journal of Medicine. 321:586-596.
- Steere A.C.** 2001. Lyme disease. New England Journal of Medicine. 345(2): 115-25.
- Steere A.C., Broderick T.F., Malawista S.E.** 1978. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. American Journal of Epidemiology. 108(4): 312-321.
- Steere A.C., Grodzicki R.L., Kornblatt A.N., Craft J.E., Barbour A.G., Burgdorfer A.G., Schmid G.P., Johnson E., Malawista S.E.** 1983. The spirochetal etiology of Lyme disease. New England Journal of Medicine. 308: 733-739.
- Steere A.C., Malawista S.E., Snyderman 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 & Rheumatism. 20(1): 7-17.
- Steere A.C., Schoen R.T., Taylor E.** 1987. The clinical evolution of Lyme arthritis. Annals of Internal Medicine. 107:725-31.

Van Dam A.P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B.M., Spanjaard L., Ramselaar A.C.P., Kramer M.D., Dankert J. 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme Borreliosis. *Clinical Infectious Diseases*. 17: 708-717.

Vos K., Van Dam A. P., Kuiper H., Bruins H., Spanjaard L., Dankert J. 1994. Seroconversion for Lyme borreliosis among Dutch military. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 26 (4): 427-434.

Wang G., Van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. 1999a. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: Taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 633-653.

Wang I.N., Dykhuizen D.E., Qiu W., Dunn J.J., Bosler E.M., Luft B.J. 1999b. Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics*. 151(1): 15-30.

Wilske B. 2003. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 3 (4): 215-227.

Wilske B, Bader L, Pfister H W, Preac-Mursic V. 1991. Diagnostik der Lyme-Neuroborreliose (Nachweis der intrathekalen Antikörperbildung). *Fortschritte der Medizin*. 109:441-446.

Wilske B., Busch U., Eiffert H., Fingerle V., Pfister H. W., Rossler D, Preac-Mursic V. 1996. Diversity of *OspA* and *OspC* among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from patients with neuroborreliosis in Germany. *Medical Microbiology and Immunology*. (Berlin). 184:195–201.

Wilske B, Fingerle V, Herzer P, Hofmann A, Lehnert G, Peters H, Pfister H-W, Preac-Mursic V, Soutschek E, Weber K. 1993a. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Medical Microbiology and Immunology*. 182:255-270.

Wilske B., Preac-Mursic V., Gobel U.B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G. 1993b. An *OspA* serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and *OspA* sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(2): 340-50.

- Wilske B., Jauris-Heipke S., Lobentanzer R., Pradel I., Preac-Mursic V., Rossler D., Soutschek E., Johnson R.C.** 1995. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(1): 103-9.
- Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, Weber K, Pfister H W, Einhäupl K.** 1984. Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. *Infection*. 12:331-337.
- Wilske B., Zoeller L., Brade V., Eiffert H., Göbel U.B., Stanek G.** 2000. Lyme borreliosis. In: Qualitätsstandards in der Mikrobiologischen Infektiologischen Diagnostik (MIQ 12). Mauch H., Lütticken R., eds. Munich: Urban & Fischer Verlag.
- World Health Organisation.** 1996. Report of WHO workshop on Lyme Borreliosis, Warsaw, Poland, 20-22 June, 1995. WHO/CDS/VPH/95. 141-1.
- Wormser G.P.** 1996. Controversies on the use of antimicrobials for the prevention and treatment of Lyme disease. *Infection*. 24:178-81.
- Wormser G.P, Dattwyler R.J., Shapiro E.D., Halperin J.J, Steere A.C., Klempner M.S., Krause P.J., Bakken J.S., Strle F., Stanek G., Bockenstedt L., Fish D., Dumler J.S., Nadelman R.B.** 2006. The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 43: 1089-1134.
- Yang X.F., Pal U., Alani S.M., Fikrig E., Norgard M.V.** 2004. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *Journal of Experimental Medicine*. 199(5): 641-8.
- Younsi H., Postic D., Baranton G., Bouattour A.** 2001. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *European Journal of Epidemiology*. 17(1): 53-6.
- Zhioua E.** 1993. Enquête séro-épidémiologique de la Borréliose de Lyme chez une population suisse à risque (coureurs d'orientation). Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel.

Zhioua E., Gern L., Aeschlimann A., Sauvain M.-J., van der Linden S., Fahrer H.
1998. Longitudinal study of Lyme Borreliosis in a high risk population in Switzerland.
Parasite. 5: 383-386.

IX Tableaux et figures des résultats

	CTD			PTD		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005
Nymphes	12054	9192	5144	163	106	50
Adultes	1432	1783	980	13	14	13

Tableau 17. Densité cumulée des tiques (CTD) et pic de densité des tiques (PTD) au Bois de l'Hôpital (Neuchâtel) de 2003 à 2005 (selon D. Pérez, 2006).

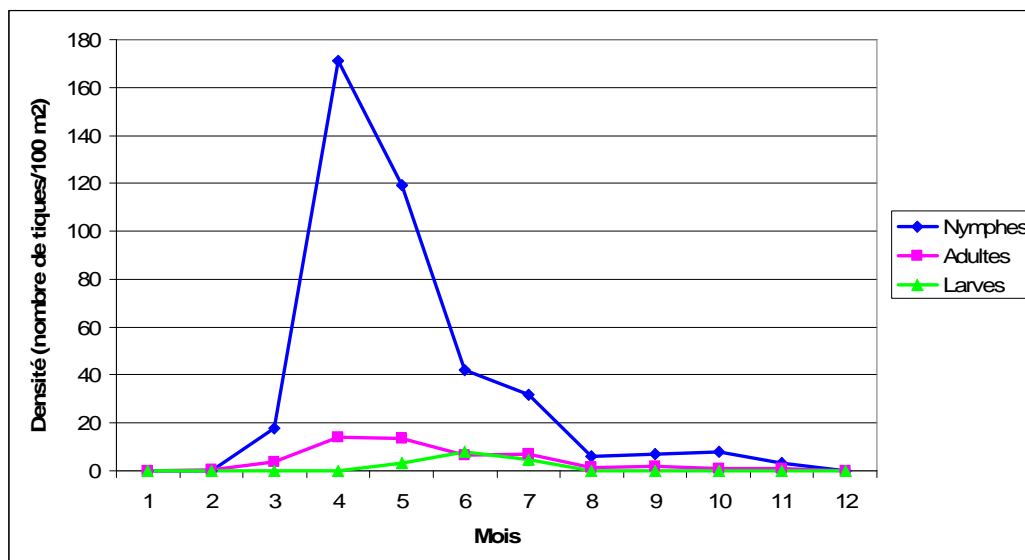


Figure 8. Densité de populations de tiques (nombre de tiques/100 m²) en 2003 au Bois de l'Hôpital, Neuchâtel.

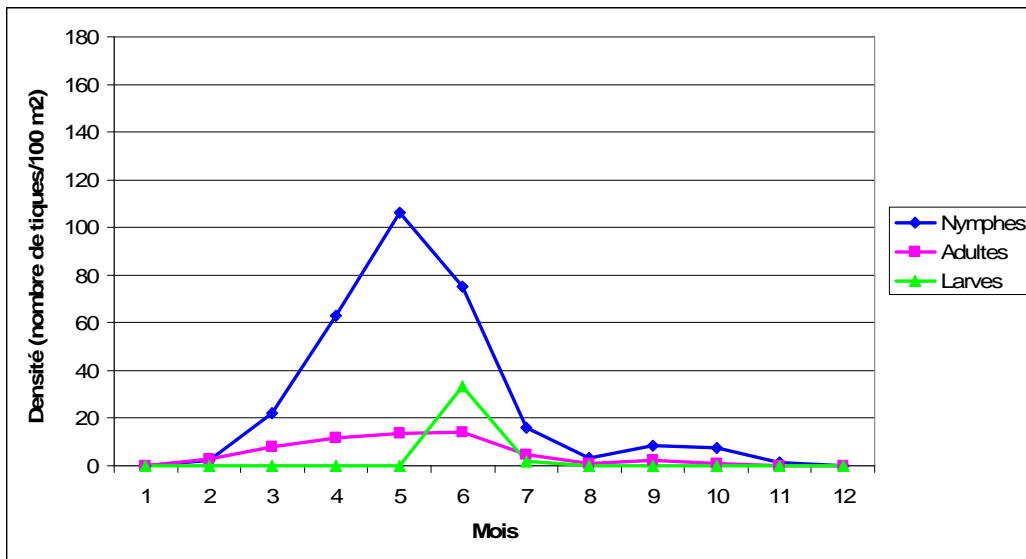


Figure 9. Densité de populations de tiques (nombre de tiques/100 m²) en 2004 au Bois de l'Hôpital, Neuchâtel.

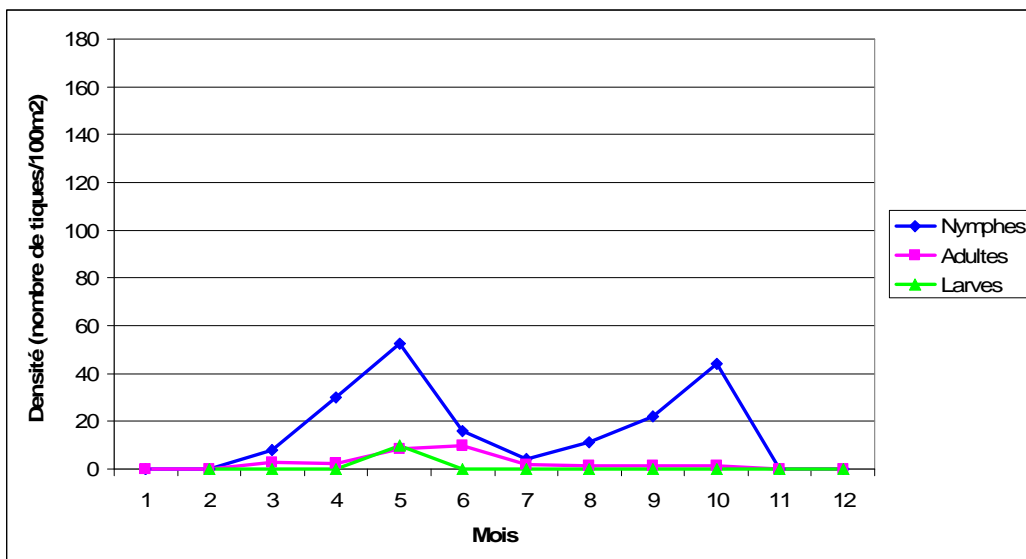


Figure 10. Densité de populations de tiques (nombre de tiques/100 m²) en 2005 au Bois de l'Hôpital, Neuchâtel.

	2003	2004	2005	Total
Stade	Nb +/ nb examiné	Nb +/ nb examiné	Nb +/ nb examiné	Nb +/ nb examiné
Nymphes	123/480 (25.6%)	103/469 (22%)	150/548 (27.4%)	376/1497 (25.1%)
Femelles	35/89 (39.3%)	30/110 (27.3%)	49/113 (43.4%)	114/312 (36.5%)
Mâles	31/111 (27.9%)	37/111 (33.3%)	45/120 (37.5%)	113/342 (33%)
Total	189/680 (27.8%)	170/690 (24.6%)	244/781 (31.2%)	603/2151 (28%)

Tableau 18. Infection des tiques *I. ricinus* du Bois-de-l'Hôpital à Neuchâtel en immunofluorescence directe.

	IF+ /Culture+/ PCR+	IF+ /Culture+/ PCR-	IF+ /Culture-/ PCR+	IF+ /Culture-/ PCR-	IF- /Culture+/ PCR+	IF- /Culture+/ PCR-	IF- /Culture-/ PCR-
2003	119	0	38	32	2	0	489
2004	74	0	38	58	1	0	520
2005	201	0	33	10	4	0	532
Total	394	0	109	100	7	0	1541

Tableau 19. Détection de *B. burgdorferi* si chez des tiques *I. ricinus* par IF, culture et PCR.

	2003	2004	2005	Total
Stade	Nb +/ nb examiné	Nb +/ nb examiné	Nb +/ nb examiné	Nb +/ nb examiné
Nymphes	125/480 (26%)	104/469 (22.2%)	151/548 (27.6%)	380/1497 (25.4%)
Adultes	66/200 (33%)	67/221 (30.3%)	97/233 (41.6%)	230/654 (35.2%)
Total	191/680 (28.1%)	171/690 (24.8%)	248/781 (31.8%)	610/2151 (28.4%)

Tableau 20. Taux d'infection des tiques libres *I. ricinus* du Bois-de-l'Hôpital à Neuchâtel par IF, culture et PCR.

