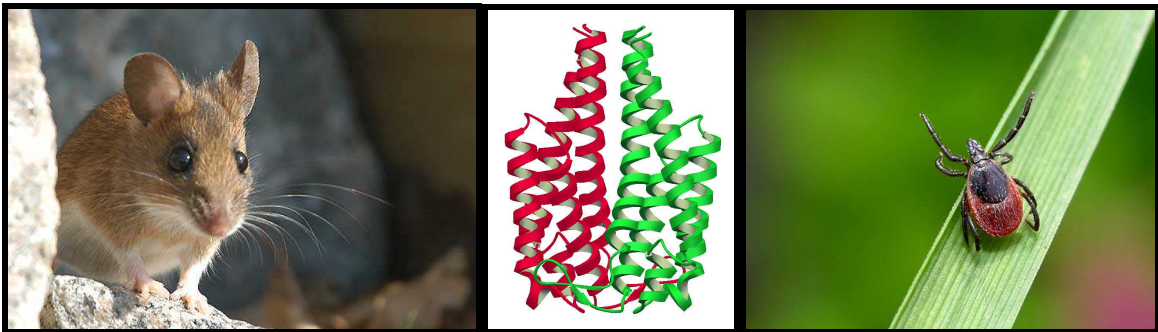


Ecologie de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en Suisse : dynamique saisonnière de la tique *Ixodes ricinus*, sa relation avec les rongeurs, et implication des modes de transmission de *B. afzelii* entre rongeurs et tiques sur la diversité du gène *ospC* chez *B. afzelii*.



Thèse

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

par

David Pérez Bertoni

Acceptée sur proposition du Jury :

Dr Lise Gern, directrice de thèse
Prof. Bruno Betschart, membre du jury
Dr Lorenza Beati, membre du jury
Dr Guy Baranton, membre du jury

Soutenue le 26 août 2011

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences
Institut de Biologie
Laboratoire d' Eco-épidémiologie des Parasites
Université de Neuchâtel
Rue Emile-Argand 11
CH-2000 Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Ecologie de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en Suisse : dynamique saisonnière de la tique *Ixodes ricinus*, sa relation avec les rongeurs, et implication des modes de transmission de *B. afzelii* entre rongeurs et tiques sur la diversité du gène *ospC* chez *B. afzelii*

David Pérez Bertoni

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), L. Beati (Georgia Southern University, USA),
MM. B. Betschart, G. Baranton (Institut Pasteur, Paris)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 17 octobre 2011

Le doyen :
P. Kropf

P. Kropf

I. Résumé

En Europe, les agents de la Borréliose de Lyme (BL) sont maintenus dans la nature via un cycle de transmission impliquant la tique *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) et des hôtes réservoirs. Le gène codant pour l'« Outer Surface Protein C » (OspC), une lipoprotéine plasmidique exprimée par les spirochètes lors du repas sanguin de la tique et lors de la dissémination chez l'hôte, est un marqueur génétique pouvant être associé à la pathogénèse et à la sévérité d'une BL. L'analyse du gène *ospC* a permis de classifier des isolats de *Borrelia. burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sl) en groupes *ospC*.

De 2003 à 2005, nous avons prélevé de façon mensuelle des tiques libres dans 2 sites du plateau suisse, les Portes-Rouges (PR) et le Staatswald (SW). Parallèlement, les micromammifères ont été piégés afin de rechercher la présence de stades immatures d'*I. ricinus* et l'infection des rongeurs a été vérifiée par xénodiagnose. La typisation des génoespèces de *B. burgdorferi* sl chez les tiques libres, les tiques des rongeurs et les tiques de xénodiagnose a été réalisée par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) et « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP). Les isolats de *B. afzelii*, génoespèce associée aux rongeurs, obtenus de ces 3 populations de tiques, ont été analysés par « Single Stranded Conformational Polymorphism » (SSCP) et classifiés par groupes *ospC*.

Nous avons observé durant les 3 années des variations dans l'évolution saisonnière de la densité de tiques libres. La densité de nymphes en quête était plus importante au PR alors que la proportion de rongeurs infestés par des stades immatures d'*I. ricinus* était similaire dans les 2 sites. Des tiques ont été observées sur les rongeurs en automne et en été alors que la densité de tiques libres était faible voire inexistante. Les rongeurs du SW présentaient des infestations par des immatures d'*I. ricinus* élevées et 28% étaient infestés par des nymphes et des larves (11% au PR). Cette nutrition simultanée de tiques regroupées sur un hôte porte le nom de co-feeding et permet la transmission de pathogènes entre tiques infectées et tiques non-infectées, sans présence d'infection systémique chez l'hôte. Malgré une situation favorable de co-feeding, principalement au SW, seul *B. afzelii* et *B. bavariensis* ont été transmises des rongeurs aux tiques laissant supposer que le co-feeding ne contribue pas au maintien de la diversité des génoespèces de *B. burgdorferi* sl présentes chez les tiques libres.

L'analyse du gène *ospC* nous a permis de classer les isolats de *B. afzelii* provenant des différentes populations de tiques en 10 groupes *ospC*, dont 8 déjà décrits (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, VS461) et 2 nouveaux (ME et YU). La plus grande diversité de groupes *ospC* a été observée chez les tiques en quête. Les isolats de *B. afzelii* obtenus à partir de larves d'*I. ricinus* s'étant nourries en co-feeding avec des nymphes présentaient une diversité de groupes *ospC* plus importante que celles s'étant nourries seules. Ce travail montre pour la première fois l'importance du co-feeding dans le maintien de la diversité intraspécifique de *B. afzelii* dans la nature.

II. Mots clés

Ixodes ricinus, évolution saisonnière, *Borrelia afzelii*, micromammifères, protéine OspC, co-feeding, SSCP, diversité intraspécifique.

Table des matières

I. Résumé	9
II. Mots clés	9
1. Introduction	9
1.1. Le vecteur : les tiques.....	9
1.1.1. <i>Ixodes ricinus</i>	10
1.1.1.1. Hôtes d' <i>I. ricinus</i> et hôtes réservoirs de <i>Borrelia</i> spp.....	11
1.1.1.2. Transmission de <i>Borrelia</i> sl chez <i>I. ricinus</i>	13
1.1.1.2.1. Transmission transovarienne et transstadiale.....	13
1.1.1.2.2. Transmission par co-feeding	14
1.2. Le pathogène : <i>B. burgdorferi</i> sl	15
1.2.1. <i>B. afzelii</i>	16
1.2.2. Génétique de <i>B. burgdorferi</i> sl.....	17
1.2.2.1. Organisation génomique de <i>B. burgdorferi</i> sl.....	17
1.2.2.2. Les plasmides	18
1.3. Les protéines de surface : <i>Outer Surface Proteins</i>	19
1.3.1. Les protéines OspA et OspB	20
1.3.2. La protéine OspC	20
1.3.2.1. Expression durant le cycle biologique des protéines OspC et OspA	21
1.3.2.2. Fonctions de la protéine OspC	22
1.3.2.3.1. Facteurs et mécanismes responsables de la diversité de OspC	25
1.3.2.3.1.1. Facteurs	25
1.3.2.3.1.2. Mécanismes	26
1.4. Marqueurs génétiques et pathogénicité chez <i>B. burgdorferi</i> sl.....	27
1.5. Aspects cliniques de la Borréliose de Lyme	28
1.5.1. Historique	28
1.5.2. Manifestations cliniques.....	29
1.5.2.1. Première phase : infection locale du patient par des borrélioses	29
1.5.2.2. Deuxième phase : dissémination des spirochètes chez le patient (phase aiguë) ..	31
1.5.2.3. Troisième phase : persistance des spirochètes chez le patient (phase chronique) ..	31
1.5.2.4. Manifestations cliniques selon les géoespèces.....	32
1.5.3. Diagnostic et traitement	33
1.6. Buts et objectifs.....	34
2. Matériel et méthodes	35
2.1. Zones d'étude	35
2.1.1. Forêt des Portes-Rouges.....	35

2.1.2. Forêt du Staatswald	35
2.2. Données météorologiques	36
2.3. Récolte des tiques libres	36
2.4. Micromammifères	36
2.4.1. Méthode de piégeage.....	36
2.4.2. Récolte des tiques s'étant nourries sur les rongeurs.....	37
2.4.3. Xénodiagnose	37
2.5. Mise en évidence de <i>B. burgdorferi</i> sl chez les tiques	38
2.5.1. Culture des borrelies.....	38
2.5.1.1. Tiques libres	39
2.5.1.2. Tiques s'étant nourries sur les rongeurs et de xénodiagnose	40
2.5.2. Isolement de l'ADN de <i>B. burgdorferi</i> sl.....	40
2.5.3. Détermination des géoespèces de <i>B. burgdorferi</i> sl par PCR et RFLP.....	40
2.5.3.1. PCR	40
2.5.3.2. RFLP	42
2.6. Observation du polymorphisme du gène <i>ospC</i> par SSCP	43
2.6.1. Amplification du gène <i>ospC</i>	43
2.6.2. SSCP.....	45
2.6.3. Séquençage.....	47
3. Résultats	49
3.1. Publication 1	50
3.2. Publication 2.....	73
4. Discussion générale	89
5. Remerciements	97
6. Bibliographie.....	99
7. Annexes	121
7.1. Préparation du gel d'agarose 1%	121
7.2. Préparation du gel pour RFLP.....	121
7.2.1. Gel de séparation	121
7.2.2. Gel de de concentration.....	122
7.3. Protocole d'utilisation du kit GeneGel Exel	123
7.4. Protocole d'utilisation du kit DNA Silver Staining	136
7.5. Nouveaux groupes <i>ospC</i> séquencés	147
7.5.1. Séquences de ME (230 pb).....	147
7.5.2. Séquences de YU (230 pb).....	147
7.6. Relevées météorologiques.....	148

N.B. Sources des images de la page de titre, de gauche à droite : JC Schou, Kumaran et al. 2001, JC Schou.

1. Introduction

1.1. Le vecteur : les tiques

Les tiques sont des arthropodes hématophages appartenant à l'ordre des Acariens (Sonenshine, 1991). Ectoparasites obligatoires, les tiques ont besoin de plusieurs repas sanguins afin d'accomplir un cycle de vie complet. Les tiques sont des vecteurs importants de pathogènes tels que virus, nématodes, bactéries et protozoaires (Sonenshine, 1991).

D'un point de vue taxonomique, les tiques se répartissent en 3 familles distinctes présentant des différences morphologiques : les tiques dures (Ixodidae) possèdent un scutum sclérotisé alors que les tiques molles (Argasidae) n'en possèdent pas. La troisième famille (Nuttalliellidae), dont seule l'espèce *Nuttalliella namaqua* a été décrite, est caractérisée par des critères morphologiques intermédiaires aux 2 familles précédemment citées (Camicas et al. 1998).

L'agent responsable de la Borréliose de Lyme (BL) (cf. chapitre 1.5), *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sl), est transmis principalement par 4 espèces de tiques du genre *Ixodes* (*I.*) que l'on regroupe sous le nom de « complexe *I. ricinus* / *I. persulcatus* » (Eisen et Lane, 2002). La répartition géographique de ces 4 espèces est différente (Figure 1).

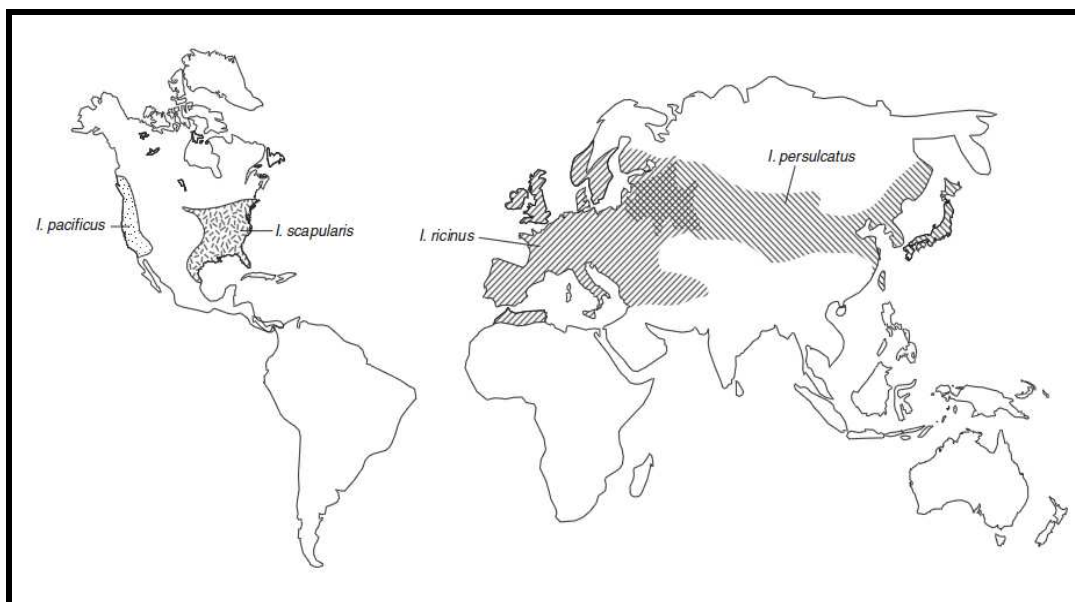


Figure 1 : Distribution géographique du complexe *I. ricinus/persulcatus* (Selon Eisen et Lane, 2002, dessin de B. Kaye).

Aux Etats-Unis, 2 espèces de tiques sont les principales vectrices de l'agent de la BL (Piesman, 2002) : on retrouve *I. scapularis* sur la côte est alors que la distribution de *I. pacificus* s'étend le long de la côte ouest pour atteindre le sud-ouest canadien.

En Europe, *I. ricinus* est la principale espèce vectrice de l'agent de la BL (Gern et Humair, 2002) : *I. ricinus* est largement distribué de l'Europe du Nord à l'Afrique du Nord et s'étend du Portugal jusqu'aux pays baltes et en Russie où sa distribution chevauche celle de *I. persulcatus*, principal vecteur de *B. burgdorferi* et de l'Asie centrale jusqu'au Japon (Korenberg et al. 2002, Miyamoto et Masuzawa, 2002).

1.1.1. *Ixodes ricinus*

I. ricinus est le principal vecteur des agents de la BL en Suisse. Il a également été démontré que *I. hexagonus* était capable de transmettre des borrelies (Gern et al. 1991). Le cycle de vie d'*I. ricinus* (Figure 2) comporte 3 stades différents (tique triphasique). Les œufs, déposés par la femelle au sol, vont éclore pour donner naissance à des larves qui rapidement se mettent en quête d'un hôte en vue de leur premier repas sanguin qui durera entre 2 et 4 jours. Suite à ce repas, la larve gorgée tombe au sol et commence à digérer les nutriments présents dans le sang. Grâce à cet apport énergétique, la larve mue en nymphe, qui après une courte phase libre, se met à la recherche d'un nouvel hôte adéquat. Suite à ce nouveau repas sanguin qui durera entre 3 et 6 jours, la nymphe mue en adulte, mâle ou femelle. La femelle aura besoin d'un dernier repas sanguin (6 à 10 jours) sur un nouvel hôte : si un mâle la féconde, la femelle d'*I. ricinus* pourra achever son cycle de vie et pondre des œufs avant de mourir (Aeschlimann et al. 1972).

Les mâles d'*I. ricinus* sont considérés comme des ectoparasites facultatifs n'ayant pas besoin de repas sanguin pour fertiliser une femelle, ces derniers ne se nourrissant pas ou très peu (Balashov, 1972).

Tant les facteurs biotiques (espèces, densité et comportements des hôtes, structure de la végétation) que abiotiques (conditions climatiques), tels que l'humidité et la température, vont influencer et modeler l'évolution saisonnière des tiques (Randolph et al. 2002, Randolph 2004, Perret et al. 2004). Les tiques *I. ricinus* en quête attendent un hôte potentiel positionnées à différentes hauteurs sur la végétation (Gigon 1985, Storey and Randolph 1999, Perret et al. 2004). Durant cette quête, *I. ricinus* doit faire face à différentes conditions climatiques, souvent en dessous des valeurs critiques d'humidité qui leur permettent de gérer leur balance hydrique (Needham et Teel, 1986). C'est pourquoi, les tiques alterneront entre phases de quête et phases de réhydratation dans les couches plus basses et humides de la végétation (Lees 1946, Lees and

Milne, 1951, Rudolph and Knülle 1979). La température influence le comportement des tiques. La mise en activité d'*I. ricinus* commence lorsque la température de l'air approche les 7°C (MacLeod, 1936, Perret et al. 2000) et la température joue également un rôle primordiale dans le développement des tiques (Campbell 1948, Randolph 2004). Pour les raisons précédemment citées, l'humidité et la température sont des facteurs abiotiques importants qui vont donc influencer le comportement des tiques et ainsi, leur évolution saisonnière (Perret et al. 2000). Différents travaux ont démontré qu'en Suisse, l'évolution saisonnière de la densité de tiques en quête était variable au cours du temps et pouvait présenter un profil unimodal (densité maximale mesurée au printemps) ou bimodal (densités maximales mesurées au printemps et en automne) (Perret et al. 2000, Jouda et al. 2004a, 2004b, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007b).

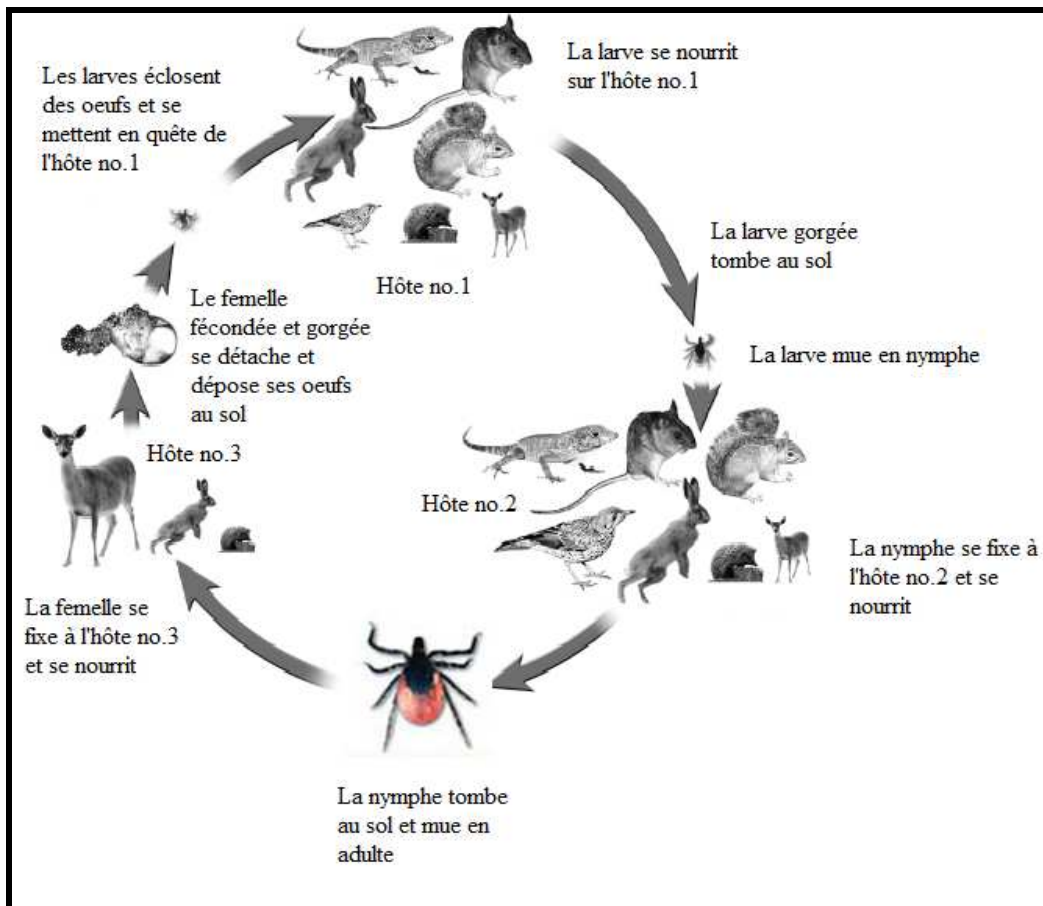


Figure 2 : Cycle de vie d'*I. ricinus* (Modifié de Eisen et Lane, 2002, dessin de B. Kaye).

1.1.1.1. Hôtes d'*I. ricinus* et hôtes réservoirs de *Borrelia* spp

En Europe, *I. ricinus* se nourrit sur une grande variété de vertébrés, certains jouant le rôle d'hôtes réservoirs de pathogènes, d'autres n'intervenant que dans le cycle biologique de la tique. Les

stades juvéniles d'*I. ricinus* se nourrissent de façon préférentielle sur des vertébrés de petite taille (micromammifères, oiseaux, lézards) mais il n'est pas rare de les retrouver sur des vertébrés de grande taille. Les stades adultes d'*I. ricinus* sont quant à eux retrouvés principalement sur des mammifères de taille moyenne à grande (ongulés, canidés). L'Homme fait office d'hôte accidentel et peut être parasité par tous les stades d'*I. ricinus*.

Un large spectre de vertébrés, en jouant le rôle d'hôtes réservoirs, permet de maintenir *B. burgdorferi* si dans des régions endémiques: un animal sera considéré comme hôte réservoir s'il est capable dans le temps de maintenir et de transmettre le pathogène au vecteur. Il est également intéressant de noter que des vertébrés tels que le chevreuil (*Capreolus capreolus*) (Jaenson et Tälleklint 1992), le sanglier (*Sus scrofa*) (Ercolini et al. 1995) ou encore le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) (Matuschka et al. 2000) peuvent faire office d'hôtes pour *I. ricinus* (accomplissement du repas sanguin) sans forcément jouer un rôle primordial dans le maintien et la transmission des spirochètes.

Les mulots du groupe *Apodemus* (*A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius*) ainsi que les campagnols roussâtres (*Myodes glareolus*) (*M. glareolus*) (Figure 3) constituent des hôtes-réservoirs très importants puisque une fois infectés par des borrelies, ils restent infectieux toute leur vie (Matuschka et al. 1992, De Boer et al. 1993, Humair et al. 1993, Gern et al. 1994).



Figure 3 : *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* et *M. glareolus* (de gauche à droite, photos : JC Schou).

Parmi les rongeurs, les écureuils (*Sciurus carolinensis*, *S. vulgaris*), les loirs (*Glis glis*) et les lérots (*Eliomys quercinus*) sont aussi des hôtes-réservoirs (Matuschka et al. 1994, 1999, Humair

et al. 1993, Craine et al. 1997). D'autres espèces de mammifères tels que les lièvres (*Lepus europaeus*, *L. timidus*) (Tälleklint et Jaenson 1993, 1994), les musaraignes (*Sorex minutus*, *S. araneus*, *Neomys fodiens*) (Tälleklint et Jaenson 1994), les hérissons (*Erinaceus sp*) (Gray et al. 1994, Gern et al. 1997, Skuballa et al. 2007) peuvent héberger et transmettre des borrelies.

La capacité de maintien et de transmission des borrelies chez les oiseaux a également été mise en évidence (Olsén et al. 1993, Craine et al. 1997, Humair et al. 1998a, Kurtenbach et al. 1998a, 1998b) : des spirochètes ont été isolés à partir de stades immatures d'*I. ricinus* s'étant nourris sur différentes espèces telles que les merles (*Turdus sp.*), les rouge-gorges (*Erithacus rubecula*) et les faisans (*Phasianus colchicus*). Les oiseaux peuvent jouer un rôle important dans le cycle épidémiologique de la BL en agissant comme disséminateurs des foyers infectieux par le transport de tiques elles-mêmes infectées (Poupon et al. 2006).

Il est intéressant de noter que la tique, en plus d'être vecteur, fait office de réservoir puisqu'elle maintient l'infection par transmission verticale de la femelle aux œufs (transmission transovarienne) et peut transmettre des borrelies durant tout son cycle biologique (Stanek et al. 1986, Bellet-Edimo et al. 2005).

En Europe, 9 géoespèces de borrelies ont été décrites (cf. chapitre 1.2). Différents travaux ont mis en évidence qu'il existait une spécificité entre l'hôte et la géoespèce de borrelie l'infectant. En Europe centrale, les micromammifères tels que *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* et *M. glareolus* sont fréquemment infectés par *B. afzelii* (Humair et al. 1995, 1999, Hu et al. 1997, Richter et al. 1999) et plus rarement par *B. bavariensis* (Hügli et al. 2002, Margos et al. 2009, Pérez et al. submitted). *B. garinii* semble être la géoespèce la plus observée dans les tiques s'étant nourries sur des oiseaux (Olsen et al. 1995, Humair et al. 1998a, Kurtenbach et al. 1998b) bien que *B. valaisiana* et *B. afzelii* aient également été isolées à partir d'*I. ricinus* s'étant nourries sur des oiseaux (Humair et al. 1998a, Franke et al. 2010). *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* sont les deux géoespèces fréquemment associées avec les écureuils (*S. vulgaris*) (Craine et al. 1997, Humair et Gern 1998).

1.1.1.2. Transmission de *Borrelia* sl chez *I. ricinus*

1.1.1.2.1. Transmission transovarienne et transstadiale

Les larves ne sont que rarement infectées lors de leur premier repas sanguin, vu que la transmission transovarienne de *B. burgdorferi* sl est un phénomène rare chez *I. ricinus* puisque moins de 2 % de femelles récoltées dans la nature transmettent les spirochètes à leur progéniture (Burgdorfer et al. 1984, Zhioua et al. 1994, Nefedova et al. 2004, Bellet-Edimo et al. 2005).

Néanmoins, cette transmission verticale rare est très efficace lorsqu'elle a lieu puisque 44 à 100% des œufs issus d'une mère porteuse de borrelies peuvent être infectés à leur tour (Burgdorfer et al. 1984, Stanek et al. 1986, Bellet-Edimo et al. 2005).

Les larves s'infecteront si lors de leur premier repas sanguin elles rencontrent un hôte-réservoir porteur de borrelies. Les nymphes issues de cette cohorte de larves seront, elles aussi, infectées puisque la transmission transstadiale est efficace dans la transmission du pathogène aux stades suivants (Burgdorfer et al. 1984). Les nymphes présentent des taux d'infection plus importants que les larves, compris entre 2 et 43% (Hubalek et Halouzka 1998). C'est pourquoi la présence de nymphes sur un hôte-réservoir augmentera la probabilité que ce dernier s'infecte de borrelies pouvant être par la suite transmises aux larves effectuant leur premier repas sanguin.

1.1.1.2.2. Transmission par co-feeding

Dans la nature, lors du repas sanguin, des tiques infectées et non-infectées se nourrissent de façon rapprochée au niveau de la peau de l'hôte parasité, généralement regroupées en agrégats (Figure 4).

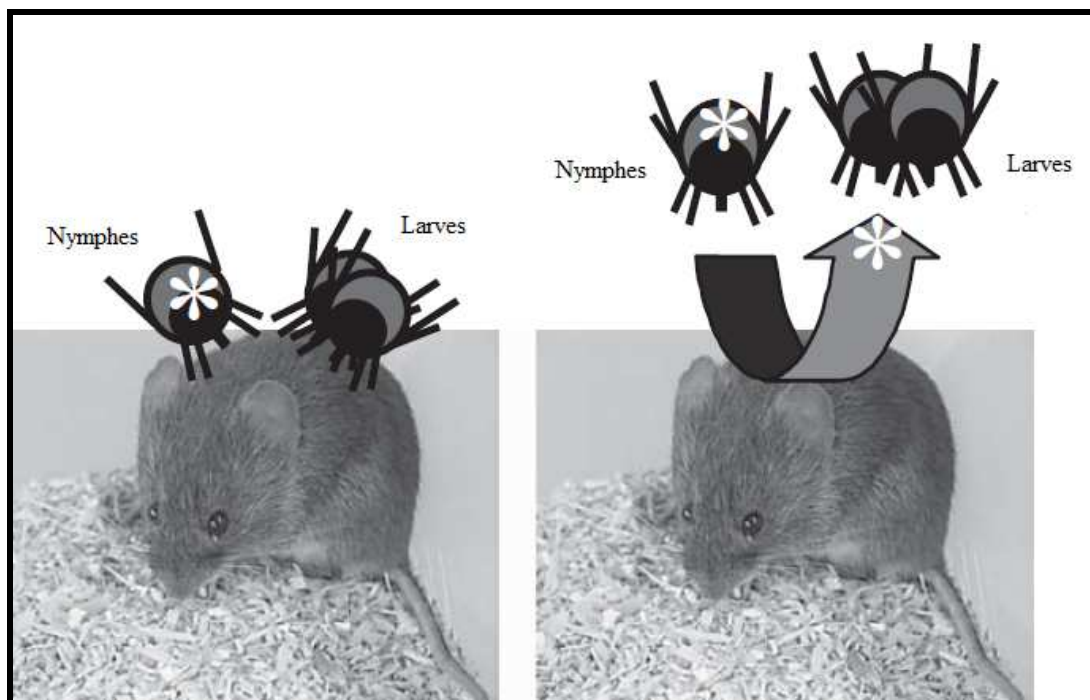


Figure 4: Transmission par co-feeding (Selon Gern 2009, photos: Y. Kneubühler).

Des pathogènes peuvent être transmis d'une tique infectée à une tique non-infectée, sans présence d'infection systémique chez l'hôte : ce mode de transmission porte le nom de co-feeding (Jones et al. 1997). Préalablement mise en évidence dans la transmission du virus Thogoto et de l'encéphalite à tiques (Jones et al. 1987, Labuda et al., 1997), cette voie de

transmission a également été démontrée pour *B. burgdorferi* sl par *I. ricinus* (Gern et Rais, 1996). Du fait que les nymphes présentent des taux d'infection par *B. burgdorferi* sl plus élevés que les larves, la présence de nymphes potentiellement infectées se nourrissant sur un hôte augmentera la probabilité de transmission par co-feeding aux tiques (larves ou nymphes) avoisinantes (Gern et Rais 1996, Randolph et al. 1996). Bien que cette voie de transmission ait été démontrée en laboratoire, son rôle et son importance dans la nature sont encore peu connus dans la problématique de la BL.

1.2. Le pathogène : *B. burgdorferi* sl

Le genre *Borrelia* appartient à l'ordre des Spirochaetales qui lui-même se divise en 2 familles, les Spirochaetaceae et les Leptospiraceae.

Le genre est également couramment divisé en 3 groupes d'organismes transmis par des arthropodes provoquant des pathologies différentes :

- Les borrelies du complexe *B. burgdorferi* sl, responsable de la BL.
- Les borrelies des fièvres récurrentes.
- La borrelie *B. anserina*, agent étiologique de la spirochétose aviaire.

Le complexe *B. burgdorferi* sl comporte au moins 19 génoespèces : *B. burgdorferi* ss (Johnson et al. 1984), *B. afzelii* (Canica et al. 1993), *B. garinii* (Baranton et al. 1992), *B. valaisiana* (Wang et al. 1997), *B. lusitaniae* (Le Flèche et al. 1997), *B. japonica* (Kawabata et al. 1993), *B. andersonii* (Marconi et al. 1995), *B. bissettii* (Postic et al. 1998), *B. tanukii* et *B. turdi* (Fukunaga et al. 1996), *B. sinica* (Masuzawa et al. 2001), *B. spielmani* (Richter et al. 2006), *B. bavariensis* (Margos et al. 2009), *B. finlandensis* (Casjens et al. 2011), *B. yangtze* (Chu et al. 2008), *B. americana* (Rudenko et al. 2009), *B. californiensis* (Postic et al. 2007), *B. carolinensis* (Rudenko et al. 2011) et *B. kurtenbachii* (Margos et al. 2010).

En Europe, 9 génoespèces ont été décrites (*B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissettii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* et *B. finlandensis*) dont 5 sont clairement pathogènes pour l'Homme (*B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* et *B. spielmani*). Les pathogénicités de *B. bissettii*, *B. lusitaniae* et *B. valaisiana* restent à prouver bien que ces génoespèces aient été isolées de patients présentant des signes cliniques de BL (Picken et al. 1996, Rijpkema et al. 1997, Strle et al. 1997, Godfroid et al. 2003, Collares-Pereira et al. 2004). Les travaux de Derdakova et al. (2003) et de Rauter et al. (2005) ont démontré que *I.*

ricinus pouvait présenter des infections à borrelies multiples et cela dans toute l'Europe. Les infections mixtes les plus courantes impliquent généralement *B. garinii* et *B. valaisiana* ainsi que *B. garinii* et *B. afzelii*.

Les borrelies sont facilement reconnaissables en microscopie à fond noir, de par leur morphologie particulière : mesurant entre 10 et 30 μm de longueur, elles présentent une forme effilée et spiralée caractéristique du genre *Borrelia* (Figure 5).



Figure 5 : Agglomérat de borrelies en microscopie à balayage électronique (J. Berger, Science Photo Library).

Si on observe une borrelie en coupe transversale de l'extérieur vers l'intérieur, différentes structures peuvent être observées. Une mince couche mucoïde (S-layer) tapisse la membrane externe composée de 45-62% de protéines, 23-50% de lipides et 3-4% d'hydrates de carbone (Barbour et Hayes 1986). Dans l'espace périplasmique s'insère un nombre variable de flagelles (entre 7 et 30) s'enroulant autour du cylindre protoplasmique. Les flagelles sont insérés à chaque extrémité des spirochètes leur donnant ainsi une morphologie et une mobilité caractéristiques (Burgdorfer et al. 1982, Barbour et Hayes 1986, Goldstein et al. 1994, Motaleb et al. 2000). Le cylindre protoplasmique est composé d'une membrane cellulaire, composée de peptidoglycane, et d'une membrane cytoplasmique entourant le cytoplasme dans lequel se trouvent les vacuoles, les ribosomes ainsi que le matériel génétique.