PTDi	2003	2004	2005
Nymphes	42.4	23.5	13.8
Adultes	4.3	4.2	5.4

Tableau 21. Pic de densité des tiques *I. ricinus* infectées (PTDi) par *B. burgdorferi* si au Bois-de-l'Hôpital à Neuchâtel de 2003 à 2005.

CTDi	2003	2004	2005
Nymphes	3134	2040.6	1419.7
Adultes	472.5	540.2	407.6

Tableau 22. Densité cumulée des tiques infectées (nombre de tiques infectées par an et par 100 m²) au Bois de l'Hôpital (Neuchâtel) de 2003 à 2005.

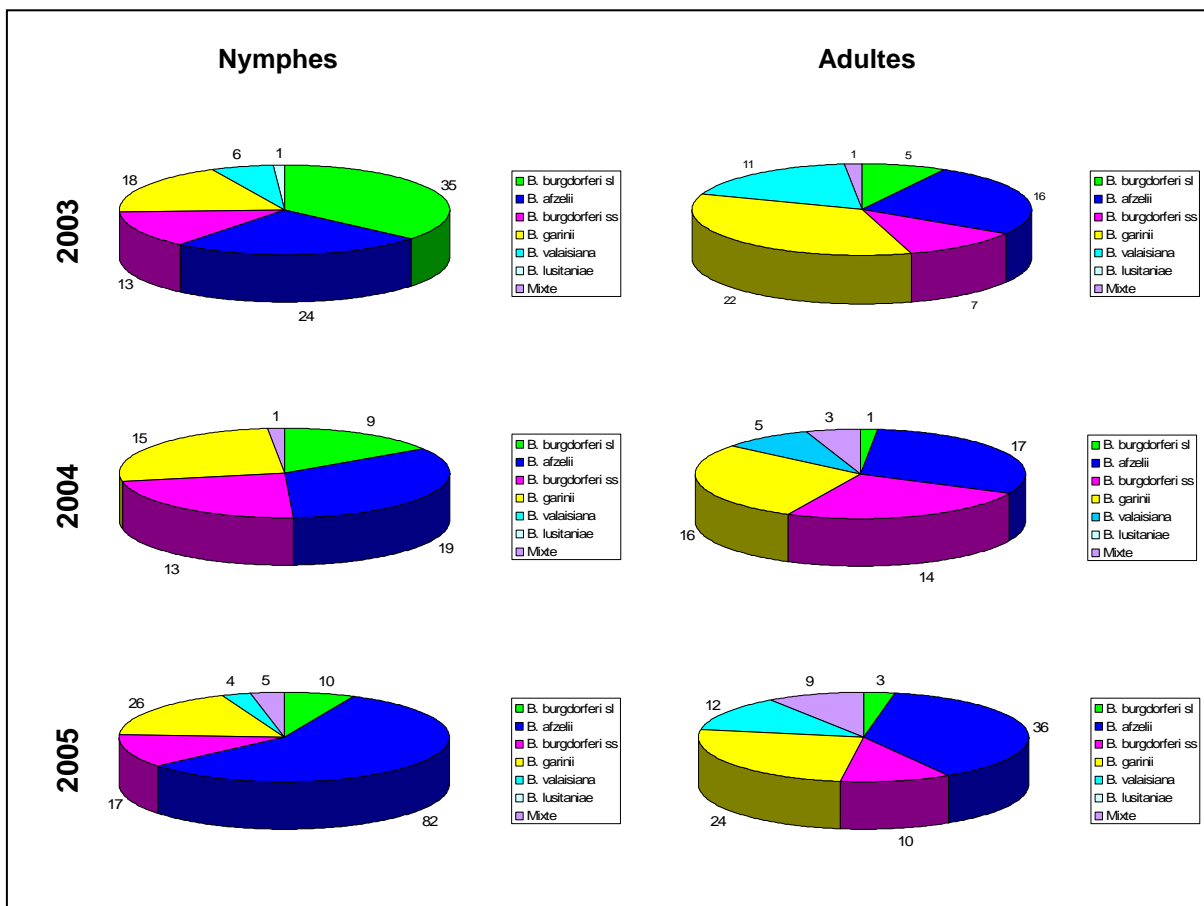


Figure 11. Distribution (en nombre) des différentes géoespèces de *B. burgdorferi sl* chez les tiques libres d'*I. ricinus* en 2003, 2004 et 2005 au Bois de l'Hôpital, Neuchâtel.

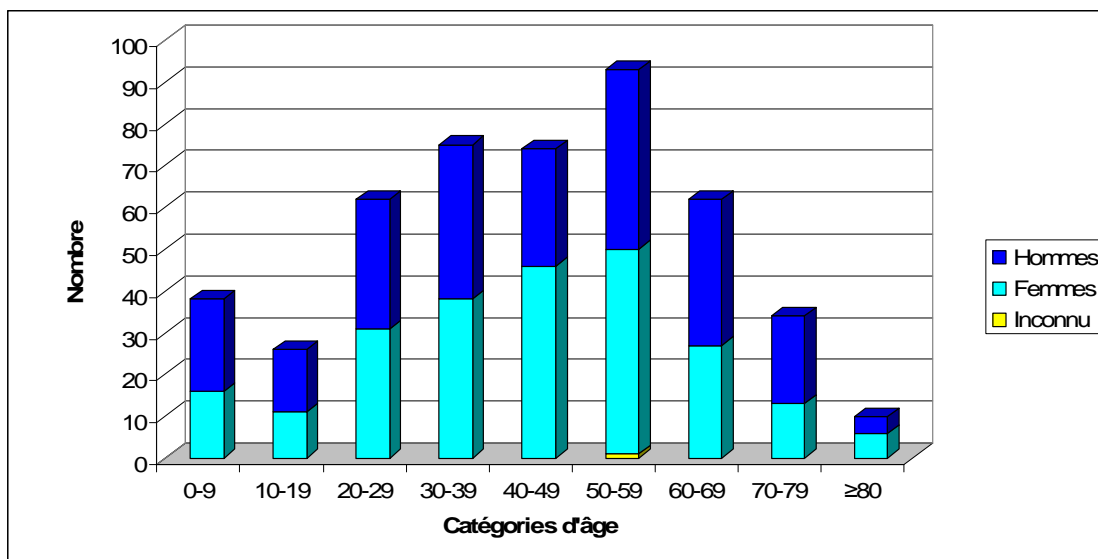


Figure 12. Distribution par catégories d'âge et sexe des participants (n=474) à l'étude de 2003 à 2005.

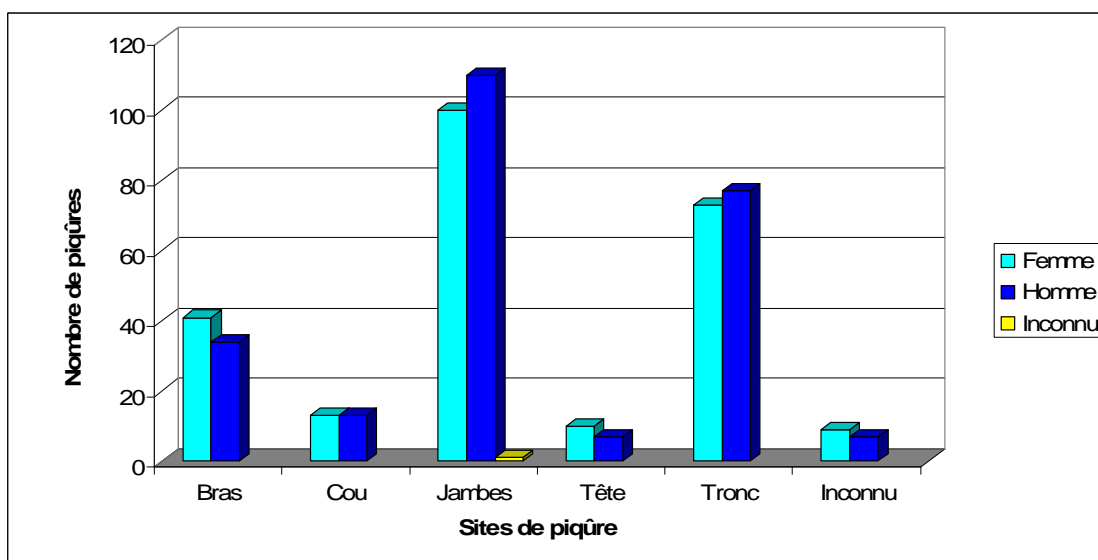


Figure 13. Nombre de piqûres de tiques (n=495) en fonction du site de piqûre et du sexe de la victime.

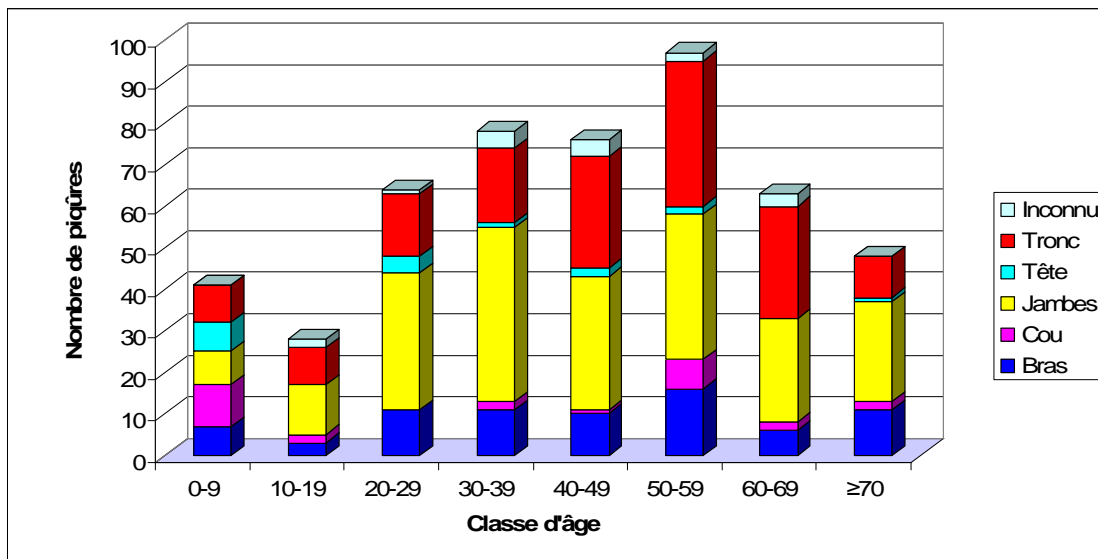


Figure 14. Nombre de piqûres de tiques en fonction du site de piqûre et de l'âge de la victime.

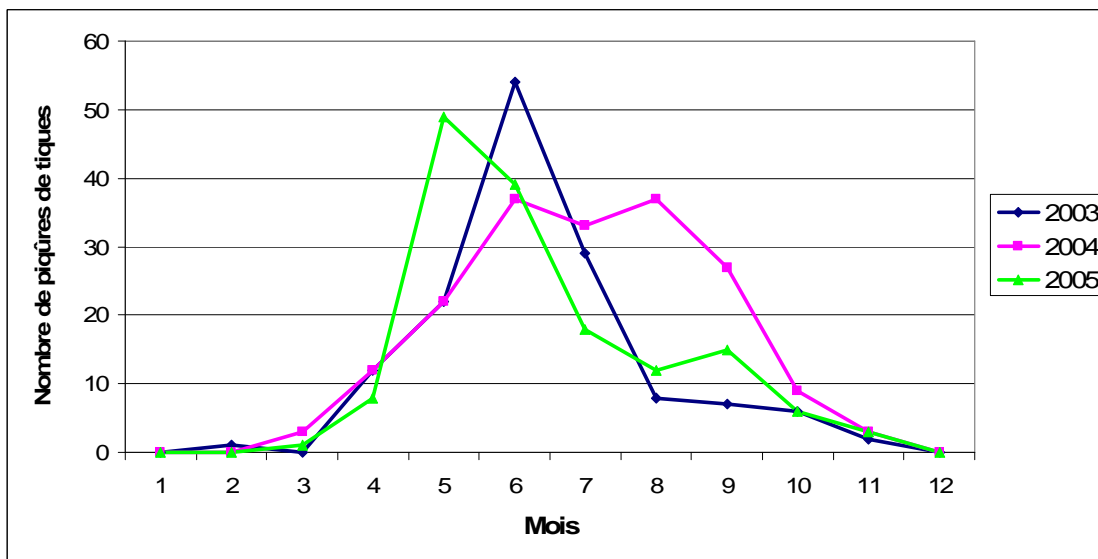


Figure 15. Distribution saisonnière des piqûres de tique en 2003, 2004 et 2005 sur le Littoral neuchâtelois.