A noter que ces bactéries ne sont pas mises en évidence par coloration de Gram mais la structure et la composition de la membrane est différente de celle des bactéries Gram -.

1.2.1. *B. afzelii*

B. afzelii est présente en Europe et en Asie (Masuzawa 2004) et est exclusivement transmise par *I. ricinus* (Europe) et *I. persulcatus* (Asie). A la différence d'autres génoespèces telles que *B.*

burgdorferi ss, *B. afzelii* reste localisée sur les 2 continents sans que sa distribution ne s'étende à d'autres continents, en raison de sa relation avec ses vecteurs et ses hôtes (Bergström et al. 2002). *B. afzelii* infecte fréquemment les rongeurs (Humair et al. 1995, 1999, Hu et al. 1997, Richter et al. 1999) et est généralement associée chez l'Homme aux lésions cutanées telles que le Lymphocytome Cutané Bénin (LCB, cf. chapitre 1.5.2.1) (Grange et al. 2002) et est le principal agent responsable de l'Acrodermatite Chronique Atrophiante (ACA, cf. chapitre 1.5.2.3) (Assous et al. 1993, Wang et al. 1999b). *B. afzelii* a été également isolée à partir d'Erythème Migrans (EM, cf. chapitre 1.5.2.1) dans 70-90 % des cas en Europe et est le principal agent de la BL avec *B. garinii* sur ce continent (Strle et Stanek, 2009). D'un point de vue génétique, *B. afzelii* est proche de *B. garinii* et serait dérivée de *B. burgdorferi* ss (Farlow et al. 2002).

1.2.2. Génétique de *B. burgdorferi* sl

1.2.2.1. Organisation génomique de *B. burgdorferi* sl

En 1997, la séquence complète de la souche *B. burgdorferi* ss B31 a été publiée par Fraser et al., travaux complétés par la suite par Casjens et al. en 2000. Ces travaux ont démontré une organisation génomique propre aux borrelies qui les différencie des autres procaryotes.

- Le génome est composé d'un chromosome linéaire d'une longueur de 910'725 pb.
- De 12 plasmides linéaires (361'364 pb) et 9 plasmides circulaires (249'330 pb) représentant au total un génome de 1,52 Mpb.

La séquence du chromosome linéaire possède 853 origines de réplifications (Orfs) dont 500 (59 %) codent pour des protéines homologues à d'autres bactéries et dont la fonction biologique est connue. Ces protéines sont principalement impliquées dans des processus fondamentaux tels que la répllication, la transcription, la chémotaxie, le métabolisme énergétique et le transport à travers les membranes. Le reste des gènes du chromosome linéaire (40 %) codent des protéines aux fonctions biologiques peu connues ainsi que des protéines sans homologie avec les protéines procaryotes déjà caractérisées. Les gènes codant pour de nombreuses voies de biosynthèses sont absents (cycle de Krebs, phosphorylation oxydative) mais les borrelies semblent capables de convertir certains sucres en lactate puis en ATP (Casjens et al. 2000). Cette simplification métabolique est en accord avec la vie de parasite obligatoire des borrelies qui doivent obtenir de l'hôte, arthropode ou vertébré, un grand nombre de molécules indispensables telles que lipides, enzymes ou acides aminés qu'elles sont incapables de synthétiser *de novo*. C'est pourquoi on

retrouve également chez le genre *Borrelia* de nombreux gènes codant pour des protéines intervenant dans le transport des nutriments indispensables (Kelly 1971, Wyss et Johnson 1996, Casjens et al. 2000).

1.2.2.2. Les plasmides

Casjens et al. (2000) ont démontré que la souche B31 possédait 21 plasmides en plus du chromosome linéaire, ce qui représente le nombre le plus élevé de matériel génétique extra-chromosomal du monde bactérien (Figure 6).

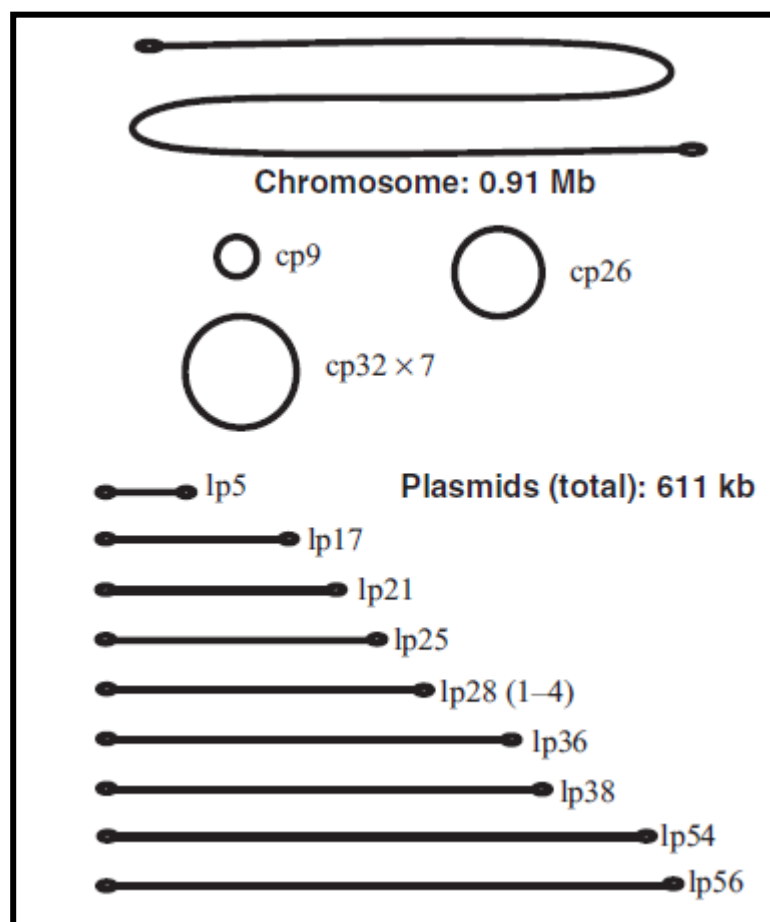


Figure 6 : organisation génomique de *B. burgdorferi* ss B31 (selon Bergström et al. 2002).

D'un point de vue évolutif, d'intenses réarrangements génétiques ont eu lieu entre les plasmides, le meilleur exemple étant le plasmide cp32 dont 7 homologues dupliqués ont été caractérisés chez B31. De nombreux plasmides semblent être le résultat d'insertion et de délétion de matériel génétique au sein d'une même cellule : la structure du plasmide linéaire lp21 serait le résultat de l'insertion d'un fragment de 12,8 kpb sur un homologue de lp5 (Casjens et al. 2000).

Les plasmides linéaires, à l'exception de lp-28 et lp-54, semblent être issus de duplications chaotiques et de réarrangements de fragments d'ADN provenant de différents plasmides linéaires. La conséquence de ces duplications passées est la présence de nombreux pseudogènes et gènes paralogues au sein des plasmides (Casjens 1999, Casjens et al. 2000). Les gènes paralogues sont des gènes homologues ayant divergé suite à un phénomène de duplication génique et qui coexistent dans le même organisme (Vernier et al. 1993) et les pseudogènes sont des séquences d'ADN similaires à un gène mais inactives : ces gènes ne codent pas de protéines fonctionnelles car des mutations ont introduit un codon stop, des décalages du cadre de lecture, une insertion ou une délétion d'ADN qui interfèrent avec les mécanismes de transcription. Ces pseudogènes seraient issus d'une *Borrelia* ancestrale dont seuls les gènes strictement nécessaires à la vie de la bactérie auraient perduré au cours de l'évolution.

Des études ont montré une corrélation entre le bagage plasmidique et l'infectivité : le repiquage *in vitro* des borrelies provoque une perte de certains plasmides ce qui entraîne une diminution de l'infectivité des bactéries chez la souris (Barbour 1988, Norris et al. 1995, Xu et al. 1996).

A la différence des gènes présents sur le chromosome linéaire, la majorité des gènes localisés sur les plasmides de la souche B31 (535 Orfs) ne présentent que peu d'homologies avec des protéines procaryotes déjà caractérisées et seulement 8% codent pour des protéines aux fonctions bien connues. Les plasmides codent un grand nombre de protéines de surfaces : ces protéines, souvent antigéniques, jouent un rôle primordial, du fait qu'elles forment une interface entre la bactérie et le système immunitaire de l'hôte parasité. Il est envisageable que les duplications et nombreux réarrangements génétiques au sein des plasmides, permettent aux borrelies de présenter au système immunitaire de l'hôte une gamme élevée de molécules à leur surface et intrinsèquement, de parasiter de nombreux réservoirs (Stevenson et al. 1995, Kurtenbach et al. 2006).

1.3. Les protéines de surface : *Outer Surface Proteins*

Le séquençage complet du génome de *B. burgdorferi* sl a démontré qu'il existait de nombreux cadres de lecture codant pour des protéines modifiées de façon covalente par des lipides : ces protéines, appelées lipoprotéines, se situent à la surface de la membrane externe des borrelies et sont appelées communément, selon la terminologie anglaise, « outer surface proteins », Osps. A l'heure actuelle, 6 Osps, OspA-F ont été caractérisées (Brandt et al. 1990).

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes focalisés sur l'une de ces protéines de surface, OspC. Néanmoins, voici l'exemple de deux autres Osps, OspA et OspB qui sont les plus étudiées .

1.3.1. Les protéines OspA et OspB

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'étude de ces 2 protéines, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. OspA (31-33 kDa) et OspB (34-46 kDa) sont codées par le même opéron situé sur le plasmide linéaire de 49 kb (Barbour et Garon 1988). Ces protéines semblent jouer un rôle primordial dans la pathogénèse de la BL : le repiquage successif des borrelies dans le milieu BSK-II induit une diminution de l'expression de OspB ce qui provoque une baisse significative de l'infectivité des borrelies (Schwan et al. 1988, Comstock et al. 1993).

La protéine OspA est fortement exprimée par les borrelies dans les tiques à jeun mais son expression est réduite lors de la prise du repas sanguin (de Silva et al 1997, Schwan et Piesman 2000). OspA semble jouer un rôle primordial dans la colonisation du vecteur en permettant aux borrelies d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin de la tique (Pal et al. 2000).

1.3.2. La protéine OspC

La protéine OspC est une lipoprotéine codée par le plasmide circulaire cp 26 (Marconi et al. 1993, Sadziene et al. 1993). La protéine (22 Kda), sous sa forme biologiquement active, existe sous forme de dimères de 44 kDa présents à la surface de la membrane externe des borrelies. Kumaran et al. et Eicken et al. 2001 ont décrit la structure cristalline de OspC (Figure 7).

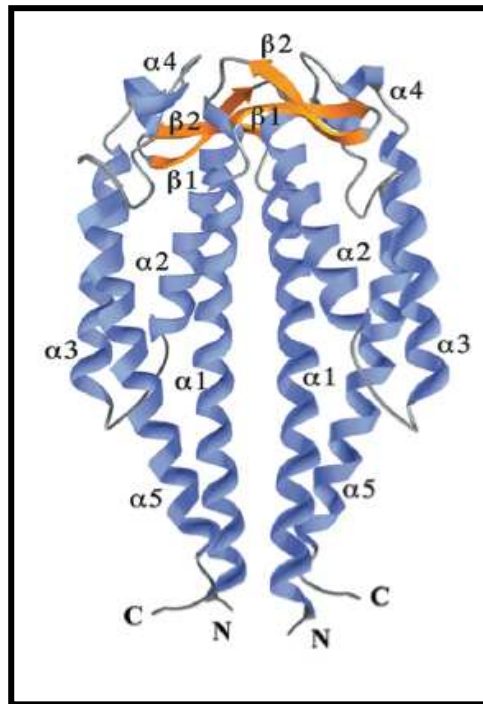


Figure 7 : Structure de la protéine OspC sous forme de dimère (Représentation de Ribbon selon Eicken et al. 2001).

Chaque monomère est composé de 5 hélices α anti parallèles, à l'exception des hélices α_4 et α_5 qui, elles, sont parallèles, et de 2 feuillets β . Le cœur de la protéine est formé par les hélices α_1 et α_5 des deux monomères alors que les régions externes et exposées de la protéine sont composées des hélices α_2 , α_3 , α_4 et les feuillets β_1 et β_2 . La protéine OspC est ancrée à la membrane par l'intermédiaire d'un résidu lipidique sur la cystéine en position N-terminale (Kumaran et al. 2001, Eicken et al. 2001). Les régions N- et C-terminales possèdent des régions relativement conservées alors que la partie centrale de la protéine est très variable.

1.3.2.1. Expression durant le cycle biologique des protéines OspC et OspA

De nombreux travaux ont été menés sur l'expression des deux protéines de surface les plus étudiées, OspA et OspC. Au cours du cycle biologique, les borrelies vont faire face à de nombreux changements dans leur environnement direct. Ces changements ont pour effet d'induire une synthèse différente de lipoprotéines, selon que la borrelie se trouve dans une tique à jeun, dans une tique se nourrissant sur un hôte ou dans l'hôte lui-même. La protéine OspA est fortement exprimée au niveau de l'intestin chez les tiques à jeun alors que l'OspC ne l'est pas (de Silva et al. 1997, Schwan et al. 2000). Rapidement après le début du repas sanguin, la protéine OspC est synthétisée alors que la production de l'OspA est freinée (Schwan et al. 1995)

et de grandes quantités d'OspC sont détectées sur les spirochètes présents au niveau des glandes salivaires. Les changements environnementaux à l'intérieur de la tique lors du repas sanguin impliquent une augmentation de la température, une diminution du pH ainsi que l'entrée de composants du sang de l'hôte vertébré parasité. Les variations combinées de ces facteurs lors du repas sanguin semblent moduler l'expression des protéines OspC et OspA (Schwan et al. 1995, Stevenson et al. 1995, Carroll et al. 2000, Yang et al. 2000, Seshu et al. 2004).

La protéine OspC est responsable d'une forte réponse immunologique en phase primaire de la BL puisque de fortes concentrations d'IgM anti-OspC sont détectées alors que la production d'immunoglobulines anti-OspA est faible ou absente. Lors des phases secondaires et tardives de la maladie, les anticorps anti-OspC (IgM ou IgG) ne sont plus décelables alors que dans certains cas, des IgG anti-OspA sont présents et associés à des arthrites chroniques (Kalish et al. 1993, 1995).

1.3.2.2. Fonctions de la protéine OspC

Différents travaux sur les gènes codant pour des Osps, basés principalement sur des anticorps anti-Osps ainsi que des souches mutantes n'exprimant sélectivement pas certains Osps, ont permis de mettre en avant des hypothèses sur les fonctions de la protéine OspC. OspC serait impliquée dans la migration des spirochètes de l'intestin aux glandes salivaires du vecteur durant le repas sanguin (Schwan et al. 1995, Gilmore et Piesman 2000, Schwan et Piesman 2000, Pal et al. 2004, Goettner et al. 2006) bien que d'autres travaux remettent en question cette fonction encore discutée (Grimm et al. 2004, Tilly et al. 2006).

La protéine OspC a été décrite comme nécessaire dans la pénétration et l'établissement de l'infection chez les mammifères (Grimm et al. 2004, Goettner et al. 2006, Stewart et al. 2006, Tilly et al. 2006, 2007), notamment par évasion du système immunitaire inné (Tilly et al. 2007, Xu et al. 2007, 2008). Les travaux de Xu et al. (2008) ont démontré que OspC facilitait la dissémination de *B. burgdorferi* ss à travers les tissus de l'hôte et que des spirochètes déficients du gène *ospC* ne pouvaient atteindre des sites distants. Ces études ont été récemment contredites par celles de Tilly et al. (2009) qui ont démontré que des spirochètes dépourvus du gène *ospC* pouvaient infecter et se disséminer dans des rongeurs. Ces chercheurs proposent un modèle dans lequel OspC n'est qu'une des nombreuses protéines responsables de l'infection et de la dissémination des spirochètes dans l'hôte. Les travaux de Lagal et al. (2006) ont démontré le rôle d'OspC comme récepteur du plasminogène. Les allèles d'OspC présentent des affinités différentes au plasminogène. Seuls quelques allèles vont permettre aux borrelies de traverser les

membranes capillaires et d'envahir des organes distants du site d'inoculation en utilisant le plasminogène de l'hôte. Ces allèles d'OspC, se liant avec une forte affinité au plasminogène humain, sont dits « invasifs » et seront discutés dans le chapitre suivant.

D'autres fonctions peuvent encore être attribuées à OspC dont notamment celle de permettre aux spirochètes de coloniser le cœur de leur hôte par adhésion aux cellules endothéliales (Antonara et al. 2007). De plus, OspC interagit avec Salp15, une protéine sécrétée dans la salive des tiques et surexprimée durant le repas sanguin. Cette interaction entre OspC et Salp15 va bloquer l'activation des cellules T CD4 dans l'hôte provoquant une augmentation de la charge bactérienne par immunosuppressions (Ramamoorthi et al. 2005).

1.3.2.3. Diversité génétique et invasivité

OspC présente une très forte hétérogénéité, génétique comme immunologique, et différents travaux ont démontré un polymorphisme moléculaire très élevé. Wilske et al. (1993) ont utilisé des anticorps monoclonaux afin de démontrer que la protéine OspC était immunologiquement hétérogène. Plus de 30 profils différents ont été obtenus par « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP) et séquençage du gène *ospC* de 76 souches par Livey et al. en 1995. Le séquençage et l'alignement du gène de nombreuses souches de *B. burgdorferi* ont permis de certifier la grande hétérogénéité de OspC, avec une homologie moyenne en acides aminés de 74.4 % (Theisen et al. 1995). Des études portant sur 18 loci du génome de *B. burgdorferi* ont démontré que le gène *ospC* était celui présentant la plus grande variabilité (Qiu et al. 2004).

Wang et al. (1999a) se sont intéressés à la diversité génétique du gène *ospC* au sein d'une population locale de *B. burgdorferi* ss. Sur la base des profils obtenus par « Single Strand Conformational Polymorphism » (SSCP) et par l'analyse de séquences de *ospC*, ils ont défini 19 groupes appelés « Major *ospC* Groups » en se basant sur l'observation que les allèles de *ospC* étaient soit très similaires (< 2% de divergence) soit très différents (> 8% de divergence). De plus, ils ont démontré que la grande diversité du gène *ospC*, observée sur des échantillons de *B. burgdorferi* ss provenant de différents continents, était retrouvée au sein de souches provenant d'une population locale.

En 1999, Seinost et al. étendirent les études de Wang et al. (1999a) et analysèrent de nouvelles séquences de *ospC* de *B. burgdorferi* ss disponibles sur Genbank : ils retrouvèrent les 19 groupes précédemment définis et en caractérisèrent 2 nouveaux, portant le nombre total de groupes à 21. Ils s'intéressèrent également aux séquences d'isolats provenant d'échantillons cliniques. Ils observèrent alors que parmi les 21 groupes, 4 groupes nommés A, B, I et K, étaient présents à des fréquences différentes, selon que les isolats de *B. burgdorferi* ss provenaient de tiques libres, de sites primaires d'infection (EM) ou de sites distants tels que le sang ou le liquide céphalo-rachidien. Les groupes A, B, I et K étaient plus fréquemment retrouvés au sein d'isolats provenant de sites primaires d'infection (EM) que d'isolats provenant de tiques libres. De plus, les souches isolées de sites distants se répartissaient toutes parmi les groupes A, B, I et K. Les groupes isolés à partir de ces mêmes sites ont été appelés *invasifs* et pour la première fois, un lien entre la diversité génétique du gène *ospC* et la pathogénicité chez *B. burgdorferi* ss était établi.

En 2001, Baranton et al. ont étendu ces travaux aux 3 espèces reconnues alors comme pathogènes et ont décrit que parmi 149 séquences de *ospC* analysées, 58 groupes *ospC* pouvaient être définis selon les critères (< 2% de divergence ou > 8% de divergence) de Wang et al.

(1999a). Parmi ces 58 groupes, seuls 10 groupes étaient invasifs et leur répartition parmi les 3 géoespèces était la suivante : 2 groupes chez *B. afzelii*, 4 chez *B. garinii* et 4 chez *B. burgdorferi* ss.

Le nombre de groupes *ospC* chez *B. burgdorferi* ss semble augmenter au fur et à mesure que de nouveaux isolats sont analysés : Lagal et al. (2003) ont déterminé la variabilité génétique de *ospC* et caractérisé par SSCP 69 groupes *ospC* ainsi que de nouveaux groupes invasifs pour chacune des 3 géoespèces à partir d'échantillons cliniques provenant de sites secondaires. En étudiant la distribution des groupes invasifs parmi les 69 groupes caractérisés, ils ont observé que les souches invasives n'appartenaient qu'à certains groupes *ospC*, et ne se retrouvaient pas dans la totalité des groupes. Ces résultats laissent supposer que des souches génétiquement différentes au niveau de *ospC* présentent des capacités d'invasivité différentes et que ce gène en est l'un des responsables, notamment, comme précédemment cité, de part une affinité différenciée avec le plasminogène.

A l'heure actuelle, 9 groupes invasifs ont été décrits chez *B. burgdorferi* ss (A, B, I, K, C, D E, N et Q, notation selon Seinost et al. 1999) (Wang et al. 1999a, Seinost et al. 1999, Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003, Earnhart et al. 2005), 8 groupes invasifs ont été décrits chez *B. afzelii*, notés A1 à A8 (Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003) et 11 groupes chez *B. garinii* notés G1 à G11 (Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003).

1.3.2.3.1. Facteurs et mécanismes responsables de la diversité de OspC

1.3.2.3.1.1. Facteurs

Le facteur principal conduisant au polymorphisme du gène *ospC* semble être la pression sélective exercée par le système immunitaire de l'hôte vertébré (Qiu et al. 1997, Wang et al. 1999). Comme cité précédemment, la protéine OspC est très immunogène et induit une forte réponse immunitaire spécifique dès le début de l'infection chez l'hôte. Les épitopes reconnus par le système immunitaire de l'hôte correspondent aux régions hypervariables de la protéine. Ces régions étant différentes entre souches de borrelies, l'hôte ne pourra éradiquer une infection que s'il a préalablement été au contact de la souche considérée (Barthold et al. 1999). Ces observations peuvent être extrapolées aux groupes *ospC* : une souche de borrelie ne pourra infecter un hôte vertébré que si l'hôte parasité n'a jamais été au contact d'une souche du groupe *ospC* en question et cela à cause de la réponse immunitaire secondaire ou mémoire immunitaire face à OspC. Les épitopes présentés par OspC sont stables au cours du temps, même après une année d'infection chez la souris (Stevenson et al. 1994). C'est pourquoi d'un point de vue

évolutif, seuls les allèles capables d'échapper au système immunitaire de l'hôte devraient être retrouvés au sein de la population totale de tiques, en raison de l'élimination des autres allèles par pression sélective. Néanmoins, il existe un grand nombre d'allèles si l'on observe une population de borrelies, maintenues à des fréquences différentes. Les allèles minoritaires pourront subsister chez l'hôte, lors d'infection de borrelies présentant des allèles différents, à condition qu'ils n'aient pas préalablement provoqués d'infection. Ce type de sélection, appelée « balancing selection », permet de maintenir au sein d'une population un polymorphisme génétique élevé au contraire d'une sélection directionnelle qui ne favorise qu'un seul allèle. Ce type de sélection est responsable, entre autres, de la diversité moléculaire des immunoglobulines et du complexe majeur d'histocompatibilité (Hedrick et Thomson, 1983, Hedrick 1998, Aguilar et al. 2004).

Brisson et al. (2004) se sont intéressés aux groupes *ospC* présents dans des larves d'*I. scapularis* s'étant nourries sur différentes espèces de mammifères : ils ont observé que au sein d'une espèce d'hôtes-réservoirs, les mêmes groupes *ospC* étaient fréquemment retrouvés. Par contre, des différences significatives ont été observées lorsqu'ils comparaient les groupes *ospC* isolés de tiques s'étant nourries sur des hôtes-réservoirs d'espèces différentes. Ils ont postulé que les différents hôtes potentiels des borrelies représentaient des niches écologiques hétérogènes dont la pression sélective tendrait à maintenir un haut taux de polymorphisme du gène *ospC*.

En résumé, le maintien d'un haut polymorphisme du gène *ospC* permet aux borrelies de coloniser un grand nombre d'hôtes différents, en présentant une importante gamme d'épitopes, qui, s'ils n'ont pas encore été en contact avec l'hôte, permettront aux spirochètes d'établir une infection chez le vertébré.

1.3.2.3.1.2. Mécanismes

Le transfert latéral de petits fragments d'ADN (< 1 kb) dans la région centrale et variable du gène *ospC* semble être un mécanisme primordial dans le maintien du polymorphisme. Ces transferts et recombinaisons peuvent avoir lieu de façon inter-et intra-spécifique (Dykhuizen et al. 1993, Livey et al. 1995). Chez les bactéries, la conjugaison, la transformation et la transduction permettent le transfert de grands fragments d'ADN, peu adaptés au gène *ospC*. De plus, le manque d'insertion et de transposons dans le génome de *B. burgdorferi* rend impossible de tels mécanismes et ne peut donc expliquer la diversité génétique de *ospC* (Fraser et al. 1997, Dykhuizen et Baranton 2001).

Des particules apparentées à des prophages ont souvent été observées en association avec des spirochètes (Hayes et al. 1983, Neubert et al. 1993, Humphrey et al. 1997, Calderaro et al. 1998).

Casjens et al. (1997) puis Eggers et Samuels (1999) ont caractérisé un phage dont la séquence dérive de celles des plasmides cp 32. Il semble donc que les borrelies utilisent des systèmes proches ou similaires aux prophages pour transférer de petits fragments d'ADN, responsables entre autre de la diversité du gène *ospC*.

1.4. Marqueurs génétiques et pathogénicité chez *B. burgdorferi* sl

Parallèlement aux études sur *OspC*, des groupes de recherches se sont intéressés à d'autres marqueurs génétiques dans le but d'associer génotype et pathogénicité. Les études de Liveris et al. (1995, 1996) et Wormser et al. (1999) sur l'espace intergénique 16S-23S rRNA ont permis de diviser par PCR-RFLP des isolats de *B. burgdorferi* sl provenant de patients souffrant de BL en 3 « major rRNA spacer type », notés RST1, RST2 et RST3. Ces études ont démontré qu'il existait une relation entre le génotype de *B. burgdorferi* sl et la pathogénicité chez l'Homme. Des observations similaires ont été faites sur des modèles murins. En effet, en fonction de leur appartenance à un groupe RST, les borrelies présentent une pathogénicité et une dynamique d'infection différentes chez les rongeurs de laboratoire (Wang et al. 2002, Dolan et al. 2004, Hanincová et al. 2008). Derdakova et al. (2004) ont également mis en évidence que certains groupes RST étaient transmis de manière plus efficaces aux tiques de xénodiagnoses se nourrissant sur des rongeurs, laissant supposer que certaines souches de *B. burgdorferi* ss seraient préférentiellement maintenues dans un modèle de transmission tique-rongeur.

Différents auteurs ont démontré qu'il existait une corrélation entre les marqueurs génétiques *OspC* et RST chez *B. burgdorferi* ss (Wang et al. 2002, Jones et al. 2006, 2009, Wormser et al. 2008) : leurs travaux ont permis d'associer les 3 groupes RST aux 21 groupes *ospC* précédemment définis aux USA par Seinost et al. (1999) et Wang et al. (1999a). Strle et al. (2011) ont récemment démontré que les souches RST1 (associées aux groupes *ospC* A) provoquaient, chez des patients souffrant de BL, des réponses inflammatoires et des symptômes plus sévères.

Nous noterons que d'autres marqueurs génétiques, en plus de *ospC* et RST, ont été investigués dans le but de les associer à la pathogénicité de *B. burgdorferi* sl. Nous citerons la protéine VlsE (Zhang et al. 1997, Labandeira-Rey et al. 2003), la protéine *OspA* (Fuchs et al. 1994, Gross et al. 1998), ou les « complement regulator-acquiring surface factors » (CRASP) (Stevenson et al. 2002, von Lackum et al. 2005). Il est intéressant de noter que les gènes potentiellement

impliqués dans la pathogénicité de *B. burgdorferi* si sont tous codés sur les plasmides et régulés lorsque *B. burgdorferi* si se trouve dans l'hôte, à l'exception de OspA (Baranton et al. 2009).

1.5. Aspects cliniques de la Borréliose de Lyme

1.5.1. Historique

Bien que l'agent responsable de la Maladie de Lyme ne soit connu que depuis le début des années 80, les manifestations cliniques ont été décrites séparément en Europe dès la fin du XIX siècle.

En 1883, l'allemand Buchwald décrit une atteinte cutanée diffuse qu'il appellera Maladie de Pick-Herxheimer, connue maintenant sous le nom d'ACA. En 1910, le suédois Afzelius décrit chez un patient piqué par une tique, une lésion cutanée qu'il nomme EM: cette manifestation clinique est par la suite observée par le Dr Lipschütz (1914) qui décrit le cas d'un patient dont l'EM persiste plus de sept mois. Le Dr Lipschütz parlera d'*Erythema Chronicum Migrans* (ECM) et la corrélation avec la piqûre de tique semble claire.

En 1922, Garin et Bujadoux observent chez un patient ayant développé un EM, des complications neurologiques (névralgies, paralysies), suite à une piqûre d'*I. hexagonus* : la responsabilité d'un virus est évoquée. Cette hypothèse sera discréditée en 1951 lorsque Hollström décrit la rémission d'EM chez des patients traités à la pénicilline, suggérant ainsi un agent infectieux bactérien et non viral.

Aux Etats-Unis, les premiers cas d'EM sont décrits en 1970 par Scrimanti. En 1977, Steere et al. observent plusieurs cas cliniques regroupant des dermatoses, des céphalées, des méningites et des arthrites, principalement chez des enfants provenant d'une région géographique regroupant les localités de Lyme, Old Lyme et East Haddam dans le Connecticut. Ces mêmes auteurs mettront en relation la fréquence des piqûres de tiques et la maladie dès lors appelée « Maladie de Lyme ».

En 1982, Burgdorfer et al. découvrent par hasard de longs spirochètes dans les tubes digestifs de la tique *I. dammini* alors qu'ils recherchent des rickettsies responsables de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses. Ils observent également que ces spirochètes réagissent avec les sera des patients souffrant de la Maladie de Lyme, démontrant ainsi leur implication dans cette maladie : l'agent causal de la maladie fut ainsi découvert.

En 1983, Barbour et al. isolent en Europe des spirochètes à partir d'intestins d'*I. ricinus* récoltés en Suisse : la réactivité des sera de patients atteints par la maladie de Lyme envers les bactéries est également positive.

En 1984, Johnson et al. étudient l'ADN des spirochètes impliqués dans la maladie de Lyme et établissent que l'agent responsable de l'EM en Europe et de l'arthrite aux Etats-Unis appartient au genre *Borrelia* : une nouvelle espèce est définie et appelée *B. burgdorferi* en l'honneur de Willy Burgdorfer qui le premier isola l'agent responsable de la Maladie de Lyme, appelée dès lors Borréliose de Lyme (BL).

1.5.2. Manifestations cliniques

Les informations résumées dans ce chapitre proviennent des ouvrages suivants: « Lyme Borreliosis » Edited by Gray, Kahl, Lane and Stanek, Cabi Publishing 2002, « Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis » Oschmann Patrick, Uni-Med 1999.

Le principal problème dans le diagnostic de la BL est le manque de symptômes précis et spécifiques. De plus, il existe une grande variabilité dans l'établissement de la maladie, que ce soit d'un point de vue des manifestations cliniques ou de leur durée. Néanmoins, on distingue habituellement trois stades évolutifs dans le développement de la maladie, bien que ces trois stades n'apparaissent pas forcément chez tous les patients. Le premier stade, caractérisé par une éruption cutanée appelée EM semble être l'un des premiers symptômes précis d'une borréliose.

1.5.2.1. Première phase : infection locale du patient par des borrelies

La première phase est associée aux lésions cutanées précoces. Généralement localisé au point d'inoculation des spirochètes par la tique, l'EM est une rougeur cutanée (Figure 8) apparaissant de 2 à 30 jours après la piqûre de la tique. Cette lésion est due à une réponse inflammatoire du système immunitaire envers les spirochètes (Berger et al. 1992). Généralement non-douloureux et non-prurigineux, l'EM évolue de façon excentrique depuis sa périphérie, la zone centrale de la lésion retrouvant habituellement la couleur normale de la peau. Chez les personnes à peau foncée, l'EM peut ressembler à une contusion. Dans les cas d'érythèmes multiples, les spirochètes possèdent une capacité d'invasivité qui leur permet de pénétrer les vaisseaux sanguins et de coloniser des organes distants du point d'inoculation, dont la peau (Baranton et de Martino, 2009). Généralement, l'EM évolue vers la guérison spontanée 3 à 4 semaines suivant la piqûre de tique, bien que des cas d'EM persistant plusieurs mois ont été décrits (Asbrink et Hovmark, 1988).



Figure 8 : Erythème migrant (photo : James Gathany, CDC).

Dans certains cas, principalement chez les enfants, peuvent apparaître des nodules dans lesquels a lieu une importante prolifération de cellules lymphoïdes. Cette lésion, appelée LCB (Figure 9) (Weber et al. 1985) peut être précédée ou non par un EM mais peut également se manifester au même moment que l'EM. Ce lymphocytome est généralement localisé au niveau du lobe de l'oreille, du mamelon et du scrotum chez l'enfant alors qu'il n'apparaît principalement qu'au niveau du scrotum chez l'adulte.