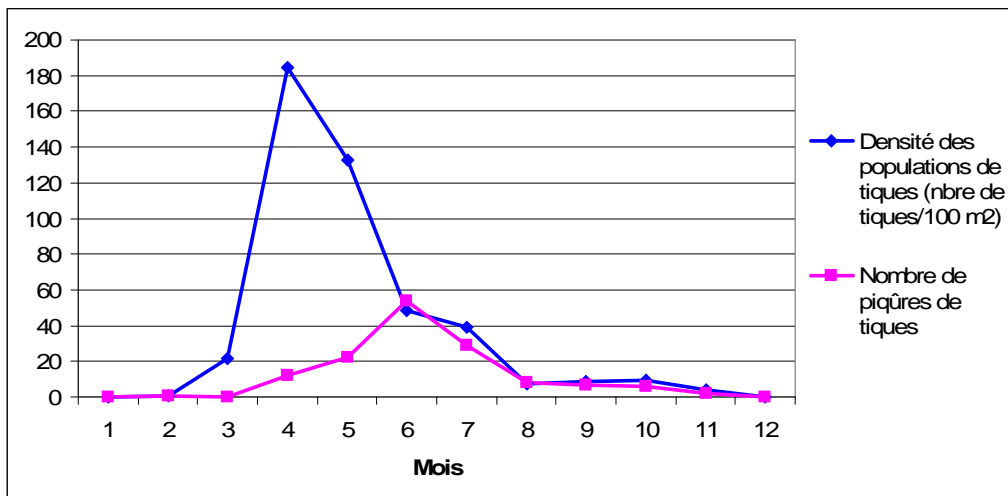


Figure 16. Densité des populations de tiques libres et nombre de piqûres sur le Littoral neuchâtelois en 2003.

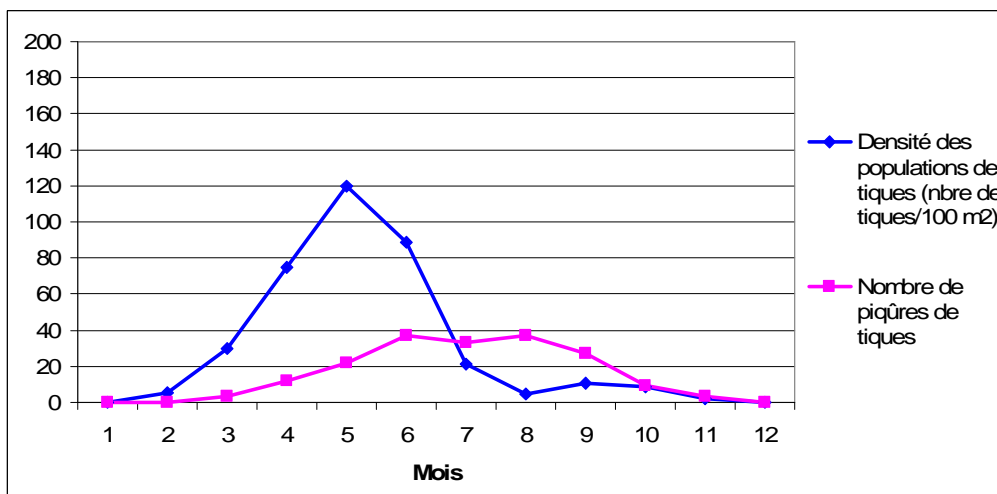


Figure 17. Densité des populations de tiques libres et nombre de piqûres sur le Littoral neuchâtelois en 2004.

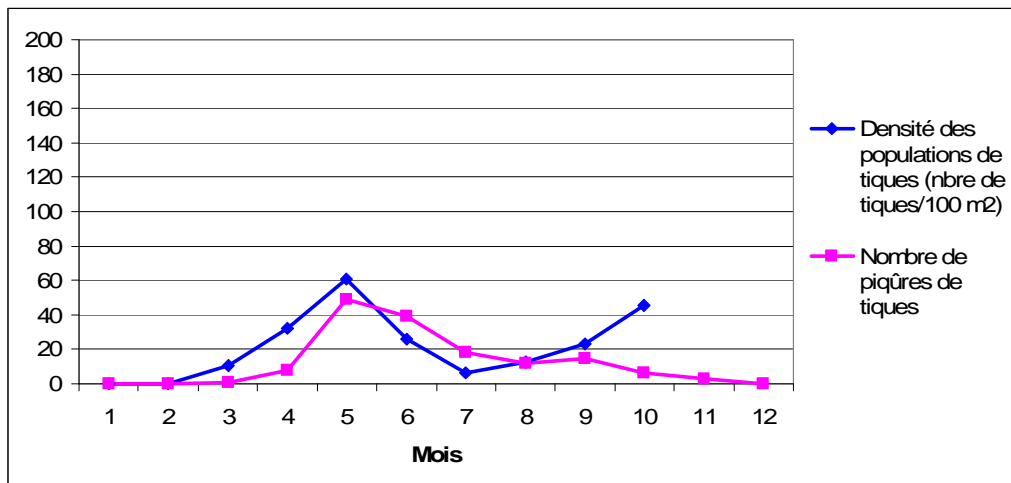


Figure 18. Densité des populations de tiques libres et nombre de piqûres sur le Littoral neuchâtelois en 2005.

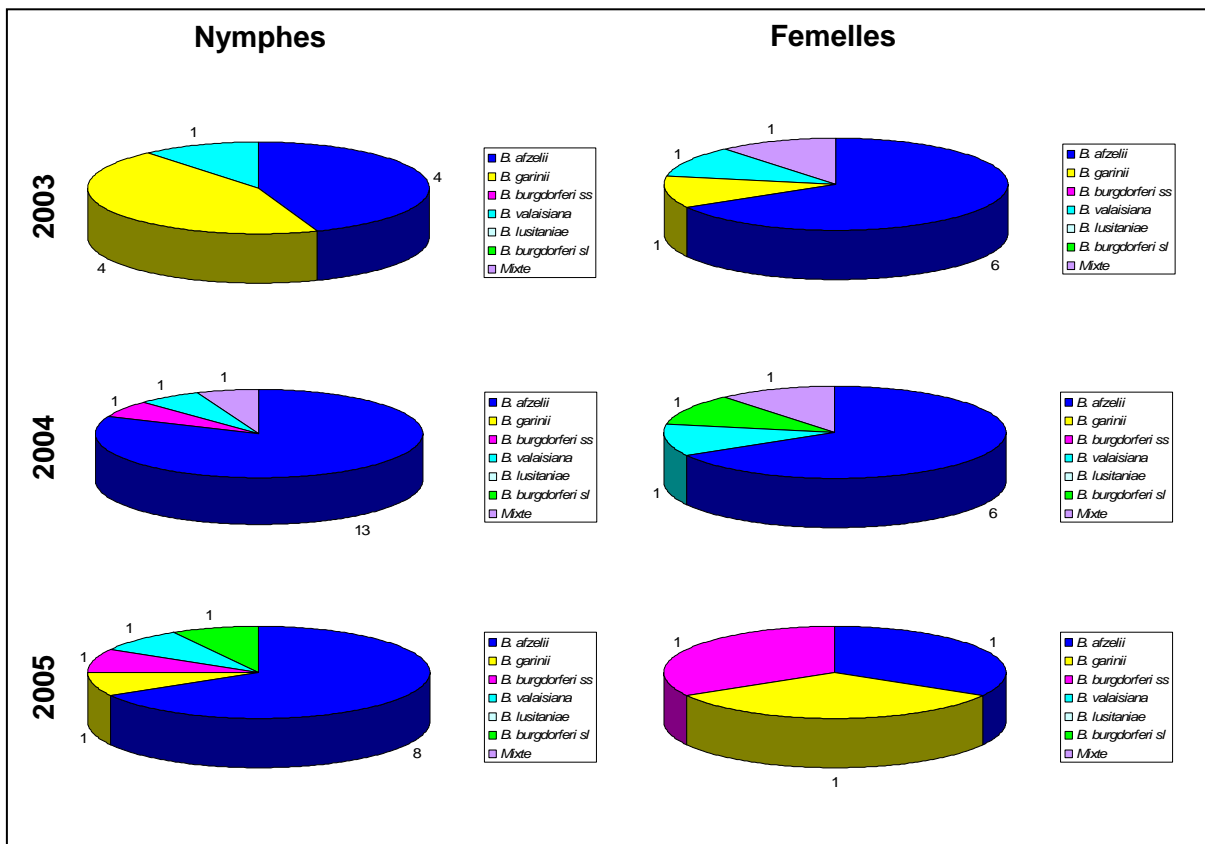


Figure 19. Distribution (en nombre) des différentes génoespèces de *B. burgdorferi s.l.* chez les tiques récoltées sur les participants en 2003, 2004 et 2005.

	RLB +/RT PCR +	RLB +/RT PCR -	RLB -/RT PCR +	RLB -/RT PCR -	Total
2003	7	3	3	36	49
2004	13	5	3	92	113
2005	10	1	15	84	110
Total	30	9	21	213	272

Tableau 23. Détection de *B. burgdorferi* sl par RLB et RT PCR chez des tiques *I. ricinus* récoltées sur les participants.

Nb Borréliés/2 µl	Nb tiques	Femelles	Nymphes
<5'000	26 (51%)	4 (23.6%)	22 (64.7%)
>5'000<10'000	5 (9.8%)	3 (17.6%)	2 (5.9%)
>10'000<50'000	6 (11.8%)	3 (17.6%)	3 (8.8%)
>50'000	14 (27.5%)	7 (41.2%)	7 (20.6%)

Tableau 24. Degré d'infection des tiques positives en RT PCR.

Nb Borréliés/2 µl	Nb tiques	Femelles	Nymphes
<5'000	7 (23.3%)	2 (15.4%)	5 (29.4%)
>5'000<10'000	5 (16.6%)	3 (23.1%)	2 (11.8%)
>10'000<50'000	5 (16.6%)	2 (15.4%)	3 (17.6%)
>50'000	13 (43.3%)	6 (46.2%)	7 (41.2%)

Tableau 25. Degré d'infection des tiques positives en RLB et en RT PCR.

Nb Borréliés/2 µl	Nb tiques	Femelles	Nymphes
<5'000	19 (90.5%)	2 (50%)	17 (100%)
>5'000<10'000	1 (4.8%)	1 (25%)	0
>10'000<50'000	0	0	0
>50'000	1 (4.8%)	1 (25%)	0

Tableau 26. Degré d'infection des tiques positives en RT PCR seulement.

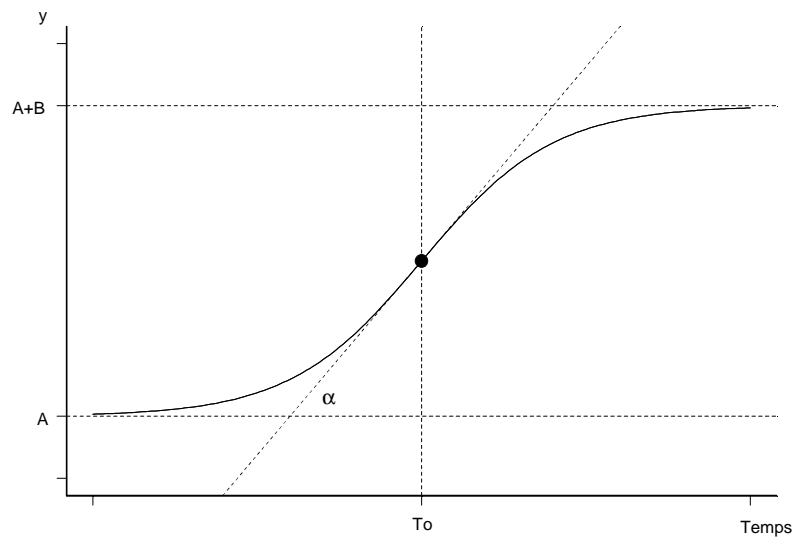


Figure 20. Modèle de régression non linéaire permettant l'estimation de la durée d'attachement d'une tique en fonction de l'indice scutal (IS) : $IS = A + B / (1 + \exp(-C(t - t_0)))$; $Tg\alpha = (B \cdot C) / 4$.