Figure 9 : Lymphocytome cutané bénin
(Photo gracieusement mise à disposition par le Prof. D. Lipsker).

D'autres symptômes peuvent survenir lors de cette première phase : des cas de personnes souffrant de fortes migraines, de raideur de la nuque, de douleurs musculaires et de fortes fatigues ont été relevés. Il est important de savoir que certaines personnes, chez lesquelles une BL est diagnostiquée, n'ont jamais présenté d'EM.

1.5.2.2. Deuxième phase : dissémination des spirochètes chez le patient (phase aigüe)

La deuxième phase de la maladie correspond à la dissémination par le sang des spirochètes dans l'organisme, les symptômes pouvant apparaître quelques semaines à quelques mois après la piqûre de tique.

Au niveau de la peau peuvent apparaître de nouveaux EM secondaires, généralement plus petits et moins migrants que le ou les EM présents lors de la phase primaire de la maladie.

La musculature squelettique est fréquemment atteinte et des douleurs arthritiques apparaissent régulièrement, principalement au niveau des articulations du genou et des mains (Herzer, 1991).

Aux Etats-Unis, les cas d'arthrites représentent la principale manifestation clinique et peuvent survenir plusieurs mois après la piqûre de la tique. La présence de borrélioses au niveau de l'articulation induit la production de cytokines et chemokines qui amplifient la réponse inflammatoire, conduisant finalement à une infection intra-articulaire (Priem et al. 1998). Le muscle cardiaque peut également souffrir de la présence de borrélioses et il n'est pas rare d'observer des inflammations de l'endo-, myo- et péricarde.

La deuxième phase de la BL est également caractérisée par des atteintes touchant le système nerveux central : des désordres neurologiques (confusion mentale, méningite, névrite crânienne, paralysie faciale, neuropathie périphérique) sont souvent accompagnés d'une grande fatigue physique et psychique chez le patient (neuroborréliose). En Europe, on observe parfois une atteinte méningo-radiculaire connue sous le nom de syndrome de Bannwarth. Les patients présentent d'importantes douleurs migratrices, pouvant durer des semaines et même des mois si l'affection n'est pas traitée.

Dans de rares cas, les yeux peuvent être touchés (ophtalmoborréliose) : conjonctivite, œdème maculaire, inflammation du nerf oculaire peuvent apparaître en phase secondaire chez des patients souffrant d'une BL.

1.5.2.3. Troisième phase : persistance des spirochètes chez le patient (phase chronique)

Cette phase est principalement caractérisée par la chronicité des manifestations cliniques, pouvant apparaître des mois ou des années suivant le premier contact avec des borrélioses. Le patient peut alors jouir de périodes de rémission entrecoupées de phases aigües de rechutes.

Au niveau de la peau peut apparaître, en phase tertiaire, une ACA (Figure 10), appelée également Maladie de Pick-Herxheimer. Cette pathologie se développe généralement au niveau des extrémités des membres, de la paume des mains et de la plante des pieds, mais ne touche que rarement le tronc du patient. L'ACA apparaît, généralement à partir de la zone touchée par l'EM, 6 mois à 3 ans après le premier contact avec les borrelies et est plus fréquente chez les personnes âgées. Au départ, l'ACA apparaît comme un érythème violacé aux contours mal délimités et pouvant être symétrique de part et d'autre du corps du patient (phase d'œdème inflammatoire). Avec le temps, d'autres lésions de la peau apparaissent : cliniquement parlant, le derme et l'épiderme s'atrophient et s'affinent jusqu'à mettre à nu le réseau veineux superficiel.



Figure 10 : Acrodermatite chronique atrophiante
(Photo gracieusement mise à disposition par le Prof. D. Lipsker).

Les problèmes neurologiques revêtent en phase tertiaire un aspect chronique : encéphalomyélite démyélinisante, polynévrites, troubles de la mémoire et de la personnalité.

En phase tertiaire peuvent apparaître des arthrites chroniques dues à la présence du pathogène, principalement au niveau des grosses articulations (genoux, chevilles, coudes, poignets).

La séparation en 3 phases de la progression de la BL est un moyen simple pour définir le cadre clinique de cette pathologie : mais en pratique, les stades et leurs manifestations possèdent des limites moins bien marquées. Les symptômes peuvent apparaître de façon avancée ou décalée ou être totalement absents.

1.5.2.4. Manifestations cliniques selon les génoespèces

Cinq génoespèces de borrelies sont généralement décrites comme pathogènes pour l'Homme : *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii* et *B. bavariensis* (Baranton and De Martino, 2009; Margos et al. 2009). Ces génoespèces présentent un organotropisme différent : selon que le patient ait été infecté par *B. garinii*, *B. afzelii* ou *B. burgdorferi* ss, les

manifestations cliniques qui en résulteront seront différentes (van Dam et al. 1993, Assous et al. 1993, Canica et al. 1993, Balmelli and Piffaretti, 1995). Généralement, *B. garinii* est associée aux atteintes neurologiques tout comme *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* ss aux atteintes articulaires et *B. afzelii* principalement aux lésions cutanées tardives. Bien que le nombre de cas cliniques investigués impliquant *B. spielmanii* soit encore faible, les travaux de Maraspin et al. en 2006 ont démontré la présence de cette génoespèce au niveau de la peau d'une patiente souffrant de BL. Néanmoins, l'EM n'est pas associé de manière spécifique avec une génoespèce. Etant donné que la répartition géographique des espèces pathogènes est différente à travers le monde, les manifestations cliniques ne sont pas observées de façon homogène entre l'Europe et les Etats-Unis (Baranton et de Martino, 2009, Strle et Stanek, 2009). C'est pourquoi on recense dans le Nouveau Monde principalement des cas d'arthrites (Steere et al. 1989) en phase secondaire, *B. burgdorferi* ss étant la seule espèce pathogène présente sur ce continent. En Europe, la situation est plus compliquée du fait que différentes espèces pathogènes coexistent, provoquant un cadre clinique plus varié qu'en Amérique du Nord où l'ACA, par exemple, n'est pas observée (Canica et al. 1993).

1.5.3. Diagnostic et traitement

Le diagnostic initial indispensable pour détecter une BL consiste en une observation du cadre clinique d'un patient par le praticien. L'observation d'un EM suite à une piqûre de tique reste un diagnostic simple et fiable de la maladie lors de sa phase primaire bien qu'aux Etats-Unis, des lésions pouvant ressembler à un EM sont associées à une autre maladie, la « Southern tick-associated rash illness » (Masters et al. 2008). Les techniques citées par la suite viendront appuyer ou réfuter la suspicion d'une infection par des borrelies.

Certaines souches de spirochètes vont coloniser divers organes dans l'organisme de la personne piquée par une tique : les borrelies montrent un organotropisme qui les amène à se développer dans différents endroits : articulations et liquide synovial, liquide céphalo-rachidien et sang, bien que les paramètres sanguins tels que la C-Réactive Protéine (CRP) ou le nombre de globules blancs ne soient pas altérés en cas d'infection par des borrelies (Wormser et al. 2006). La présence de spirochètes pourra être mise en évidence grâce à la culture du pathogène directement à partir de prélèvements de liquide synovial et céphalo-rachidien, de sang et de biopsies de peau.

La culture du pathogène sera suivie par l'observation au microscope et sa géoespèce déterminée par l'utilisation de techniques classiques de biologie moléculaire telles que « polymerase chain reaction » (PCR), RFLP (Postic et al. 1994), etc. Il est important de noter que la PCR détectera indifféremment l'ADN de borrelies vivantes et/ou mortes et qu'une PCR positive, sans diagnostic complémentaire, ne pourra mettre en évidence une infection active. La culture des borrelies à partir de prélèvements biologiques ne donnant pas toujours de bons résultats, d'autres méthodes (méthodes indirectes) sont utilisées en laboratoire. Il est néanmoins intéressant de noter que la présence de spirochètes dans l'organisme n'est pas toujours associée à des symptômes et que des cas d'infections asymptomatiques à *B. burgdorferi* sl ont été décrites tant aux Etats-Unis qu'en Europe (Zhioua et al. 1998, Steere et al. 2003). Des tests sérologiques standards tels qu'« indirect immunofluorescence assay » (IFA), « enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA), ou immunoblotting sont largement utilisés dans les laboratoires pour confirmer un diagnostic clinique suspectant la présence de spirochètes dans l'organisme d'un patient (Craft et al. 1984).

La thérapie consiste en un traitement aux antibiotiques. En fonction du stade de la maladie au moment du diagnostic, les traitements peuvent différer tant au niveau de l'antibiotique utilisé que de sa voie d'administration (orale ou intraveineuse) : doxycycline, amoxicilline, cefotaxime font partie des antibiotiques couramment utilisés dans le traitement de la BL.

En résumé, un diagnostic précoce permettra l'élimination rapide des spirochètes de l'organisme du patient. La BL peut s'avérer être une pathologie pénible pour les patients diagnostiqués tardivement : à la difficulté d'éliminer le pathogène, s'ajoute une multitude de manifestations cliniques pas toujours précises rendant parfois problématique l'approche thérapeutique. Les patients neurologiquement déjà atteints par la maladie peuvent éprouver un sentiment d'incompréhension du milieu médical et de leur entourage, et de nombreux cas de patients sombrant dans la dépression ont été relevés.

1.6. Buts et objectifs

Le premier but de cette thèse est de suivre l'évolution saisonnière de 2 populations de tiques *I. ricinus* sur deux sites endémiques pour la BL. Nous nous sommes intéressés aux densités de tiques libres, aux infestations des rongeurs (*Apodemus spp*, *M. glareolus*) et avons déterminé l'infection des tiques par *B. burgdorferi* sl. Nous avons également procédé à des xénodiagnoses

sur les micromammifères piégés et avons déterminé l'espèce de *B. burgdorferi* si transmise des micromammifères aux tiques de xénodiagnose.

Cette première phase de collection nous a permis de mener à bien la deuxième phase de cette étude dont l'objectif principal était de déterminer la diversité du gène *ospC* chez *B. afzelii* sur les 2 sites considérés et cela à 3 niveaux : tiques libres, tiques s'étant nourries sur des rongeurs et tiques de xénodiagnose. Le but de cette deuxième partie était également de mettre en évidence les mécanismes régulant le maintien et la diversité des groupes *ospC* particulièrement le rôle du co-feeding dans la nature, notamment en comparant les espèces de *Borrelia* et les groupes *ospC* de *B. afzelii* dans trois types de populations de tiques, à savoir, les tiques en quête, les tiques s'étant nourries sur les rongeurs de la nature et les tiques de xénodiagnose.

2. Matériel et méthodes

2.1. Zones d'étude

Afin de mener à bien notre recherche, nous avons sélectionné deux zones d'études aux caractéristiques différentes.

2.1.1. Forêt des Portes-Rouges

La forêt des Portes-Rouges est située au nord de la ville de Neuchâtel (PR, position 47°01'N, 06°56'E) sur un sol calcaire ne permettant qu'une faible rétention d'eau et sous influence climatique du lac de Neuchâtel. Cette forêt (altitude 550m) est principalement composée d'essence mixte caduque (association *Rhamno-Quercetum*) et jouit d'un climat tempéré moyen et d'une exposition Sud.

La longueur du parcours de récolte des tiques libres sur cette zone mesure 1049 m. et est divisée en 4 sections contiguës (Gigandet et al. 2011).

2.1.2. Forêt du Staatswald

La Forêt du Staatswald (SW, position 46°92'N, 07°07'E) est située à proximité de Ins, canton de Berne (altitude 433 m) (Gigon 1985). C'est une forêt mixte (association de type *Pruno-Fraxinetum*) isolée présentant une forte arborescence. Ce site est établi sur d'anciens marécages et le sol, principalement composé de marne, permet une forte rétention d'eau. La nature du sol et

la faible luminosité due à la forte arborescence rendent cette forêt très humide. La longueur du parcours de récolte des tiques libres sur cette zone mesure 360 m, divisée en 2 sections contigües.

2.2. Données météorologiques

Différentes variables météorologiques (température au sol, à 10 cm, à 60 cm et humidité relative) ont été mesurées mensuellement lors des récoltes des tiques libres avec un instrument Squirrel 1200 Series (Grant, Cambridge, Angleterre) et figurent en annexe (annexe 7.6) de ce manuscrit.

2.3. Récolte des tiques libres

La récolte des tiques libres n'a été réalisée que sous des conditions climatiques définies : le temps ainsi que le sol des zones étudiées devaient être le plus sec possible. Lorsque la végétation au sol est humide, la récolte des tiques libres devient difficile car le drapeau se mouille et se salit rendant le prélèvement compliqué des tiques accrochées. De plus, la récolte des tiques libres n'a eu lieu que lorsque le vent était nul ou modéré.

Les tiques libres ont été récoltées mensuellement d'avril 2003 à décembre 2005 au SW et de février 2003 à décembre 2005 aux PR grâce à la technique du drapeau qui consiste à passer un linge éponge blanc de 1 m² sur la partie basse de la végétation. Chaque mois, une nouvelle section de chaque site a été suivie. Tous les 15 pas, correspondant à une « drag », le linge est retourné. Les tiques sont prélevées avec une pince d'horloger, comptées puis placées dans un tube plastique contenant de l'herbe afin d'assurer une humidité suffisante. Les stades matures et immatures de *I. ricinus* sont stockés dans des tubes différents. Les tiques libres ont été maintenues en vie à température ambiante dans des boîtes en plastique (contenant un fond d'eau) jusqu'à ce qu'elles soient analysées au laboratoire.

2.4. Micromammifères

2.4.1. Méthode de piégeage

Le piégeage a été réalisé mensuellement d'avril 2003 à décembre 2005 sur les 2 sites. Lors de chaque séance de capture des micromammifères, 50 pièges « tchèques » ont été déposés à intervalle de 3-5 mètres sur la section de parcours correspondant à la récolte des tiques libres.

Les pièges ont été remplis de 3 granulés de céréales ainsi que de quelques bouts de pomme afin d'assurer une hydratation nécessaire aux animaux capturés. Lors des mois les plus froids (novembre à mars), les pièges ont été remplis de paille afin d'amener une certaine isolation thermique aux micromammifères.

Les pièges ont été déposés en fin d'après-midi, entre 16h et 19h, et relevés tôt le matin, entre 7h et 9h. Les séances de piégeage ont été synchronisées au maximum (même semaine) avec la récolte des tiques libres. Les rongeurs ont été maintenus à l'animalerie pendant environ 3 semaines afin de permettre la récolte des tiques s'étant nourries sur les rongeurs et la réalisation des xénodiagnoses. Les rongeurs ont été sexés et l'espèce déterminée (Mammifères de la Suisse, éd. Birkhaeuser, 1995) avant d'être relâchés sur le lieu même de piégeage une vingtaine de jours après la capture (Autorisation d'expérimentation animale 1/2003).

2.4.2. Récolte des tiques s'étant nourries sur les rongeurs

Les micromammifères piégés ont été déposés dans des cages individuelles dès leur arrivée au laboratoire. Un bac rempli d'eau était placé sous chaque cage afin de permettre la récolte des tiques s'étant nourries sur les rongeurs. En effet, les tiques, après avoir complété leur repas sanguin, escaladent les parois de la cage puis tombent dans l'eau. La récolte des tiques gorgées a eu lieu 5 et 10 jours après l'arrivée du rongeur à l'animalerie. Les tiques ont été récoltées à l'aide d'un pinceau et stockées dans un tube en verre contenant un papier buvard, après avoir passé quelques minutes dans des boîtes de Pétri, contenant elles aussi, un papier buvard. Pour chaque rongeur piégé, les larves et nymphes s'étant nourries sur les rongeurs ont été stockées dans des tubes de verre séparés et lorsque le nombre de tiques était inférieur à 20 individus, environ 30 mues (larves et nymphes) ont été déposées dans les tubes afin d'augmenter les chances de mue. En effet, nous avons observé au fil des ans dans notre laboratoire que les tiques muèrent mieux en présence de mues lorsqu'elles étaient en petit nombre dans les tubes en verre.

2.4.3. Xénodiagnose

La xénodiagnose permet de démontrer qu'un animal occupe dans un cycle épidémiologique le rôle d'hôte-réservoir (Humair et al. 1999). Cette technique consiste à déposer sur un hôte-réservoir potentiel, le vecteur qui le parasite naturellement : le vecteur déposé, issu d'un élevage contrôlé, n'est jamais infecté par le pathogène avant son premier repas sanguin. Si le pathogène

est détecté dans le vecteur après que ce dernier se soit nourri sur l'hôte étudié, il pourra être conclu que cet hôte fait office de réservoir.

Afin de déterminer si les rongeurs piégés étaient potentiellement infectés par des borrelies, des xénodiagnoses ont été réalisées. Cette technique est efficace pour l'isolement de spirochètes, l'isolement à partir de prélèvements sanguins ou de biopsies d'oreilles de rongeurs pouvant s'avérer compliquée et moins efficace. De plus, la xénodiagnose permet aux tiques se nourrissant sur les rongeurs de s'infecter selon un mode de transmission similaire à celui se déroulant dans des conditions naturelles.

Les rongeurs ont été endormis par injection intramusculaire de 50 µl d'un mélange 5/8 (volume) de Ketazol (100 mg/ml, Streuli & Co, Uznach, Suisse) et de Xylazin (20 mg/ml, Dr E. Graeub, Berne, Suisse). Trois à quatre jours après que les tiques s'étant nourries sur les rongeurs se soient décrochées des rongeurs, une centaine de larves d'*I. ricinus* d'élevage ont été déposées à l'aide d'un pinceau entre les oreilles du rongeur anesthésié, qui était ensuite placé dans un pot en verre. Le pot a été placé dans une cage et son ouverture fermée par une gaze et un élastique : ce système permettant d'augmenter le contact entre l'hôte et le vecteur et ainsi le taux de fixation des larves, le rongeur devant ronger la gaze afin de pouvoir se libérer du pot. La cage contenant le rongeur a ensuite été placée sur un bac contenant de l'eau et les larves gorgées ont été récoltées de façon identique à la méthode appliquée pour les tiques s'étant nourries sur les rongeurs.

2.5. Mise en évidence de *B. burgdorferi* si chez les tiques

2.5.1. Culture des borrelies

Le but de cette étape consiste à exposer les borrelies qui pourraient se trouver dans les tiques à un milieu de culture propice à la multiplication des spirochètes.

Les tiques libres ont été mises en culture le jour suivant la récolte au drapeau. Le genre et l'espèce des tiques récoltées ont été vérifiés visuellement en utilisant une clé de détermination des tiques interne à notre laboratoire (Cotty, 1985, Cordas et al. 1993). A noter que dans cette étude, seul *I. ricinus* a été trouvé.

La tique a été tout d'abord désinfectée dans de l'éthanol 70% puis découpée par la moitié dans le sens de la longueur grâce à une pince et un micro-ciseau, préalablement désinfectés dans l'éthanol 70 %. La tique a été ensuite déposée dans un cryotube de 2 ml (Microtube PP, Sarstedt,

Nümbrecht, Allemagne) contenant 1,2 ml de milieu BSK-II modifié selon Sinsky et Piesman (1989).

Initialement appelé simplement BSK (Barbour, Stoenner, Kelly) ce milieu utilisé pour la culture de *B. burgdorferi* s'est suivi plusieurs évolutions et améliorations apportées par les 3 auteurs cités précédemment, pour finalement s'appeler BSK-II suite aux travaux de Barbour (1984). Le milieu utilisé dans ce travail est commandé chez Sigma-Aldrich (Buchs, Suisse) et modifié selon Sinsky et Piesman (1989) : cette modification comporte, entre autres, l'ajout d'un antifongique, d'antibiotiques et d'éléments nutritifs supplémentaires (acides aminés modifiés et sérum de lapin). Pour chaque nouvelle tique découpée, les ustensiles ont été désinfectés dans l'éthanol 70 %.

Pour les tiques prélevées sur les rongeurs, provenant de la nature ou de xénodiagnose, le protocole a été suivi de façon identique : au minimum 1 mois après la mue, la mise en culture a été effectuée selon la méthode décrite pour les tiques libres.

La présence de spirochètes dans le BSK-II a été vérifiée au microscope à fond noir (Wild MD G4-10822, Heerbrugg, Suisse), agrandissement 500x, après incubation des cultures 7 jours à 34°C. Le volume total (1,2 ml) des cultures positives a été repiqué dans 3 ml de milieu BSK-II modifié selon Sinsky et Piesman (1989) et replacé à l'étuve pendant 7 jours à 34°C.

Passé ce délai, les cultures positives étaient repiquées dans 4 ml de BSK-II en prélevant 0,3 ml du premier repiquage.

Les cultures dans lesquelles aucun spirochète n'a été détecté lors du premier contrôle ont été observées une deuxième fois après 14 jours suivant la mise en culture et repiquées si nécessaire dans 3 ml de milieu BSK-II modifié selon Sinsky et Piesman (1989) et contrôlées à nouveau 7 jours après le repiquage.

2.5.1.1. Tiques libres

Un maximum de 60 nymphes, 30 mâles et 30 femelles ont été mis mensuellement en culture pour la forêt du Staatswald et un maximum de 80 nymphes, 40 mâles et 40 femelles pour le site des Portes-Rouges. Si la récolte d'un mois ne permettait pas d'atteindre ce chiffre, toutes les tiques étaient mises en culture.

2.5.1.2. Tiques s'étant nourries sur les rongeurs et de xénodiagnose

Tous les stades matures d'*I. ricinus* (tiques s'étant nourries sur les rongeurs) ont été mis en culture pour les 2 sites ainsi qu'un maximum de 20 nymphes par rongeur (tiques s'étant nourries sur les rongeurs et de xénodiagnose).

2.5.2. Isolement de l'ADN de *B. burgdorferi* sl

Afin d'isoler l'ADN de *B. burgdorferi* sl, 1,2 ml de culture positive ont été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et centrifugés à 10'000 t/mn pendant 20 mn. Une fois le surnageant éliminé, le culot a été lavé grâce à 1 ml d'une solution de PBS-MgCl₂ puis centrifugé à nouveau pendant 20 minutes à 10'000 t/mn. Cette étape a été répétée deux fois. Le culot a été finalement resuspendu dans 50 µl d'eau pure puis chauffé 15 mn à 100 °C dans un bloc chauffant. Le stockage des thermolysats ainsi obtenus s'est fait à -20 °C (Postic et al. 1994).

2.5.3. Détermination des géoespèces de *B. burgdorferi* sl par PCR et RFLP

2.5.3.1. PCR

La PCR permet d'amplifier des fragments d'ADN. Il ne suffit que de deux oligonucléotides (primers) qui vont s'hybrider respectivement avec l'un des deux brins de chaque côté du fragment d'ADN à amplifier, de quantités suffisantes des 4 désoxyribonucléosides-triphosphate et d'une ADN polymérase particulière, résistante à la chaleur (Taq).

Le double brin est d'abord séparé en deux simples brins par chauffage (étape 1 : dénaturation). Le refroidissement du système à la température d'hybridation (T_m) permet l'hybridation des amorces aux brins complémentaires (étape 2 : hybridation). A partir des amorces de nouveaux brins d'ADN sont synthétisés dans les deux directions (étape 3 : polymérisation). Ce cycle, composé de 3 étapes, est répété [n] fois avec le même mélange réactionnel permettant ainsi la synthèse d'ADN double-brin en quantités suffisantes aux analyses moléculaires suivantes.

Lors de ce travail, les primers (Microsynth, Balgach, Suisse) utilisés ont permis d'amplifier une séquence spécifique aux borrelies, située entre l'extrémité 3' terminal de l'unité 5S rRNA (*rrf*) et 5' terminal de l'unité 23S rRNA (*rri*), appelée espace inter-génique (Postic et al. 1994). Le

protocole pour cette PCR (Postic et al. 1994) permet d'obtenir un amplicon d'une taille variant entre 226 et 256 pb.

Primer 1 (P1) : 5'-CTGCGAAGTTCGCGGGAGA-3'

Primer 2 (P2) : 3'-TCCTAGGCATTCACCATA-3'

Les réactifs ainsi que la Taq polymérase proviennent d'un kit Taq DNA Polymerase 1000 Units (Qiagen, Venlo, Hollande).

• H2O pure (Milli-Q, Millipore, Billerica, Etats-Unis) :	23.7 µl
• PCR buffer 10 x :	5 µl
• dNTP's (10 µM) :	1 µl
• P1 (1 µM) :	5 µl
• P2 (1 µM) :	5 µl
• Taq polymérase (5U/µl) :	<u>0.3 µl</u>
Total :	40 µl

Aux 40 µl de mélange réactionnel, 10 µl d'ADN de la souche de *B. burgdorferi* si à analyser ont été ajoutés. Lors de chaque PCR, un témoin négatif comportant 10 µl d'eau pure (Milli-Q, Millipore, Billerica, Etats-Unis) à la place de l'ADN bactérien a été préparé : cela permet d'observer la présence éventuelle d'éléments contaminants dans les différents réactifs utilisés.

De plus, un témoin positif a été préparé pour chaque PCR : le témoin positif contient également 40 µl de mélange réactionnel, par contre 9 µl d'eau pure (Milli-Q, Millipore, Billerica, Etats-Unis) et 1 µl d'ADN (thermolysats) de souches contrôles ont été ajoutés.

Des souches de contrôle maintenues dans notre laboratoire ont été utilisées dans ce travail:

- B31 : *B. burgdorferi* ss
- NE11 : *B. garinii*
- NE632 : *B. afzelii*

Les thermolysats des souches contrôles sont obtenus à partir de cultures maintenues en laboratoire et contenant un grand nombre de spirochètes : après lavage, la concentration d'ADN est mesurée par spectrophotométrie. Les cycles suivants ont été programmés sur un thermocycler T gradient Biometra (Goettingen, Allemagne):

- | | | |
|---------------------------|------------|-----------|
| • Dénaturation initiale : | 94 °C 3 mn | |
| • Dénaturation : | 94 °C 1 mn | 34 cycles |
| • Hybridation : | 55 °C 1 mn | |
| • Elongation : | 72 °C 1 mn | |
| • Elongation finale : | 72 °C 9 mn | |

Les produits PCR obtenus sont vérifiés sur gel d'agarose 1 % (annexe 7.1) en présence de bromure d'éthidium et visualisés sous lampe UV : le bromure fixé sur la double hélice d'ADN réagit avec la lumière UV et les bandes correspondant aux séquences amplifiées apparaissent. Un appareil photo numérique couplé à un ordinateur utilisant le logiciel Kodak 1D v.3.6.0 est utilisé pour acquérir et traiter l'image du gel.

A noter que dans ce travail, seules les cultures contenant des spirochètes observés lors de l'examen au fonds noir ont été lavées et analysées par PCR/RFLP. Les cultures pour lesquelles aucun spirochète n'a été détecté en microscopie ont été stockées en chambre froide à 4 °C.

2.5.3.2. RFLP

Les endonucléases de restriction sont des enzymes coupant l'ADN en des sites complètement déterminés, le plus souvent palindromique. Si une base est modifiée dans une séquence de reconnaissance de ce type, l'enzyme affectée ne coupera plus à cette position. L'ADN amplifié par PCR d'organismes présentant des séquences hétérogènes pour un gène donné sera scindé en fragments de tailles différentes suite à la digestion par une enzyme de restriction : ce phénomène est désigné sous le nom de polymorphisme de restriction.

Les divergences de séquences observées chez *B. burgdorferi* sl au niveau du fragment 23S (*rrl*)-5S (*rrf*) ribosomal permet après la PCR, d'utiliser les propriétés des endonucléases pour discriminer chaque géospèce. Lors de ce travail un kit contenant l'enzyme *Mse I* ainsi que les réactifs a été utilisé (Biolabs, Ipswich, Angleterre) selon le protocole décrit par Postic et al. (1994) :

- | | |
|------------------------------|---------|
| • NE Buffer 10x : | 3.5 µl |
| • BSA purifiée 100x : | 0.35 µl |
| • <i>Mse I</i> 10.000 U/ml : | 1 µl. |
| Total : | 4,85 µl |

Ainsi, 4,85 µl de mélange réactionnel contenant *Mse I* ont été mélangés au produit PCR total (50 µl) des échantillons à analyser. Les échantillons ont été incubés pendant une nuit à 37 °C.

Le résultat de la digestion des souches de *B. burgdorferi* sl (amplifiées préalablement au niveau du fragment 23S (*rrl*)-5S (*rrf*) ribosomal a été vérifié sur un gel d'acrylamide (annexe 7.2). Ce gel possède un pouvoir de séparation supérieur à celui d'un gel d'agarose et permet l'observation de fragments d'ADN digérés ayant de faibles poids moléculaires (entre 20 et 110 pb dans cette étude).

Les profils obtenus pour chaque produit PCR digéré ont ensuite été comparés à des profils de référence correspondant aux diverses génoespèces.

2.6. Observation du polymorphisme du gène *ospC* par SSCP

Cette méthode est basée sur la séparation électrophorétique, sur gel non-dénaturant, d'ADN simple-brins présentant des structures secondaires différentes induites par des séquences nucléotidiques divergentes.

La mobilité de l'ADN double-brin soumis à un champ électrique dépend de sa taille et de sa longueur mais est relativement indépendante de sa séquence nucléotidique. Par contre, la mobilité de l'ADN simple-brin est perceptiblement affectée par de très petits changements dans la séquence. Ces faibles changements (de l'ordre de 1 base pour 100 nucléotides) ont une influence importante sur l'ADN simple-brin en raison de sa nature instable : en absence de brin complémentaire, l'ADN simple-brin va se replier et des interactions entre bases complémentaires du même brin vont s'établir pour former une structure en 3 dimensions, spécifique à la séquence de l'ADN simple-brin mais indépendante de sa longueur. Cette structure, appelée conformation, sera affectée par le changement d'une seule base et sa migration électrophorétique en conditions non-dénaturantes sera modifiée. Dans le cas de l'analyse d'un gène multi-allélique, il en résulte qu'à chaque profil de migration obtenu, correspond un allèle du gène considéré.

Tout d'abord développée pour l'analyse de mutations, la SSCP est devenue une technique largement diffusée pour l'observation du polymorphisme génétique (Hayashi 1991, Beier 1993).

2.6.1. Amplification du gène *ospC*

Les isolats de *B. afzelii* obtenus à partir de nymphes et d'adultes d'*I. ricinus* ont été soumis à une nouvelle PCR au niveau du gène *ospC*. Un fragment de 277 pb de la partie variable de *ospC* a été

amplifié grâce à l'utilisation de primers dégénérés modifiés selon Lagal et al. (2003) en utilisant les primers suivants (Microsynth, Balgach, Suisse) :

Forward primer B1(SC32): 5'-AAAGCTATTGGTAAAAAAT-3'

Reverse primer B2 (OspC9): 5'-GTTTTTAAAATAGCT(TG)(TC)TTTTG-3'

Les réactifs ainsi que la Taq polymérase que nous avons utilisés pour la PCR proviennent d'un kit Taq DNA Polymerase 1000 Units (Qiagen, Venlo, Hollande) :

• H2O pure (Milli-Q, Millipore, Billerica, Etats-Unis) :	31.45 µl
• PCR buffer 10x :	5 µl
• dNTP's (10µM) :	1 µl
• B1 (1 µM) :	1 µl
• B2 (1 µM) :	1 µl
• MgCl2 (25 mM) :	0.25 µl
• Taq polymérase (5U/µl) :	0.3 µl
	<hr/>
Total:	40 µl

Au 40 µl de mélange réactionnel, 10 µl d'ADN de la souche de *B. burgdorferi* si à analyser ont été ajoutés. Lors de chaque PCR, un témoin négatif comportant 10 µl d'eau pure (Milli-Q, Millipore, Billerica, Etats-Unis) à la place de l'ADN bactérien a été préparé. Les cycles suivants ont été programmés sur le thermocycler Biometra T gradient (Goettingen, Allemagne) :

• Dénaturation initiale :	94 °C 3 mn	
• Dénaturation :	94 °C 1 mn	34 cycles
• Hybridation :	55 °C 1 mn	
• Elongation :	72 °C 1 mn	
• Elongation finale :	72 °C 9 mn	

Le résultat de la PCR a été vérifié sur gel d'agarose 1 % (annexe 7.1) en présence de bromure d'éthidium et visualisé sous lampe UV.

2.6.2. SSCP

Les isolats de *B. afzelii* dont la PCR *ospC* est positive ont été analysés par SSCP (Lagal et al. 2003) : 4 µl de produit PCR ont été mélangés à 4 µl de solution dénaturante (94 % formamide, 0,05% xylène cyanol) puis chauffés à 95°C pendant 5 mn afin de séparer les 2 brins d'ADN. Après le choc thermique, les échantillons ont été immédiatement placés dans la glace afin d'éviter toute hybridation des brins complémentaires. Les échantillons ont été chargés sur un gel non-dénaturant de polyacrylamide 12.5% (GeneGel Excel 12,5/24 , GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suède) (annexe 7.3). L'électrophorèse des échantillons chargés a été réalisée grâce à un système thermo-contrôlé GenePhor (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suède) à 6°C selon les paramètres suivants :

- 1^{ère} migration, 10 mn. : 600V, 25 mA, 15 W.
- 2^{ème} migration, 2h30 mn. : 600V, 37 mA, 21 W.