	Nymphes			Femelles		
	<i>Valeur</i>	<i>Erreur Std.</i>	<i>valeur t</i>	<i>Valeur</i>	<i>Erreur Std.</i>	<i>valeur t</i>
A	1.95867	0.0532382	36.7908	1.75865	0.101375	17.348
B	2.62168	0.260557	10.0618	3.18091	0.724725	4.38913
C	0.105958	0.0257542	4.11419	0.0455605	0.0117713	3.87049
t₀	51.6475	2.18186	23.67120	74.978	9.24108	8.11355

Tableau 27. Paramètres du modèle de régression non linéaire permettant l'estimation de la durée d'attachement d'une tique en fonction de l'indice scutal (IS).

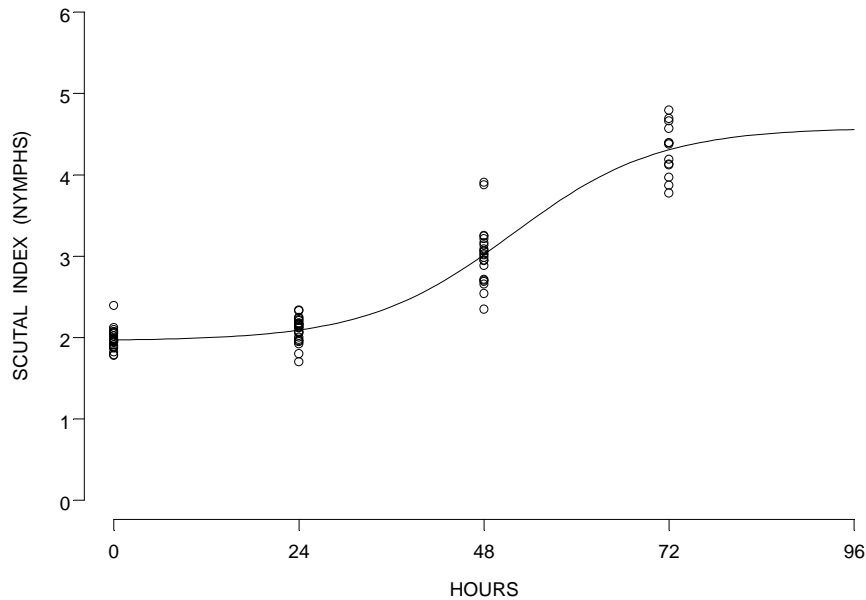


Figure 21. Régression non linéaire de l'indice scutal en fonction du temps d'attachement de nymphes d'*I. ricinus* gorgées expérimentalement sur des souris de souche « swiss » : $IS=1.95867+2.62168/(1+\exp(-0.105958(t-51.6475)))$.

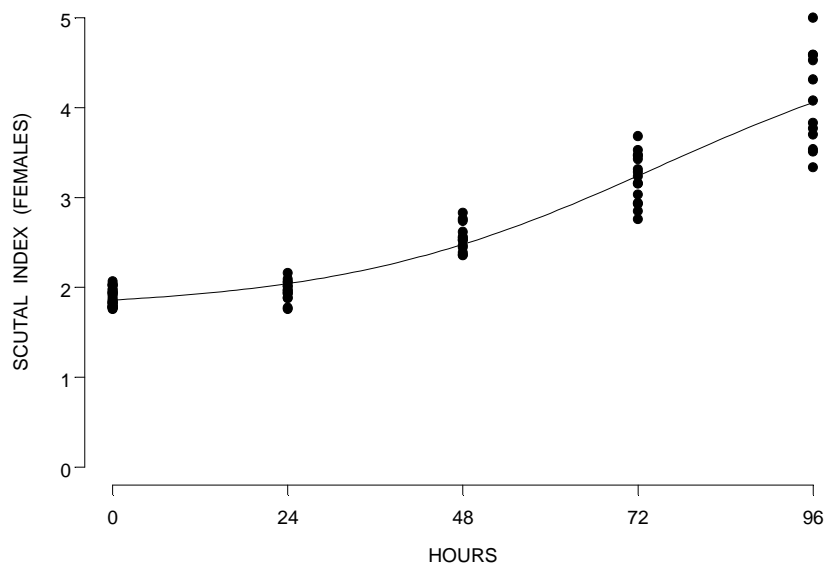


Figure 22. Régression non linéaire de l'indice scutal en fonction du temps d'attachement de femelles d'*I. ricinus* gorgées expérimentalement sur des lapins de souche «New Zealand white» : $IS=1.75865+3.18091/(1+\exp(-0.0455605(t-74.978)))$.

Temps d'attachement (heures)	Nymphes			Femelles		
	Nbre	IS	± ES	Nbre	IS	± ES
0	46	1.99	0.013	51	1.85	0.010
24	46	2.05	0.014	23	1.91	0.011
48	46	2.92	0.034	21	2.30	0.029
72	33	4.36	0.033	24	2.96	0.040
96	21	4.53	0.032	18	3.83	0.052

Tableau 28. Indice scutal moyen des tiques *I. ricinus* non gorgées (0 h) et indice scutal moyen des nymphes gorgées sur des souris et des femelles gorgées sur des lapins pour chaque intervalle de temps. IS : Indice scutal, ES : erreur standard.

Etat de conservation	Stades				
	Nymphes	Femelles	Mâles	Larves	Total
Vivante	87	54	0	2	143
Morte et intacte	74	32	2	3	111
Morte et partielle	78	19	1	0	98
Total	239	105	3	5	352

Tableau 29. Etat de conservation des tiques prélevées sur les participants à l'étude, de 2003 à 2005.

Durée d'attachement (heures)	Nymphes		Femelles	
	Nb	%	Nb	%
0-24	62	36.3	52	57.8
>24-48	66	38.4	18	20.0
>48-72	36	21.1	9	10
>72-96	4	2.3	7	7.8
>96	3	1.8	4	4.4

Tableau 30. Durée d'attachement des nymphes (n=171) et des femelles (n=90) *I. ricinus* récoltées sur les participants sur le Littoral neuchâtelois, 2003-2005.

Classe d'âge (années)	Nymphes			Femelles		
	Nb	Nb> 24 h	% > 24 h	Nb	Nb> 24 h	% > 24 h
0-9	14	7	50	6	5	83.3
10-19	7	6	85.7	6	1	16.7
20-29	22	14	63.6	8	2	25.0
30-39	28	12	42.9	19	6	31.6
40-49	30	22	73.3	12	3	25.0
50-59	31	25	80.6	19	8	42.1
60-69	18	14	77.8	15	10	66.7
≥ 70	13	8	61.5	6	3	50.0

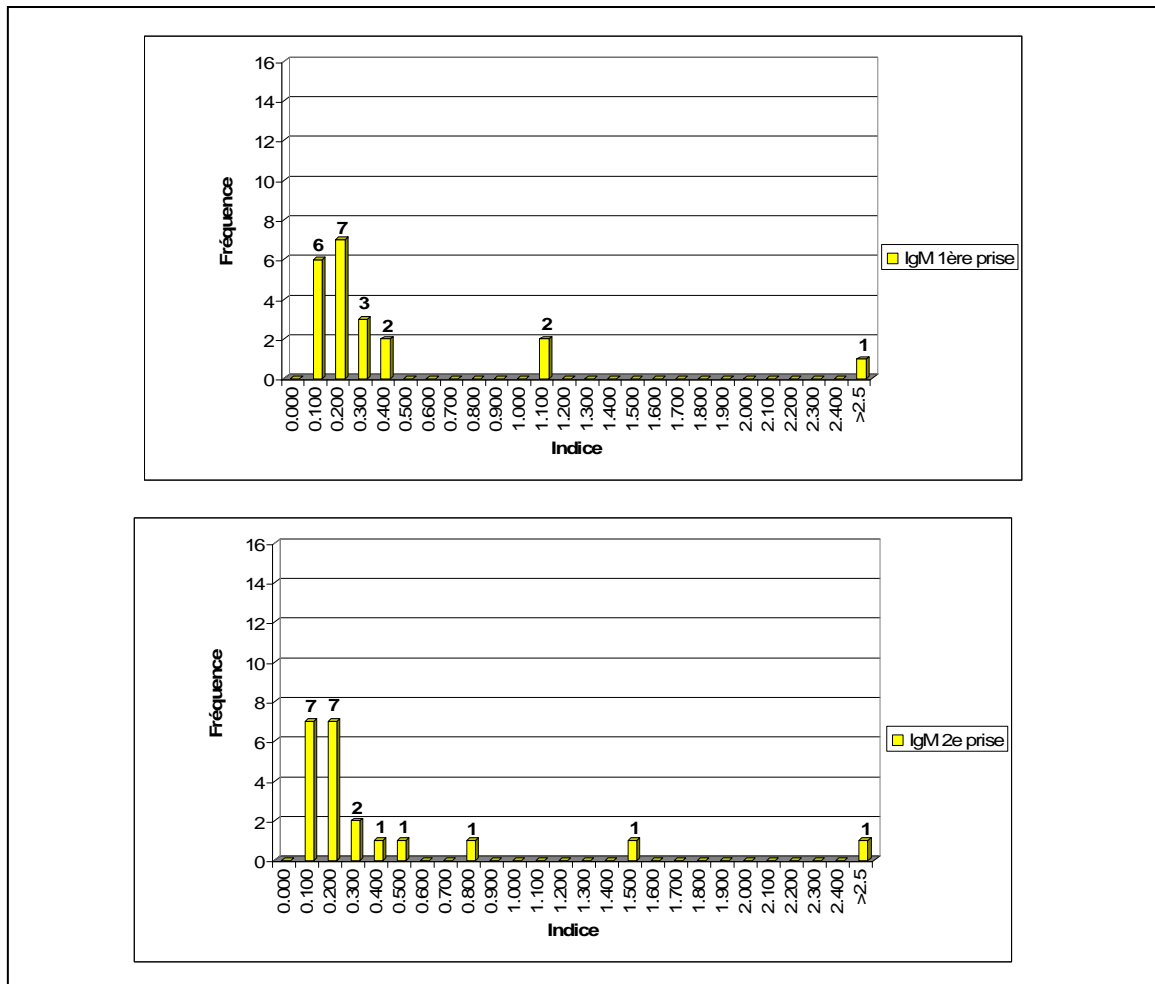
Tableau 31. Durée d'attachement des nymphes et femelles d'*I. ricinus* en fonction de l'âge de la victime, Littoral neuchâtelois, 2003-2005.

Site d'attachement	Nymphes			Femelles		
	Nb	Nb> 24 h	% > 24 h	Nb	Nb> 24 h	% > 24 h
Bras	25	14	56	6	2	33.3
Cou	8	8	100	6	4	66.7
Jambes	79	45	57	35	9	25.7
Tête	5	3	60	5	3	60
Tronc	46	33	71.7	34	17	50
Inconnu	8	7	87.5	5	3	60

Tableau 32. Durée d'attachement des nymphes et femelles d'*I. ricinus* en fonction du site d'attachement des tiques, Littoral neuchâtelois, 2003-2005.

	Durée						
	d'attachement (heures)	Nb 2003	% 2003	Nb 2004	% 2004	Nb 2005	% 2005
Nymphes	< 24	20	40.8	16	26.2	26	42.6
	>24	29	59.2	45	73.8	35	57.4
Femelles	< 24	18	81.8	11	45.8	23	52.3
	>24	4	18.2	13	54.2	21	47.7

Tableau 33. Durée d'attachement selon l'année des nymphes et des femelles *I.ricinus* récoltées sur les participants à l'étude.



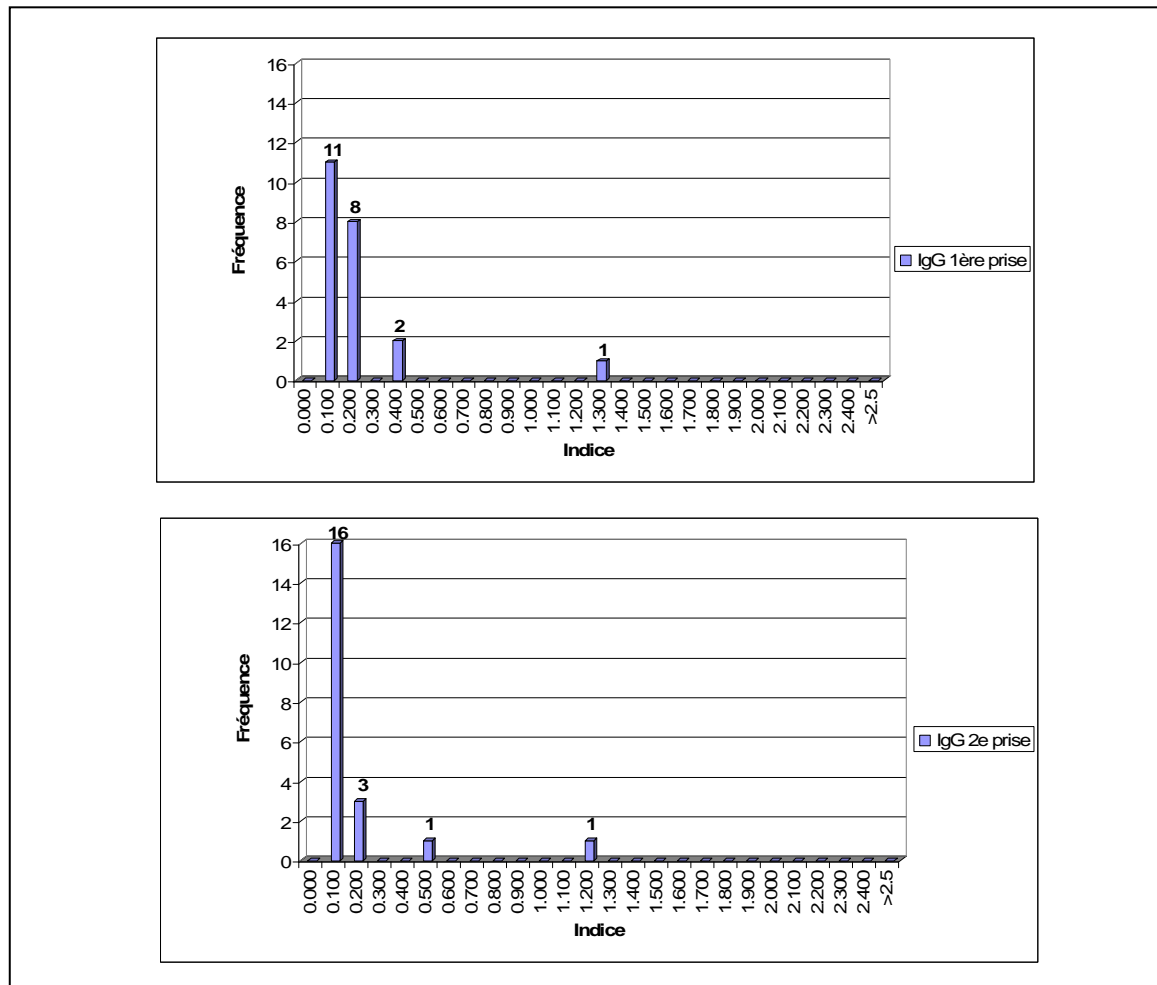


Figure 24. Distribution des taux d'IgG dans le premier et second sérum récoltés chez les volontaires de la population de contrôle. Négatif si indice < 0.700 ; équivoque si indice \geq 0.700 et < 0.900 ; positif si indice \geq 0.900.

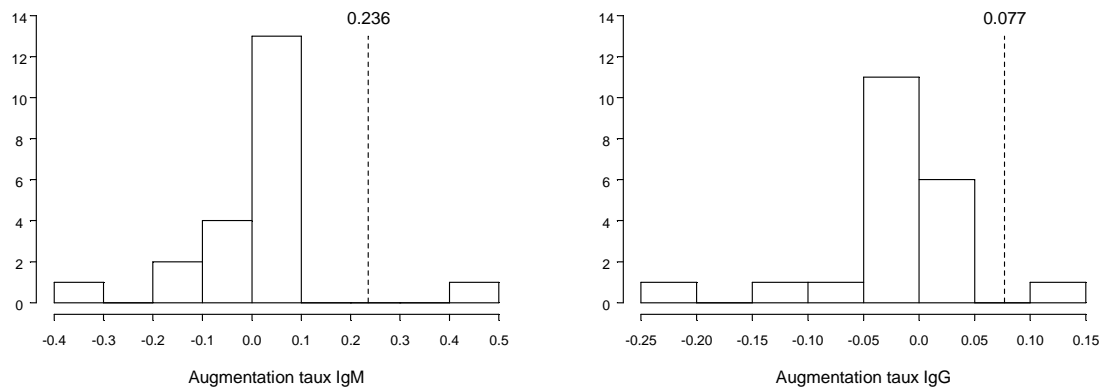


Figure 25. Distribution des différences entre les taux d'IgM et d'IgG des deux prises de sang dans le groupe contrôle.

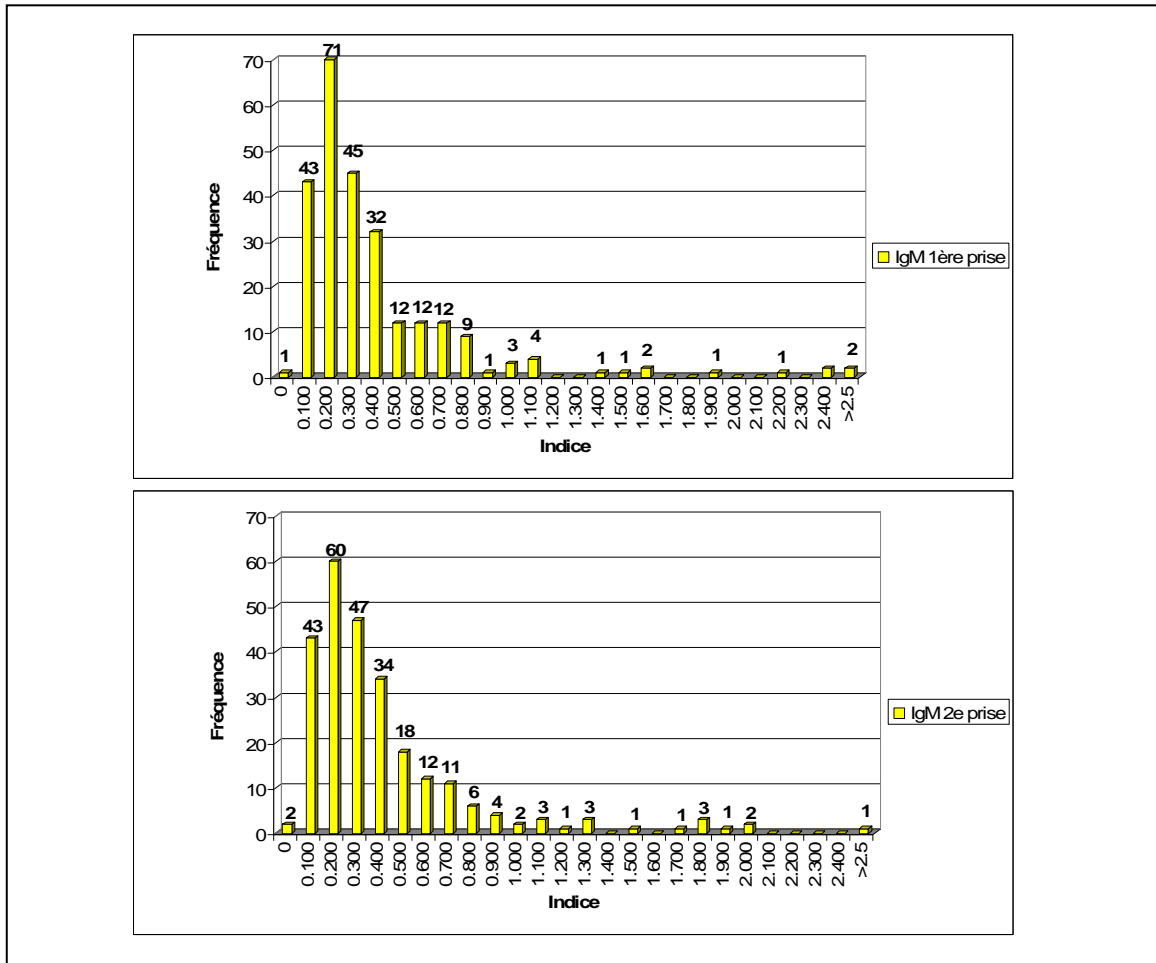


Figure 26. Distribution des taux d'IgM dans le premier et second sérum récoltés chez les participants à l'étude sérologique de 2003 à 2005. Négatif si indice < 0.650 ; équivoque si indice ≥ 0.650 et < 0.800 ; positif si indice ≥ 0.800.

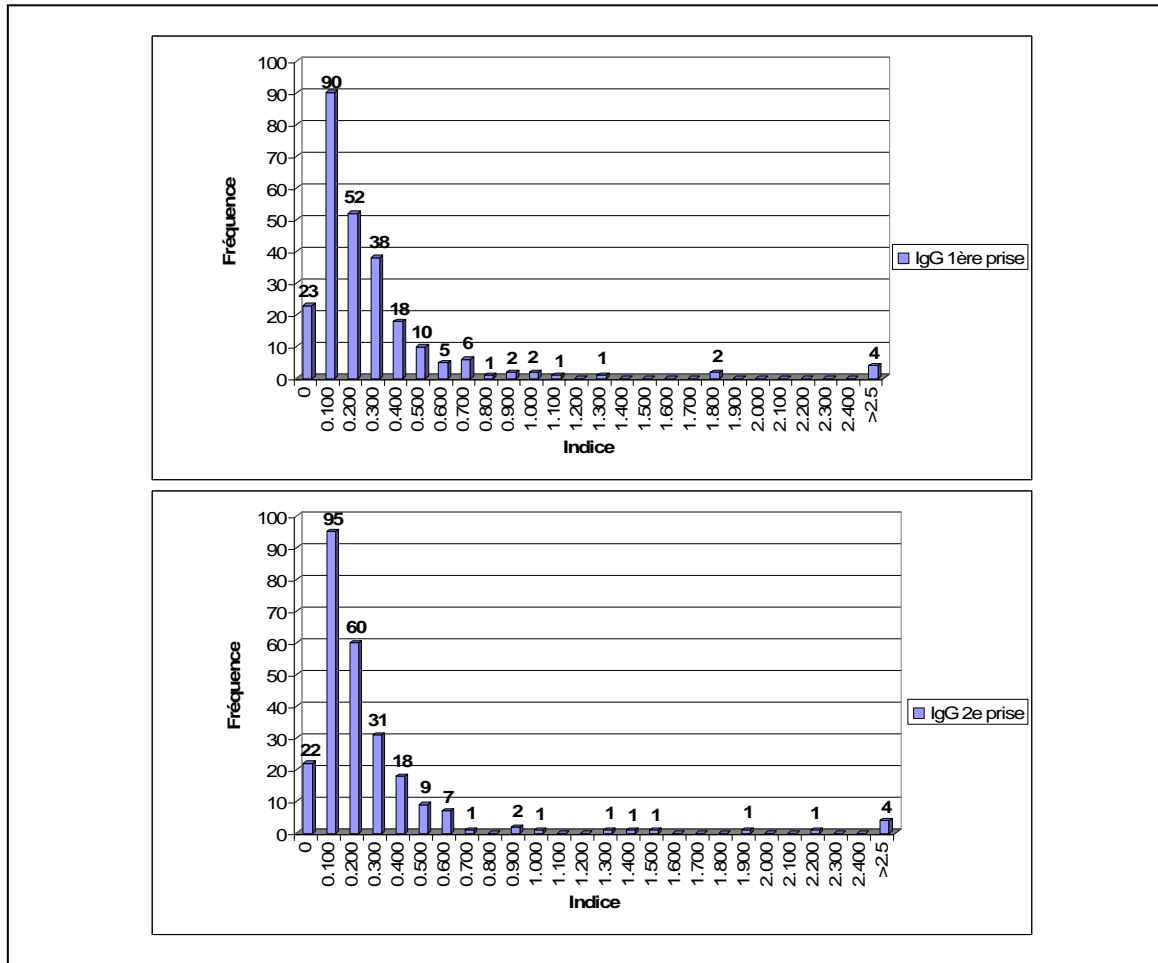


Figure 27. Distribution des taux d'IgG dans le premier et deuxième sérum récoltés chez les participants à l'étude sérologique de 2003 à 2005. Négatif si indice < 0.700 ; équivoque si indice \geq 0.700 et < 0.900 ; positif si indice \geq 0.900.

Séroprévalence initiale	IgM	IgG
2003	6.8% (5/74)	2.7% (2/74)
2004	4.2% (4/95)	3.2% (3/95)
2005	8.1% (7/86)	2.3% (2/86)

Tableau 34. Tableau récapitulatif des séroprévalences initiales selon l'année (WB).