Le gel a été révélé par coloration à l'argent selon les instructions fournies par le fabricant (One DNA Silver Staining Kit, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suède) (annexe 7.4). Les gels ont été plastifiés après révélation et les profils obtenus ont été comparés aux profils des souches de référence utilisées dans cette étude (Tableau 1, Figure 11).

Parmi les isolats de *B. afzelii* testés en SSCP, seuls 392 ont été retenus. En effet, un certain nombre de profils sont apparus à des fréquences inférieures à 5 et n'ont donc pas été pris en considération.

Souche	Provenance	Origine	Groupe <i>ospC</i>	Référence
<i>B. afzelii</i>				
ACA1	Peau (ACA)	Suède	A1	Baranton et al. 2001
DK3	Peau (ACA)	Danemark	A2	Baranton et al. 2001
ACA2	Peau (ACA)	Suède	A3	Lagal et al. 2003
P/stoa	Peau (ACA)	Allemagne	A4	Lagal et al. 2003
Skola	Sang (MEM)	Slovénie	A5	Lagal et al. 2003
Sdol	Sang (EM)	Slovénie	A6	Lagal et al. 2003
Sobla	Peau (ACA)	Slovénie	A7	Lagal et al. 2003
Shrva	Peau (ACA)	Slovénie	A8	Lagal et al. 2003
E61	Peau (EM)	Autriche	NI	Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003
Simon	Peau (EM)	Autriche	NI	Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003
H9	Peau (EM)	Autriche	NI	Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003
VS461	<i>I. ricinus</i>	Suisse	NI	Lagal et al. 2003
ME	<i>I. ricinus</i>	Suisse	ME	Pérez et al. 2011 (submitted)
YU	<i>I. ricinus</i>	Suisse	YU	Pérez et al. 2011 (submitted)

Tableau 1 : souches de *B. afzelii* utilisées comme références pour l'analyse des profils SSCP, selon les groupes invasifs A1 à A8 définis par Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003 et Pérez et al. 2011 (submitted). NI, souches non-invasives. MEM, érythème migrant multiple. Les souches contrôles ACA1, DK3, ACA2, P/stoa, Skola, Sobla, Shrva, E61, Simon et H9 nous ont été gracieusement fournies par le Dr Guy Baranton, le Dr Vanessa Lagal et le Dr Danièle Postic de l'Institut Pasteur (Paris, France).

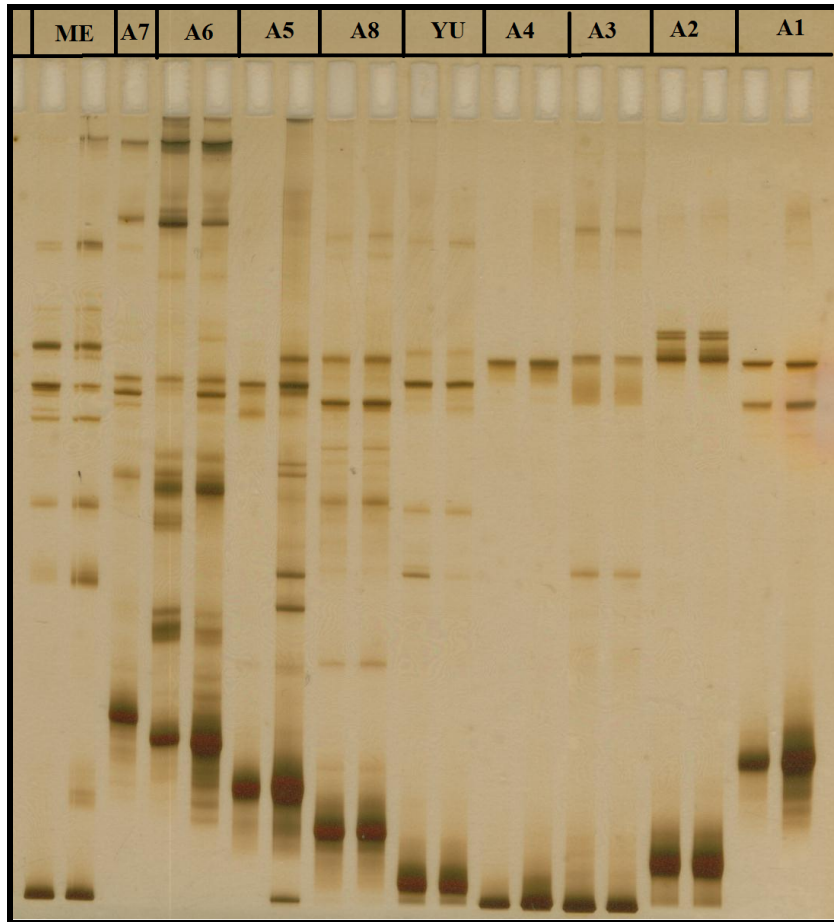


Figure 11 : profils SSCP des souches ayant servi de références et correspondant aux groupes *ospC* A1 à A8, ME et YU après coloration du gel. Les profils E61, Simon, VS461 et H9 n'apparaissent pas dans cette figure.

2.6.3. Séquençage

Les produits PCR des profils ME et YU ont été séquencés par la société Microsynth AG (Balgach, Suisse). Les séquences figurent en annexe (7.5) de ce manuscrit.

3. Résultats

Les résultats de cette thèse apparaissent sous forme de deux publications soumises aux revues suivantes : « Vector-Borne and Zoonotic Diseases » et « Tick and Tick-Borne Diseases ».

3.1. Publication 1

Seasonality of *Ixodes ricinus* ticks on vegetation and on rodents and *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies diversity in two Lyme borreliosis endemic areas in Switzerland.

Pérez, D., Kneubühler, Y., Rais, O., and Gern L.

Papier soumis à Vector-Borne and Zoonotic Diseases

Running title: *Borrelia* in *Ixodes ricinus* on vegetation and rodents

Institute of Biology

Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites

Université de Neuchâtel

Rue Emile-Argand 11

CH-2000 Neuchâtel

Switzerland

Key words: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, co-feeding transmission, rodents.

Abstract

We compared *Ixodes ricinus* questing density, the infestation of rodents by immature stages and the diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) in questing ticks and ticks collected from rodents in two Lyme Borreliosis (LB) endemic areas in Switzerland (Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW)) from 2003 to 2005. There were variations in the seasonal evolution of questing tick densities among years. Questing nymphs were globally more abundant at PR than at SW but the proportion of rodents infested by immature ticks was similar at PR (59.4%) and SW (61%). The seasonal pattern of ticks infesting rodents was different from the seasonal pattern of questing ticks. Immature ticks infested rodents in summer and autumn whereas no questing tick activity was observed, suggesting that risks to be bitten by ticks remain high during summer.

Rodents from SW showed the highest infestation levels (10 ± 21.6 for larvae and 0.54 ± 1.65 for nymphs). The proportion of rodents infested simultaneously by larvae and nymphs (co-feeding ticks) was higher at SW (28%) than at PR (11%). *A. flavicollis* was the species the most frequently infested by co-feeding ticks and *M. glareolus* was the most infective rodent species.

At PR, the prevalence of *B. burgdorferi* sl in questing ticks was higher (17.8% for nymphs and 32.4% for adults) than at SW (10.4% for nymphs and 24.8% for adults) with *B. afzelii* as dominant species but *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto and *B. valaisiana* were also detected. Rodents transmitted only *B. afzelii* (at PR and at SW) and *B. bavariensis* (at SW) to ticks and no mixed infection by additional genospecies was observed in co-feeding ticks. This implies that co-feeding transmission does not contribute to genospecies diversity.

Introduction

In Europe, Lyme borreliosis (LB) is caused by different *Borrelia* species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato (sl) complex. These infectious agents are maintained in natural zoonotic cycles involving wild vertebrates and ticks, which are obligate blood-feeding arthropods. In Europe, *Ixodes ricinus* is the main vector of *B. burgdorferi* sl (Piesman and Gern 2004). Both biotic (host species, density and behavior, vegetation structure) and abiotic factors (local climatic conditions) play a role in modeling through the years the seasonal activity of ticks (Randolph et al. 2002, Randolph 2004, Perret et al. 2004). This seasonal evolution of the density of *I. ricinus* questing ticks was reported to be variable between years and to vary from a unimodal pattern with maximum density in spring to a bimodal pattern reaching its maximum density in spring and in autumn. In Switzerland, both bimodal and unimodal patterns were

shown to occur (Perret et al. 2000, Jouda et al. 2004a, 2004b, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007a).

At least nine *Borrelia* species, *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. bissettii*, *B. bavariensis* and *B. finlandensis* have been identified in *I. ricinus* (Hanincová et al. 2003, Rauter and Hartung 2005, Richter et al. 2006, Hulinska et al. 2007, Margos et al. 2009, Casjens et al. 2011).

Studies on the ecology of LB have demonstrated that the efficient persistence of *Borrelia* pathogens in endemic areas requires the involvement of reservoir hosts. Small-sized mammals, *Apodemus* mice and *Myodes* (*Clethrionomys*) voles in particular, are often infested by immature *I. ricinus* stages and have been described as competent reservoirs for *B. burgdorferi* sl as well as other mammals like dormice, hedgehogs, rats, squirrels, hares and ground frequenting birds like passerines and pheasants, and lizards (Piesman and Gern 2004). Specific associations between hosts, ticks and *Borrelia* species are observed in nature. For example, *I. ricinus* ticks can acquire *B. afzelii* and *B. bavariensis* after feeding on rodents (Humair et al. 1995, 1999, Huegli et al. 2002, Margos et al. 2009) and *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss are associated with red squirrels (Humair and Gern 1998). In contrast to *B. afzelii* that is adapted to rodents, most variants of *B. garinii* and *B. valaisiana* present a resistance to the avian complement and are considered bird-associated *Borrelia* ecotypes (Olsen et al. 1995, Kurtenbach et al. 1998, Humair et al. 1998). These preferential associations affect the genospecies distribution in an area in relation to the composition of the local fauna.

Larvae become infected if at their first blood meal they encounter a *Borrelia* reservoir host since transovarial transmission of *B. burgdorferi* sl is a rare phenomenon (Bellet-Edimo et al. 2005). Nymphs from this cohort of larvae will be infected because of the maintenance and the transfer of the pathogen at the following stages. *Borrelia* may also pass directly from infected (usually nymphs) to uninfected ticks (usually larvae) when ticks are feeding together on vertebrate hosts before spirochetes have disseminated in the host and produced a systemic infection: this way of transmission is called co-feeding (Gern and Rais 1996).

Here, we compared and analyzed seasonal patterns of questing tick activity and infestation of rodents by immature stages in two LB endemic areas (Staatswald (SW) and Portes-Rouges (PR)) located on the Swiss Plateau. We particularly focused on the simultaneous presence of *I. ricinus* larvae and nymphs co-feeding on rodents. Co-feeding transmission of LB spirochetes has been described in experimental models (Gern and Rais 1996) but very few information is available on this transmission pathway under natural condition. Finally, we

examined the distribution of *B. burgdorferi* s.l. genospecies in questing ticks, ticks that detached from rodents and xenodiagnostic ticks.

Materials and methods

Collection of ticks and rodents.

The present study took place at two different sites on the Swiss Plateau. The first site, SW (Ins, Canton Bern, 433m elevation, 46°92'North, 07°07'East) is a mixed forest (*Pruno-Fraxinetum*) established on a marl. The second site, PR (Bois de l'Hôpital, Neuchâtel, Canton Neuchâtel, 47°01'N and 06°56'E), is a mixed forest (*Rhamno-Quercetum*) established on a thin soil layer on a rather stony ground (limestone) layer and is under the climatic influence of the lake of Neuchâtel.

I. ricinus ticks were collected by flagging low vegetation on a monthly basis from March 2003 to November 2005, within the same week at both sites. Sampling was not undertaken under windy, snowy and rainy conditions. The 1-m² flag was examined every 15 m over 360 m at SW and 1'049 m at PR along the same transects. Ticks were identified to species, stage and sex and maintained at relative humidity close to 95% at room temperature until processed for isolation of spirochetes (within 7 to 10 days). Questing tick density was expressed as the number of ticks per 100m². An annual value for tick density called cumulated tick density (CTD) was obtained by integrating the linearly interpolated curve of the measured questing tick densities over 1 year (Eisen et al. 2003, Jouda et al. 2004a, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007a).

Small mammals were lived-trapped monthly from March 2003 to November 2005 during the same week of questing tick collection, using 50 wooden box traps placed every 5 meters along the questing tick collection transects. Traps were placed between 4 and 7 p.m. and collected the next morning between 7 and 9 a.m. Traps were baited with grains, pieces of apple and during winter months straw was added. Captured individuals were brought into the laboratory and caged individually over a pan of water until the feeding ticks dropped off. Engorged ticks were collected, counted and maintained as described above until the molt was completed.

Xenodiagnosis

About one week after capture, rodents were identified to species and sexed. A xenodiagnosis was performed 3-4 days after all field-derived ticks detached. About 100 xenodiagnostic *I. ricinus* larvae, derived from our laboratory colony free of spirochetal infection,

were placed on the head of rodents and allowed to engorge until repletion. Replete ticks were collected daily from each host into a pan of water and maintained under the same conditions as described for field-derived ticks, until they molted. Finally, rodents were released at the exact trapping site, around 20 days after capture. Ticks collected from rodents and xenodiagnostic ticks were examined for *Borrelia* after their molt.

Isolation of spirochetes from *I. ricinus*

Questing ticks, ticks collected on rodents and xenodiagnostic ticks were briefly soaked in 70% ethanol and individually squashed with sterilized forceps in tubes containing modified BSK-II medium (Sinsky and Piesman 1989). The culture tubes were screened by dark-field microscopy for spirochetes after 7 and 14 days of incubation at 34°C and 1,5 ml of positive spirochete subcultures were washed by centrifuging and double washing with 1 ml of PBS-MgCl₂. Pellet was suspended in 50 µl of ultra-filtered water and DNA was extracted after incubation at 100°C for 10min according to Postic et al. (1994). Thermolysates were stored at -20°C until use for Polymerase Chain Reaction (PCR). Cultures that were contaminated were not further investigated and appear as untyped *Borrelia*.

Identification of *Borrelia* species

PCR and Restriction fragment length polymorphism (RFLP) as described by Postic et al. (1994) were used to identify the *Borrelia* species. Briefly, the variable spacer region between two repeated genes encoding for ribosomal 23S and 5S was amplified using primers P1 (5'-CTGCGAAGTTCGCGGGAGA-3') and P2 (3'-TCCTAGGCATTCACCATA-3') in a Tgradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Göttingen, Germany). Negative and positive controls were included in each PCR. In negative controls, water replaced DNA samples. PCR products were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Positive PCR products were digested overnight with *Mse*I restriction endonuclease at 37°C and then separated by electrophoresis in a 16% acrylamide gel for 1h 30min at 120 V. Digested DNA was stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Rodent species distribution at both sites was compared by Fisher's exact test, tick infestation levels on rodents was compared with an analysis of variance with logarithmic transformation, correlation between numbers of larvae and nymphs feeding together on individual hosts was determined with the Spearman's rank correlation. The Pearson's Chi Square

Test was used to compare the proportion of rodents infested by nymphs and the prevalence of infection in ticks and finally the distribution of *B. burgdorferi* s.l. species was analyzed with the Goodness of fit test. Statistical results were considered significant if the p-value was less than 0.05. All statistical analyses were performed using S-Plus 6.2 for Windows, Copyright Lucent Technologies, Inc.

Results

Questing ticks

All questing ticks collected by flagging low vegetation at the two sampling sites belonged to *I. ricinus*. A total of 614 *I. ricinus* larvae, 9101 nymphs and 1147 adults were obtained at PR and 62 larvae, 1712 nymphs and 540 adults at SW. Questing nymphs were globally more abundant at PR than at SW for the three-year period, with the highest CTD and the highest peak tick density (PTD) reached in 2003, with 12054 nymphs per 100 m²/year and 163 nymphs per 100 m², respectively (Figure 1). Questing adults showed the highest CTD and PTD at SW in 2005, with 1882 adults per 100 m²/year and 29 adults per 100 m², respectively. There were variations in the seasonal evolution of questing tick densities among years at both sites and questing tick activity lasted from February to November at PR and from March to October at SW with a strong decline in June at both sites (Figure 1).

Infestation of rodents by ticks

During this study, 632 rodents of three species (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *M. glareolus*) and two *Sorex araneus* shrews were captured over 3150 trap nights (Table 1). Shrews were not examined for tick infestation because they were dead when traps were checked. Rodents were less frequently trapped at PR (0.11 rodent/trap night; n=165 rodents) than at SW (0.30 rodent/trap night; n=467). Over the three-year study at PR each of the three rodent species represented one third of all captured animals whereas at SW, *M. glareolus* was clearly the dominant species (55%), followed by *A. flavicollis* (35%) (Fisher Test, p<0.001).