Evolution sérologique en IgM et IgG		Nb de cas IgM		Nb de cas IgG	
1 ^{er} sérum/2 ^{ème} sérum (MEIA)	Bilan	MEIA	WB	MEIA	WB
-/+	séroconversion	6	5	0	0
-/e		1	0	0	0
e/+		4	0	1	1
-/-	séroévolution significative	4	0	18	0
+/+		1	1	6	0
Total		16	6	25	1

Tableau 35. Séroévolution significative et séroconversion en IgM et IgG dirigés contre *B. burgdorferi* si déterminé par MEIA dans le 1er et 2ème sérum des participants à l'étude sérologique, suivi d'une confirmation par Western blot (WB). + : positif ; - : négatif ; e : équivoque.

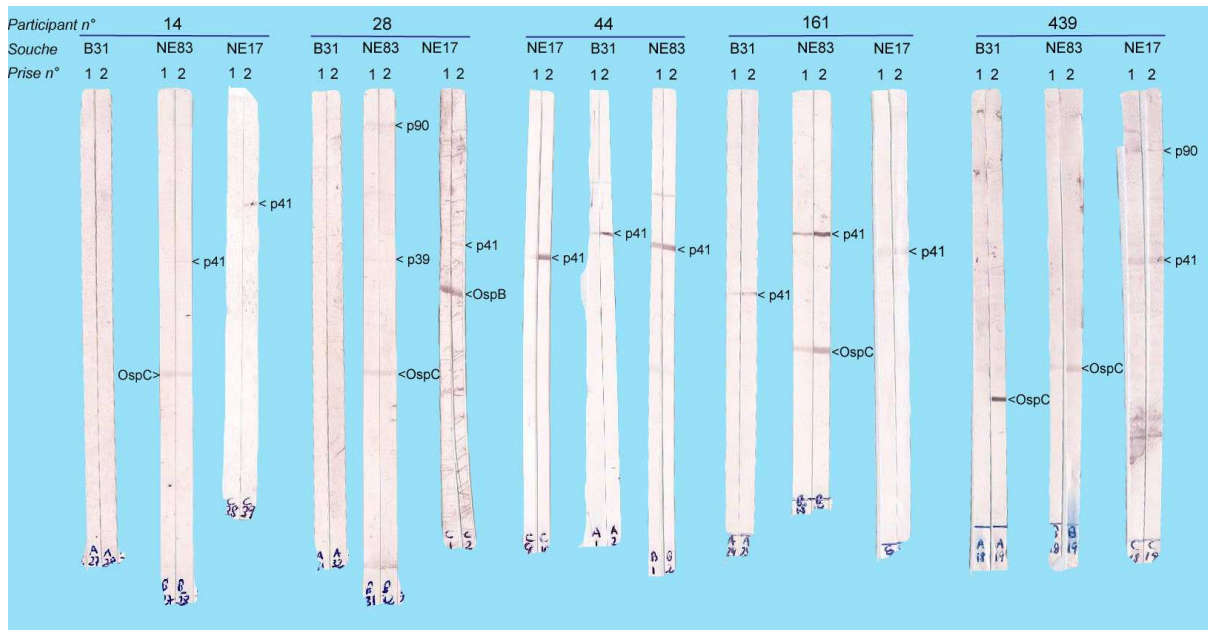


Figure 28. Séroconversion en Western blot des anticorps de classe IgM chez 5 participants.

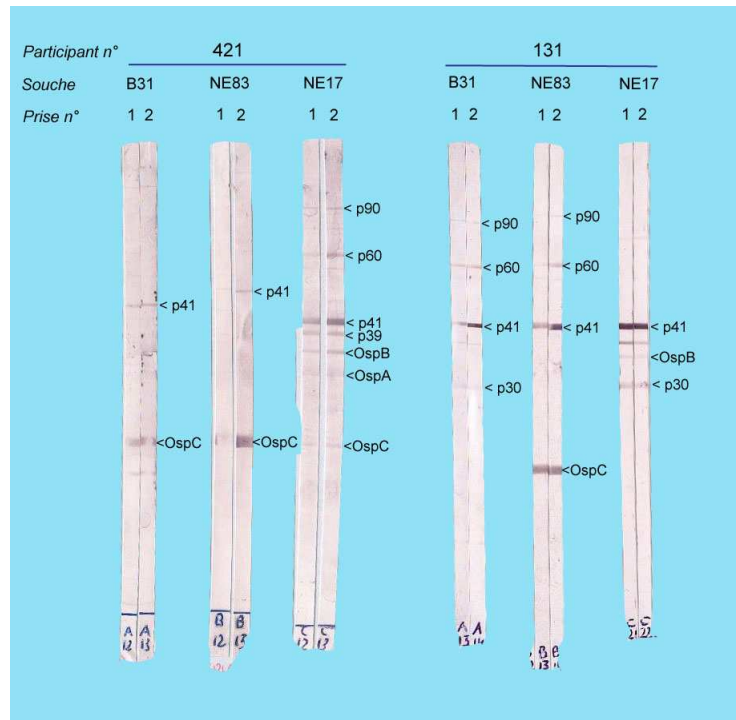


Figure 29. Séroévolution positive des anticorps de classe IgM chez deux participants.

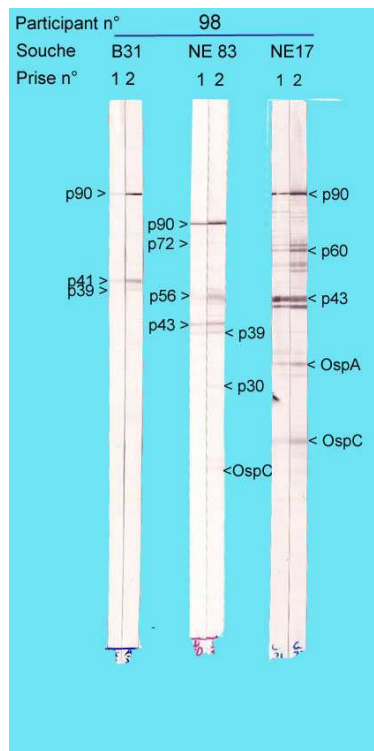


Figure 30. Séroconversion en Western blot des anticorps de classe IgG chez le participant n°98.

Evolution sérologique en IgM et IgG		Nb de cas IgM		Nb de cas IgG	
1 ^{er} sérum/2 ^{ème} sérum	Bilan	MEIA	WB	MEIA	WB
+/-	séroréversion	4	2	0	0
e/-		1	0	4	0
+/e		0	0	1	1
-/-	séroévolution négative signifiicative	3	0	23	0
+/+		1	0	3	0
Total		9	2	31	1

Tableau 36. Evolution sérologique négative et séroréversion des taux d'anticorps IgM et IgG dirigés contre *B. burgdorferi* si déterminé par MEIA dans le 1^{er} et 2^{ème} sérum des participants à l'étude sérologique. + : positif ; - : négatif ; e : équivoque.

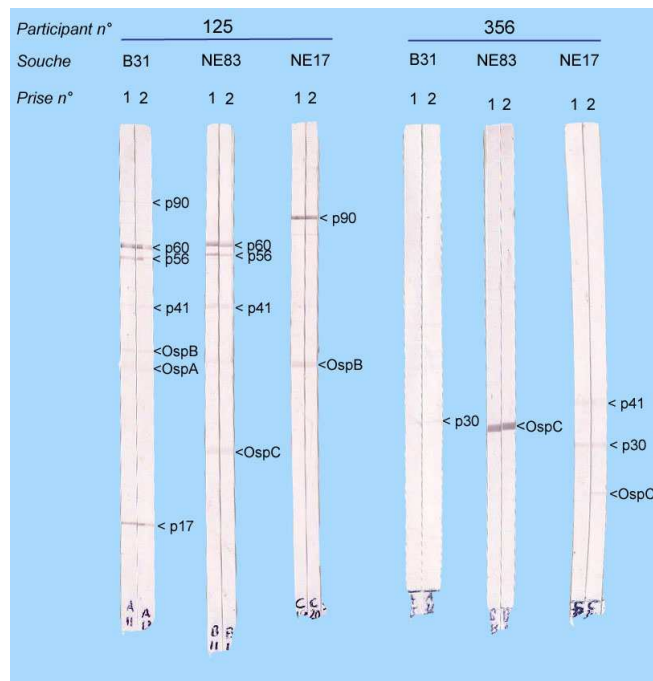


Figure 33. Participants n°125 et 356 piqués par une tique infectée par *B. burgdorferi* si et ayant développé une séroconversion en IgM diagnostiquée par MEIA.

Sérologie									
ID	Sér.1/ Sér.2	Sér.1/ Sér.2	Mvt sérologique significatif		Délai			Génoespèce	Nb Borréliés/ 2µl
	IgM	IgG	MEIA	WB	Piq.-pr. 1 (jours)	Pr. 1- pr. 2 (sem.)	Temps gorgement (heures)		
125	e/+	-/-	Séroc	non	0	9	0	<i>B. afzelii</i>	20400
356	-/+	-/-	Séroc	non	4	9	28.9	<i>B. afzelii</i>	823
236	-/e	e/-	non	Séroc	2	9	28	<i>B. burgdorferi sl</i>	ind
32	-/-	-/-	Séroév+	non	3	8	ind	<i>ind</i>	33.9

Tableau 37. Evolution sérologique des participants ayant développé un mouvement sérologique significatif après une piqûre de tique infectée. Sér.1 : 1er sérum, sér.2 : 2ème sérum ; séroc. : séroconversion ; séroév+ : séroévolution significative ; délai piq.-pr. 1 : délai entre la piqûre de tique et la 1^{ère} prise de sang, pr. 1-pr. 2 : délai entre la 1^{ère} prise de sang et la 2^{ème} ; ind : indéterminé.

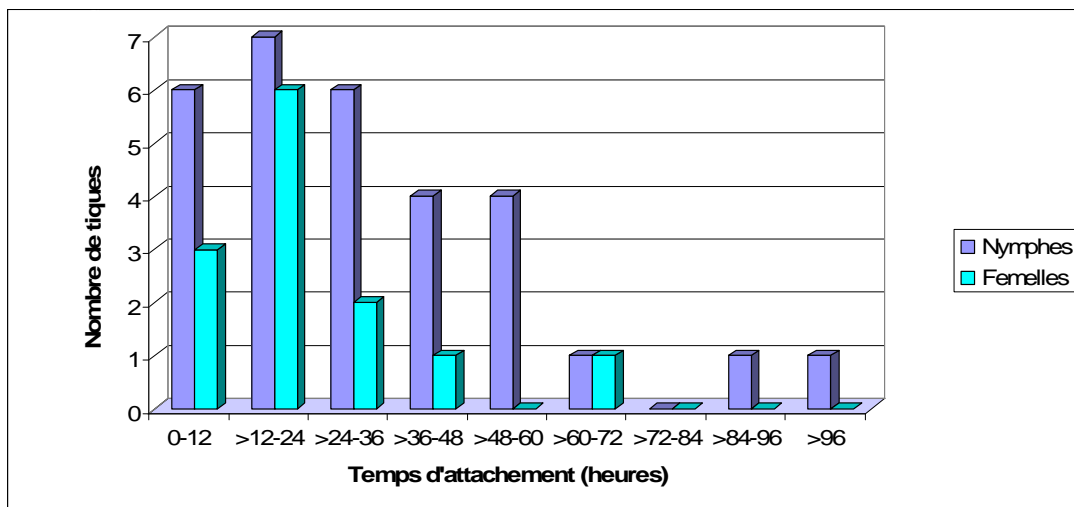


Figure 34. Temps d'attachement des tiques infectées (n=57) récoltées sur les participants à l'étude sérologique (n=255).

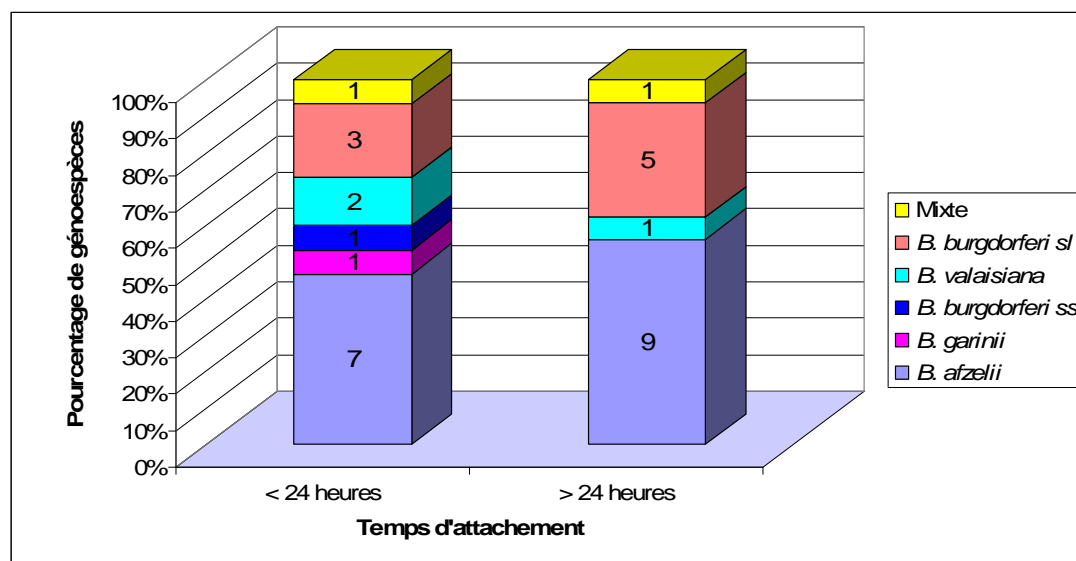


Figure 35. Répartition des différentes génoespèces chez les tiques infectées (n=57) récoltées sur les participants à l'étude sérologique (n=255) en fonction du temps d'attachement.

Manifestations cliniques	Age	Sexe	Manifestations cliniques	Age	Sexe
Erythème migrant	44	F	Erythème migrant	40	F
Erythème migrant	64	F	Erythème migrant	4	M
Erythème migrant	23	M	Erythème migrant	73	F
Erythème migrant	50	M	Erythème migrant	55	F
Erythème migrant	33	M	Erythème migrant probable	45	M
Erythème migrant	62	M	Erythème migrant probable	33	F
Erythème migrant	59	M	Arthralgie du poignet	57	F
Erythème migrant	54	M	Arthralgie des doigts et orteils	41	F
Erythème migrant	56	M	Myalgies	33	H

Tableau 38. Répartition des manifestations cliniques rencontrées pendant l'étude en fonction de l'âge et du sexe. F : femme, H : homme.

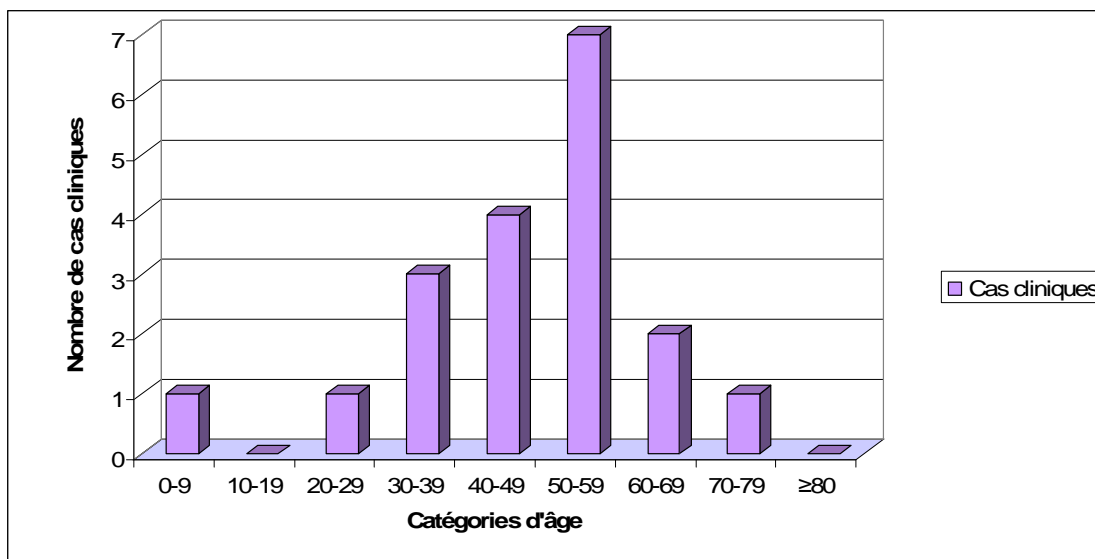


Figure 36. Répartition des manifestations cliniques selon les catégories d'âge.

Manifestations cliniques	Antibiotique	Durée du traitement (jours)
Erythème migrant (EM)	Tétracycline	7
Erythème migrant (EM)	Doxycycline	21
Erythème migrant (EM)	Doxycycline	20
Erythème migrant (EM)	Doxycycline	15
Erythème migrant (EM)	Doxycycline	10
Erythème migrant (EM)	Supracycline	21
Erythème migrant (EM)	Supracycline	15
Erythème migrant (EM)	Supracycline	Inconnu
Erythème migrant (EM)	Inconnu	14
Erythème migrant (EM)	Inconnu	Inconnu
Arthralgies des doigts et des orteils	Amoxicilline	7

Tableau 39. Type et durée des traitements antibiotiques des manifestations cliniques rencontrées lors de l'étude de 2003 à 2005.

Sérologie										
Sér.1/Sér.2		Sér.1/Sér.2		Délai						
ID	IgM	IgG	Séroconv. ou sérov.+	Manif. cliniques	Antibiotiques	Piq.- pr. 1 (jours)	Pr. 1- pr. 2 (sem.)	Temps gorgement (heures)	Génoespèce	Nb Borrélies/2µl
29	-/-	-/-	non	EM	oui	2	13	0	<i>B. garinii</i>	90900
207	-/-	-/-	non	EM	oui	1	12	32.4	<i>B. afzelii</i>	ind
300	-/-	-/-	non	EM	oui	3	9	38.3	<i>B. afzelii</i>	ind
453	-/-	-/-	non	EM	oui	-	8	49.9	<i>B. afzelii</i>	871

Tableau 40. Evolution sérologique des participants ayant développé un EM après une piqûre de tique infectée. Sér.1 : 1^{er} sérum, sér.2 : 2^{ème} sérum ; séroconv. : séroconversion, sérov.+ : séroévolution positive ; délai piq.-pr. 1 : délai entre la piqûre de tique et la 1^{ère} prise de sang, pr. 1-pr. 2 : délai entre la 1^{ère} prise de sang et la 2^{ème} ; ind : indéterminé.

X Annexes

X.1 Annexe 1: questionnaire de 1^{ère} consultation

Etude piqûres de tiques

1^{ère} consultation

Patient:

Nom : Prénom : Date de naissance.....
 Adresse : Tél. :

Date de la première consultation:

Date de la piqûre :

Tique: vue par le patient et le médecin

vue et apportée par le patient

vue par le patient, fixée dans la peau

(Délai maximum souhaitable depuis la piqûre : 6 jours)

Région de la piqûre: littoral neuchâtelois:

autre: préciser:

pas connue:

Région du corps: Tête cou bras tronc jambe

Traitement

Un traitement antibiotique a-t-il été prescrit lors de cette visite ?

Non

Oui type d'antibiotique:

Début:

Durée:

PRIERE D'ENVOYER LE QUESTIONNAIRE, LE SERUM ET LA TIQUE A:

DELPINE HUEGLI, INSTITUT DE ZOOLOGIE, EMILE ARGAND 11,

2007 NEUCHATEL (TEL. 032 718 30 56)

Nom, adresse et téléphone du médecin (tampon)

Le 2^{ème} questionnaire vous sera envoyé après réception du 1^{er} questionnaire

X.2 Annexe 2: questionnaire de 2^{ème} consultation

Etude piqûres de tiques 2^{ème} consultation

Date de la deuxième consultation:.....

Patient:

Nom..... Prénom..... Date de naissance.....

Tique: Nouvelles piqûres de tiques depuis la 1^{ère} consultation:

oui non

Manifestations cliniques depuis la première consultation :

Non

Oui

Préciser:.....
.....
.....
.....

Date de la première manifestation:

.....

Traitement

Un traitement antibiotique a-t-il été prescrit entre la 1^{ère} et la 2^{ème} consultation ?

Non oui

Type d'antibiotique :.....

Début du traitement.....

Durée.....

La situation clinique exige un résultat sérologique rapide (facturé): oui

PRIERE D'ENVOYER LE QUESTIONNAIRE ET LE SERUM A:
DELPHINE HUEGLI, INSTITUT DE ZOOLOGIE, EMILE ARGAND 11,
2007 NEUCHATEL (TEL. 032 718 30 56)

Nom, adresse et téléphone du médecin (tampon)

Nous vous remercions de votre collaboration

X.3 Annexe 3: Reverse Line Blot (RLB)

1. Liaison covalente des sondes oligonucléotidiques avec la membrane

- Diluer les sondes oligonucléotidiques à 75 pmol/μl ⇒ 3 μl du stock 25 pmol/μl + 147 μl de NaHCO₃ (500 mM pH 8.4).
- Découper la membrane à la taille adéquate. Préparer l'EDAC 16% ((w/v) 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) ⇒ 1,6 gr / 10 ml H₂O du nanopure (produit en poudre très toxique, conservé à -20°C. **Employer des gants et un masque!**). Enrouler la membrane et la mettre dans la bouteille en verre à l'aide des pincettes. Activer la membrane par une incubation de 10 min dans 10 ml d'EDAC 16%, à température ambiante (20°C).
- Récupérer l'EDAC dans la bouteille appropriée sous la hotte. Rincer la membrane avec 10 ml d' H₂O du nanopure et la placer dans le système du miniblottter. Serrer les vis et aspirer l'eau résiduelle des puits.
- Centrifuger les tubes avec les sondes. Remplir les puits avec 150 μl des sondes oligonucléotidiques diluées, à l'exception du premier et dernier puits. Eviter les bulles d'air lors du chargement des puits.
- Le premier puits est rempli avec un marqueur (encre diluée à 1 :100 dans H₂O) qui signale le bord de la membrane.
- Après l'ajout de toutes les sondes, incubation d'au moins 1 min à température ambiante.
- Enlever les sondes oligonucléotidiques par aspiration dans le même ordre d'application.
- Enlever la membrane du miniblottter avec les pinces, l'enrouler dans le sens de chargement des puits et l'incuber dans 100 mM NaOH pendant 10 min maximum dans la bouteille pour inactiver la membrane.
Faire attention à ce que la membrane se déroule pendant qu'elle tourne.
NaOH 10 M → 100 mM ⇒ 1 ml NaOH 10M+ 99 ml H₂O
- Rincer la membrane avec H₂O nanopure.
- Laver la membrane dans un bac avec 100 ml 2X SSPE / 0.1 % SDS pendant 5 min à 60°C, sur l'agitateur (agitation lente). Laisser la membrane > 5 min si la solution n'est pas chauffée à 60°C.
- La membrane est prête à être utilisée.
- Si la membrane n'est pas utilisée immédiatement, la laver dans 100 ml de 20 mM

EDTA pH 8 pendant 15 min à température ambiante, sous lente agitation.

- Celer la membrane dans un plastique sous vide et la conserver à 4°C jusqu'à l'utilisation.

2. Hybridation des produits PCR et détection

Tous les tampons doivent être préchauffés avant utilisation. Préparer les tampons suivants à partir des stocks dilués dans H₂O nanopure (quantité pour une membrane). Les tampons dilués ne doivent pas être conservés plus de 2 jours.

100 ml 2xSSPE / 0.1 % SDS (à température ambiante)	
H₂O nanopure	89 ml
SSPE 20X	10 ml
SDS 10%	1 ml

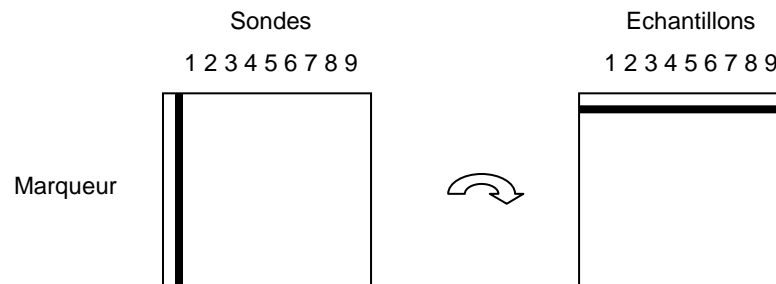
200 ml 2xSSPE / 0.5 % SDS à température de post-hybridation (51°C)	
H₂O nanopure	170 ml
SSPE 20X	20 ml
SDS 10%	10 ml

200 ml 2xSSPE / 0.5 % SDS à 42°C	
H₂O nanopure	170 ml
SSPE 20X	20 ml
SDS 10%	10 ml

200 ml 2xSSPE à température ambiante	
H₂O nanopure	180 ml
SSPE 20X	20 ml

- Ajouter 10 µl de produits PCR à 150 µl de 2x SSPE / 0.1 % SDS.
- Dénaturer les produits PCR dilués à 99°C pendant 10 min (icycler) et refroidir immédiatement dans la glace. Centrifuger les tubes quelques instants.
- Incuber la membrane pendant 5min à température ambiante dans 100 ml de 2x SSPE / 0.1 % SDS. On peut l'incuber plus longtemps si nécessaire. Employer le liquide 2X SSPE / 0.1 % SDS restant des 100 ml préparés.
- Placer la membrane dans le miniblottter, de manière à ce que les puits soient

perpendiculaires aux sondes oligonucléotidiques appliquées.



- Enlever les fluides résiduels des puits du miniblottter par aspiration.
- Remplir les puits avec 150 des produits PCR dilués (éviter les bulles d'air !). Remplir les puits vides avec 2x SSPE / 0.1 % SDS pour éviter l'écoulement des échantillons dans les autres puits. Hybridation à 42°C pendant 60 min sur une surface horizontale dans un four à hybridation.
- Enlever les échantillons du miniblottter par aspiration et enlever la membrane avec des pinces.
- Laver la membrane deux fois dans 100 ml de 2x SSPE / 0.5% SDS pendant 10 min à la température de post-hybridation (51°C).
- Placer la membrane dans la bouteille et l'incuber pendant 30-60 min à 42°C avec 10 ml de 2x SSPE / 0.5 % SDS dans lequel 2.5 µl de conjugué peroxidase couplé à la steptavidine sont ajoutés. Enrouler la membrane avec les stries à l'intérieur.
- Laver la membrane deux fois dans 100 ml de 2x SSPE / 0.5 % SDS pendant 10 min à 42°C (agitateur).
- Rincer la membrane deux fois dans 100 ml de 2x SSPE pendant 5 min à température ambiante (agitateur).
- Pour la détection chimiluminescente de l'ADN hybridé, incuber la membrane pendant 1-2 min dans 10 ml de liquide de détection ECL (5 ml de réactif 1 + 5 ml de réactif 2). Ajouter directement sur la membrane placée sur une feuille transparente (ne pas toucher la membrane avec les doigts). Déplacer doucement le liquide en bougeant les bords de la feuille.
- Couvrir la membrane avec une autre feuille transparente, déposer le tout dans une cassettes de développement et une fois dans le noir complet, ajouter un film sur le tout pendant 5-30 min. Développer le film.

3. Déshybridation de la membrane

- Laver la membrane deux fois dans 1 % SDS à 80°C pendant 30 min.
- Laver la membrane dans 20 mM EDTA pH 8 pendant 15 min à température ambiante.
- Celer la membrane dans un plastique sous vide et conserver la membrane à 4°C jusqu'à la prochaine utilisation.

4. Solutions et matériel

Miniblotter MN45: Immunetics

coussins: Immunetics

Membrane Biodyne C: Pall Biosupport

Conjugué Streptavidine-POD: Boehringer Mannheim

Liquide de detection ECL: Amersham International

20x SSPE, 4 lt: Gibco BRL Life Technologies Inc.

X.4 Annexe 4 : Real Time PCR

- Allumer l'appareil iCycler® de Biorad et la lampe 30 min. avant la manipulation.
- Ouvrir le programme informatique iCycler®.
- Sélectionner le protocole :

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	10min	
Amplification	95°C	15sec	45 cycles
Hybridation	60°C	1 min	

- Créer la plaque désirée avec les échantillons, les standards et le contrôle négatif.
- Sélectionner tous les échantillons avec le fluorophore FAM-490.
- Nommer la plaque.
- Préparer le mix PCR :

Mix RT-PCR	
Tampon 10x (avec MgCl ₂)	2.25µl
dNTPs(10mM)	0.45µl
MgCl ₂	0.9 µl
Amorce FlaF1A (20µM)	0.45µl
Amorce FlaR1 (20µM)	0.45µl
Sonde FlaProbe1	0.45µl
H ₂ O nanopure	12.93µl
Hotstart Taq polymérase	0.113µl

- Mettre 40µl de mix dans chaque tube PCR.
- Ne pas faire de bulles qui pourraient fausser les résultats
- Ajouter 2µl d'ADN dans chaque tube (ne pas faire de bulles)
- En plus des échantillons, préparer un négatif et trois séries de standards allant de 10¹ à 10⁶ copies.
- Le programme calcule le nombre de copies présentes dans l'échantillon grâce aux standards. Le nombre de copies de Borrélie dans 2µl d'ADN est ainsi obtenu.

X.5 Annexe 5: SDS Page et Western Blot

1. Préparation du gel et transfert sur nitrocellulose

- Mettre des gants.
- Nettoyer les plaques de verre et les spacers avec de l'EtOH 70%.
- Disposer les spacers entre les plaques et les monter sur le support.
- Préparation du gel de séparation:

Gel de séparation 12.5%	
H ₂ O nanopure	6.1 ml
Tris HCl 1.5 M pH 8.8)	5.25 ml
acrylamide / bis-acrylamide 30 :1	8.4 ml
Ajouter en dernier :	
SDS 10%	210 µl
TEMED	15 µl
Persulfate d'ammonium 1%	210 µl

- Mélanger délicatement en évitant les bulles. Couler jusqu'au trait vert.
- Déposer quelques gouttes de butanol saturé sur le gel
- Laisser polymériser pendant 30-45 min.
- Rincer le butanol saturé avec H₂O dist., sécher à l'aide d'un papier buvard sans toucher le gel.
- Préparation du gel de concentration :

Gel de concentration 6%	
H ₂ O nanopure	3.15 ml
Tris HCl 0.5 M, pH 6.8	1.5 ml
acrylamide / bis-acrylamide 30 :1	1.2 ml
Ajouter en dernier :	
SDS 10%	60 µl
TEMED	8 µl
Persulfate d'ammonium 1%	100 µl

- Mélanger délicatement, couler jusqu'à environ 1 cm du haut.
- Mettre le peigne (un seul grand puits) en évitant de faire des bulles.

- Laisser polymériser le gel de concentration pendant 20-30 min.
- Pendant la polymérisation, préparer l'échantillon : le faire bouillir pendant 3 min, puis centrifuger. Montage de la cuve d'électrophorèse et préparation du tampon d'électrophorèse.

Tampon d'électrophorèse	
Tris/Glycine/SDS (Bio-rad) concentré 10x	500 ml
H₂O distillée	4500 ml

- Après la polymérisation, enlever le peigne et rincer à l'H₂O dist. Monter les plaques de verre avec le gel sur le support de migration. Mettre le tout dans la cuve d'électrophorèse. Verser le tampon d'électrophorèse. Le système est relié à un système de refroidissement réglé à environ 12 °C.
- Charger l'échantillon sur le gel : 500 µl par gel.
- Brancher la cuve sur le générateur, régler l'intensité à 30 mA pendant 1 h et à 40 mA pendant 2 h 30. Lancer l'électrophorèse.
- Quelques minutes avant la fin de l'électrophorèse, prendre deux papiers buvard épais (Biorad) et les couper au format 12/15 cm. Découper le filtre de nitrocellulose au même format, en utilisant un des 2 papiers buvard comme chablon. Mettre buvards et nitrocellulose dans un bac en les recouvrant de tampon de transfert et laisser humidifier pendant quelques minutes.

Tampon de transfert	
Tris	5,81g
Glycine	2,93g
SDS 10 %	3,75 ml
Méthanol	200 ml
Compléter à 1000 ml avec H₂O distillée	

- A la fin de l'électrophorèse, débrancher le système, démonter le gel et le faire tremper dans le tampon de transfert pendant quelques minutes.
- Préparer l'appareil de transfert :

1. Humidifier l'anode (+) avec du tampon de transfert.

2. Déposer un buvard, mouiller avec du tampon de transfert.
 3. Poser le filtre de nitrocellulose, mouiller avec du tampon.
 4. Poser le gel, mouiller.
 5. Déposer le deuxième papier buvard, mouiller.
 6. Mettre la cathode (humidifiée préalablement), mettre le couvercle, brancher.
 7. Régler le générateur sur 120 mA (0.8mA/cm²) pendant 60 min. Lancer le transfert.
- Une fois le transfert terminé, récupérer le filtre de nitrocellulose et le colorer au rouge ponceau pendant 5 min.

Solution de Rouge Ponceau	
Acide trichloracétique	6g
H₂O distillée	200 ml
Rouge ponceau	0,1 g

- Après rinçage à l'H₂O distillée, le filtre de nitrocellulose est coupé en bandes de 11 cm environ. Les bandes numérotées sont prêtes pour l'immunoblot.

2. Immunoblot

Echantillons testés : sérums

- Utiliser d'abord la série de bandes d'un blot déjà commencé avant d'en commencer un nouveau. Manipuler les bandes de nitrocellulose à l'aide d'une pincette, du côté du numéro.
- Préparer dans une boîte le nombre de bandes nécessaires. Les doublons doivent être testés en parallèles. Ajouter une bande pour le contrôle positif (Immunoblot IgG) et 2 bandes pour le contrôle positif et le contrôle négatif (Immunoblot IgM).
- Sur la feuille accompagnant chaque blot, marquer la date, le numéro de l'échantillon à tester (patient ou référence) ainsi que le nom du patient.
- Saturation des bandes dans du PBS-lait 5% 2 x 15 minutes (changer le lait) sur le shaker à 50-70 RPM.

- Préparer le nombre de boîtes à incubation (8 compartiments) nécessaires et y mettre **2 ml de PBS-lait 1% (IB IgG)** ou **2 ml PBS-lait 5% (IB IgM)** par compartiment.
- Mettre les bandes avant de mettre les sérums, LCR ou ponctions.

Dilution du sérum :

10 μ l dans 2 ml de PBS-lait 1% (IB IgG) ou PBS-lait 5% (IB IgM)

- Mettre les plaques l'une sur l'autre avec un couvercle tout en haut et laisser incuber une nuit sur le shaker à 50-70 RPM.
- Sortir les bandes et les mettre dans une boîte simple. Pour environ 15 bandes, prendre une petite boîte, sinon utiliser une grande boîte.

Immunoblot IgG:	Immunoblot IgM:
Rinçage rapide dans du PBS-lait 5%	Rinçage rapide dans PBS-lait 5%
Rinçage 5 minutes dans du PBS-lait 5%	Rinçage 3x 10 minutes dans PBS-lait 5%
Rinçage rapide dans du PBS-1%	

- Mettre les bandes du bon côté et préparer (pour une grande boîte, doubler ou tripler les quantités):

Immunoblot IgG	Immunoblot IgM
10 ml de PBS-lait 1%	10 ml PBS-lait 5%
+ 10 μ l anti-IgG marqué à la phosphatase	+ 10 μ l anti-IgM marqué à la phosphatase

- Mettre un couvercle et incuber 2 heures (IB IgG) ou 1h45 (IB IgM) sur l'agitateur "up and down".
- Rinçage:

IB IgG	IB IgM
Rinçage rapide dans du PBS-lait 5%	Rinçage rapide dans PBS-lait 5%
Rinçage 5 minutes dans du PBS-lait 5%	Rinçage 3 x 10 minutes dans PBS-lait 5%

- Puis pour les 2 méthodes:
 - Rinçage 3 x 3 minutes dans du PBS pur
 - Rinçage rapide dans tampon AP (frigo immunologie)
- Remettre les bandes du bon côté et préparer:

10 ml de tampon AP avec 50 μ l de BCIP et 100 μ l de NTB (doubler les quantités pour une grande boîte).

- Incubation (sur l'agitateur): 20 minutes.
- D'après la réaction sur les bandes de références, prolonger au besoin le temps de révélation. La réaction avec les sérums positifs doit être bien marquée.
- Rincer 3-4 fois à l'eau du robinet pour stopper la réaction, puis à l'eau distillée avant de mettre les bandes à plat et dans l'ordre sur un papier buvard (séchage).
- Une fois les bandes sèches, les classer en les collant sous un transparent pour photocopie.

Solutions

PBS-lait 1%	
Lait en poudre écrémé	1g
PBS	100 ml

PBS-lait 5%	
Lait en poudre écrémé	5g
PBS	100 ml

Solution de révélation	
Tampon AP	10 ml
TRIS	12,1g
NaCl 5M	20 ml
MgCl ₂ x 6H ₂ O 1M	5 ml
HCl 1N	6 ml
BCIP	50μl
DMF (N,N-Dimethylformamid)	15 ml
BCIP (Bromo chloro indolyl phosphate)	500 mg
NBT	100μl
DMF (N,N-Dimethylformamid)	8ml
H ₂ O distillée	2ml
NBT (Nitro blue tetrazolium)	0,3g

Solution PBS-MgCl₂ pH 7.4	
H₂O distillée	1000 ml
KH₂PO₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Na₂HPO₄ * 2H₂O	1.45 g
MgCl₂ * 6H₂O	0.2 g