A total of 5808 *I. ricinus* ticks (5524 larvae (95.1%) and 284 nymphs (4.9%)) detached from captured rodents (Table 1). The seasonal pattern of ticks infesting rodents was different from the seasonal pattern of questing tick activity (Figures 1 and 2). Ticks were observed on rodents from February-March to November without decline in summer (Figure 2). At the two sites, the proportion of rodents infested by immature ticks was similar (PR: 59.4% and SW: 61%, Table 1). However, rodents from SW showed the highest infestation levels reaching 10 ± 21.6

for larvae and 0.54 ± 1.65 for nymphs. Each rodent species was infested by significantly more larvae at SW than at PR (Analysis of variance with logarithmic transformation $p= 0.033$ for *M. glareolus*, $p<0.001$ for *A. sylvaticus* and $p<0.001$ for *A. flavicollis*) and nymphs represented 5.1% of ticks infesting rodents at SW compared to 3.8% at PR (Table 1). At PR, larval infestation level among the three rodent species did not show significant difference whereas at SW, *M. glareolus* displayed a significantly lower level of infestation by larvae than the two *Apodemus* species (Analysis of variance with logarithmic transformation, $p<0.001$). At both sites, bank vole was the rodent species showing the lowest infestation load (Table 1).

At both sites, a significant positive correlation was observed between the numbers of larvae and nymphs feeding together (co-feeding ticks) on individual hosts (Spearman's rank correlation, $p<0.001$). Considering each site, the proportion of individuals infested by at least one nymph did not vary among years (Pearson's Chi Square Test, SW: $p=0.062$, PR: $p=0.91$). The probability to find feeding nymphs on a host increased with larval infestation, particularly at SW (Figure 3). Considering only March to September (the months with the highest tick infestations), there was clearly more rodents with co-feeding ticks at SW (88/310, 28%) than at PR (13/113, 12%) (Pearson's Chi Square Test, $p<0.001$) and the proportion of rodents infested by nymphs was also significantly higher at SW (91/310, 29%) than at PR (15/113, 13%) (Pearson's Chi Square Test, $p<0.001$). *A. flavicollis* was the species the most frequently infested by co-feeding ticks considering both sites (Pearson's Chi Square Test, $p=0.002$).

***Borrelia* infection in ticks.**

A total of 638 *Borrelia* isolates were obtained from 2073 *I. ricinus* nymphs and 1055 adults collected by flagging vegetation at both sites (Table 2). More ticks were infected at PR (22.3%, 478/2148) than at SW (16.3%, 160/980) but the difference was not significant. However, at each site, adult ticks were significantly more infected than nymphs (Pearson's Chi Square Test, PR: $p<0.001$, SW: $p=0.005$) (Table 2). Four *Borrelia* species, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss and *B. valaisiana*, were identified in questing ticks at both sites. Mixed infections were observed in 23 questing ticks (3.6%) (*B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss in six nymphs and six adults, *B. garinii* and *B. valaisiana* in two nymphs and four adults, *B. garinii* and *B. afzelii* in two nymphs and two adults and *B. garinii* and *B. burgdorferi* ss in one adult).

Species distribution was not uniform at the two sites and in tick stages (Goodness of fit test, $p\leq 0.001$) but the *Borrelia* species distribution in nymphs and in adults was not different between PR and SW. *B. afzelii* was the dominant species in questing *I. ricinus* nymphs and adults. *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss were more frequently detected in questing nymphs at PR

than at SW (PR: 63.7%, SW: 58.3%) and *B. burgdorferi* ss was significantly more frequently detected in nymphs from PR (16.1%) than from SW (5%, Pearson's Chi Square Test, $p=0.04$). If we compare the species distribution at each site between questing nymphs and adults, we observe a significant difference at both PR (Pearson's chi-square test, $p<0.001$) and SW ($p=0.011$). *B. afzelii* was significantly more frequent than *B. garinii* but only in nymphs (Pearson's chi-square test, $p=0.003$ for PR and $p<0.001$ for SW).

A total of 296 *Borrelia* isolates were obtained from 1074 molted ticks (28.4%) that detached from 130 rodents (PR: $n=56$; SW: $n=74$) (Table 3). *B. afzelii* was the dominant species ($n=278$, 94%) and *B. bavariensis* (identified by Reverse Line Blotting, Gern et al. 2010, data not shown) was observed once at SW. No infection with more than one *Borrelia* species was detected in molted ticks that engorged on rodents. The infection prevalence in ticks that detached from rodents trapped at PR reached 28.9% (114/395), and 39.3% (22/56) of rodents were infested by infected ticks whereas at SW more than 50% (55.4%, 41/74) of rodents were infested by infected ticks with an infection prevalence in ticks similar to that observed at PR (26.8%, 182/679) (Table 3). The rodent species the most frequently infested by infected ticks were *A. sylvaticus* (47.6%, 10/21) at PR and *M. glareolus* (46.4%, 13/28) at SW. Infection rates of larvae (examined as nymphs) that detached from rodents varied according to rodent species from 18.6% to 37.6% at PR, and from 21.6% to 31.9% at SW (Table 4).

To examine the effect of co-feeding ticks (nymphs and larvae feeding simultaneously on rodents) on the percentage of *Borrelia* infected larvae, we compared the infection of larvae feeding on hosts infested by co-feeding ticks with that of larvae feeding on hosts infested by larvae only. At PR a significantly higher infection rate (44%, 62/141) was observed among larvae feeding on hosts infested by both immature stages than on hosts infested by larvae only (18.8%, 42/223) (Pearson's chi-square test, $p<0.001$). The difference at SW was not significant (115/459, 25.1%, vs 26/149, 17.4%, Pearson's chi-square test, $p=0.07$). If we compared the infection rate of larvae feeding on *Apodemus* spp. or on *M. glareolus* at both sites, according to infestation pattern of rodents (with co-feeding nymphs vs without), the difference was significant at PR for *Apodemus* spp. (51.7%, 62/120 vs 15.4%, 25/162, Pearson's chi-square test, $p\leq 0.001$), and for *M. glareolus* at SW (44.2%, 42/95 vs 15.5%, 11/71, Pearson's chi-square test, $p\leq 0.001$). However, the difference was not significant for *Apodemus* spp. at SW (20.1%, 73/364 vs 19.2%, 15/78) and a comparison was not possible for *M. glareolus* at PR because none of the captured voles was simultaneously infested larvae and nymphs.

A xenodiagnosis performed on a subset of captured rodents (PR: $n=23$; SW: $n=38$) showed that *B. afzelii* (180/209, 86.1%) was clearly the dominant species transmitted from

rodents to ticks (Table 5). *B. bavariensis* (6/209, 2.9%) was also observed in xenodiagnostic ticks, but only in ticks from rodents captured at SW (Table 4). More than 60% of rodents captured at both sites (PR: 69.6%, 16/23; SW: 60.5%, 23/38), transmitted spirochetes to 28.1% (81/288) xenodiagnostic ticks at PR and 20.8% (128/616) at SW. Rodent infectivity for xenodiagnostic ticks varied between sites and rodent species. At both sites, *M. glareolus* was the most infectious rodent species since more than 60% of them transmitted infection to more than 48% of xenodiagnostic ticks. In contrast, *A. sylvaticus* was the less infectious species and its infectivity was particularly low at SW where only 28.6% of them transmitted spirochetes to only 6.7% of ticks (Table 4).

Discussion

During this three-year study, we focused our attention on several parameters related to questing ticks and to infestation of small-sized mammals (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *M. glareolus*) described as reservoirs for *B. burgdorferi* sl in two LB endemic areas located on the Swiss Plateau.

Questing ticks and ticks attached on rodents

In Switzerland, evolution of questing tick density overtime (phenology) presents both bimodal (peaks in spring and autumn) and unimodal (peak in spring) patterns (Perret et al. 2000, Jouda et al. 2004a, 2004b, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007a). In the present study, both profiles were observed. Variability in tick density (CTD) between years was noticed as previously reported in temporal studies on tick density in Europe (Randolph et al. 2002, Randolph 2004, Jouda et al. 2004a, Morán Cadenas et al. 2007a, Perret et al. 2000).

Overall, questing nymph density was higher at PR than at SW contrasting with the intensity of rodent infestation that was higher at SW. This might be partly explained by differences in vegetation type between the two study sites. In fact, at SW dense vegetation, brambles, fallen trees and branches were present along the sampling transect differing from the more homogeneous vegetation at PR. In the inhomogeneous habitat at SW the number of subadult questing ticks could have been underestimated because the flag did not penetrate to the leaf-litter surface or to the lowest vegetation level (Carroll et al. 1992, Vassallo et al. 2000), which could have biased our data (Burri et al. 2011). Another possible explanation could be that immature ticks have different questing behavior in different areas, for example, questing closer to the ground or questing at night for reasons that remain undetermined. This would lead to an

increase of contacts between immature tick stages and rodents and to a decrease in the success of collection of questing ticks by flagging vegetation as observed in the present study.

At both sites, a discrepancy was observed between the seasonal activity patterns of questing ticks and of ticks infesting rodents. In fact, immature ticks feeding on rodents were frequently detected from February to November at both sites, whereas questing tick populations were drastically decreasing in summer. The seasonal pattern of tick infestations of rodents shows that ticks were in fact active for a much greater part of the year than observed by flagging the vegetation. According to these observations, monitoring of the questing tick activity alone by flagging vegetation does not appear as a good indicator for the seasonal risk of tick bites in humans in a habitat. This is corroborated by the recent observations in Switzerland describing contrast between seasonal questing tick activity and seasonal pattern of tick-bites in humans that are mostly occurring when questing tick density has declined during summer (Huegli et al. 2009; FOPH, 2010). It remains to be elucidated whether part of questing ticks quest lower on vegetation in summer but are still picked up by humans during their activity in tick biotopes. Such a behavior of *I. ricinus* ticks would be in line with a study showing that nymphs quest lower on vegetation when desiccation risks are high (Randolph and Storey 1999).

Rodent trapping success was higher at SW (0.30 rodents/trap night) than at PR (0.11 rodents/trap night). The proportion of hosts infested by ticks was similar at both sites but the infestation load was higher at SW than at PR. On average, more larvae were attached on *Apodemus* mice than on *Myodes* voles as already described by other authors (Michalik et al. 2005, Humair et al. 1993, Kurtenbach et al. 1995, Gray et al. 1999). Nevertheless xenodiagnoses demonstrated that *M. glareolus* was the most infective rodent species at both sites, which corroborates results obtained by Humair et al. (1999) although these authors did not screen ticks for *Borrelia* infection after the molt as we did. This is interesting because it is known that ticks fed on voles do not feed or molt successfully due to acquired resistance to ticks (Dizij and Kurtenbach 1995). Nevertheless, our results show that when ticks attached to voles are analyzed after their molt, vole contribution to the infection of ticks appears as higher than previously thought.

If we compare our data with those reported by Humair et al. (1993) at SW in the early nineties, the larval infestation loads on rodents recorded between both periods are similar. Nevertheless, during the present study higher infestation levels by nymphs were observed (0.54 ± 1.65 nymphs/host compared to 0.2 ± 0.8 nymphs/host in Humair et al. 1993). Similarly, *Borrelia* infected ticks were infesting a higher proportion of rodents in the present study (*M. glareolus*: 46.4%, *A. sylvaticus*: 33.3% and *A. flavicollis*: 26%) compared to data from Humair

et al. (1993) (*M. glareolus*: 25%, *A. sylvaticus*: 43% and *A. flavicollis*: 20%). Apparently, the situation changed at SW, rodents harbor more nymphs and they carry more infected ticks than two decades ago.

The lower tick infestation of rodents trapped at PR compared to SW might be explained by differences in questing tick behavior as mentioned above and by results from previous studies at PR showing the importance of red squirrels (*Sciurus vulgaris*) as hosts for immature ticks (Humair and Gern 1998, Morán Cadenas et al. 2007b). This suggests that at PR subadult ticks feed more frequently on squirrels than on rodents. All the more so since a higher prevalence of squirrel-associated species, *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii*, was detected in questing nymphs at PR than at SW.

***Borrelia* genospecies**

Four *Borrelia* genospecies were detected in questing ticks (*B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. valaisiana*): this large diversity of *Borrelia* genospecies reflects the diversity of hosts - rodents, birds, middle and large-sized mammals - playing a role at both sites in the tick developmental cycle and in the maintenance of *B. burgdorferi* sl. However, only two genospecies (*B. afzelii*, *B. bavariensis*) were identified in field-derived ticks attached on rodents as well as in xenodiagnostic ticks. This illustrates once again the host specificity displayed by *Borrelia* species and confirms that rodents transmit *B. afzelii* and *B. bavariensis* to feeding ticks (Hu et al. 1997, Huegli et al. 2002). Interestingly, *B. bavariensis* was observed only at SW and this observation substantiates the presence of this *Borrelia* species at that site (Hu et al. 2001) and the first description of rodents as reservoirs for *B. bavariensis* (Huegli et al. 2002).

Co-feeding transmission

In many host-parasite systems, parasites are spatially distributed in clusters on the vertebrate hosts (Shaw et al. 1998). When infected (usually nymphs) and uninfected (usually larvae) ticks feed simultaneously in close proximity, pathogens may directly pass from infected to uninfected ticks, even in the absence of a systemic infection in hosts. This transmission pathway that was previously described for Thogoto and tick-borne encephalitis (TBE) viruses (Jones et al. 1987, Labuda et al. 1997) has also been reported for LB spirochetes (Gern and Rais 1996). During our study, a significant difference was observed between both sites concerning the proportion of rodents simultaneously infested by larvae and nymphs. In fact, at SW more than the double of hosts (28%) was infested with co-feeding larvae and nymphs compared to PR (11%).

Although co-feeding transmission has been described for LB spirochetes in the laboratory (Gern and Rais 1996, Hu et al. 2003), its role in nature is not well known for *B. burgdorferi* sl. We observed that at PR larvae feeding simultaneously with nymphs on captured rodents were significantly more infected than larvae feeding without nymphs. In particular this was the case for *Apodemus* mice at this site. In contrast, at SW, there was no significant difference when all rodent species were considered. But when each species was examined separately a significant difference was observed for larvae feeding on *M. glareolus*, when they were co-feeding with nymphs, but not on *Apodemus* spp. mice. How can we explain this? First, at SW, more larvae infested rodents than at PR and the percentage of hosts infested by nymphs (29%) was significantly higher than at PR (13%). This implicates that at SW, a higher percentage of hosts were probably already systemically infected if one assumes that after the bite of infected nymphs rodents, in particular *Apodemus* mice, remain infectious throughout their lives (Gern et al. 1994). Moreover, it has been reported that the infectivity for ticks of systemically infected rodents increases with successive infestations by larvae (Gern et al. 1994). Hence, most larvae attached on *Apodemus* mice at SW were probably acquiring infection from rodents that were already infected even when they were feeding with nymphs. This may explain why at SW larvae attached on *Apodemus* mice did not display a difference in infection rate when they were feeding alone or simultaneously with nymphs. The situation is different for *M. glareolus* at SW or *Apodemus* mice at PR: their infestation level was lower than for *Apodemus* at SW. In fact, at PR *Apodemus* mice had rare contacts with nymphs (globally only 13% of rodents carried nymphs) and at both sites *M. glareolus* displayed the lowest infestation level, with the lowest mean numbers of larvae and of nymphs. The consequence is that persistent or systemic infections were probably less frequent among these individuals. Larvae that were feeding with nymphs on these rodents had higher chance to feed on hosts that were not systemically infected compared to such larvae feeding on *Apodemus* mice at SW. In this situation the effect of co-feeding transmission on larval infection rate is more visible without the “background” created by infection due to persistent or systemic infection. This indicates that the perpetuation of *B. afzelii* depends both on persistent infection in rodents and on co-feeding transmission on hosts and is modulated by the frequency of contacts between hosts and both larvae and nymphs, which varies among sites.

Here, although more than 25% of rodents at one site were infested by co-feeding larvae and nymphs, no infection by more than one *Borrelia* species was detected in ticks that fed on these rodents. This suggests that co-feeding transmission on rodents does not contribute to the presence of infections by more than one *Borrelia* species in questing ticks as we observed here and does not participate in maintaining *Borrelia* genospecies diversity. Nevertheless, it would be

interesting to observe the role of co-feeding in maintaining *Borrelia* diversity at the intra specific level.

Knowing that co-feeding transmission of TBE virus (TBEV) is important for the maintenance of the TBEV in endemic area (Randolph et al. 1999), it is interesting to mention here that SW, the site with the highest proportion of hosts infested by co-feeding ticks, is known as a TBE endemic area since 1984 (Wyler and Matile 1984), whereas TBE cases have never been reported at PR. As an interesting side-note, a prospective study recently suggested that the proportion of rodents with co-feeding ticks might be one of the factors that distinguish a TBEV focus from a non-TBEV focus (Burri et al. 2011).

Acknowledgements

We would like to thank N. Tonetti and C. Holzer for the identification of *B. bavariensis* and Jacqueline Moret for her precious help with statistical analysis. Results presented here are part of the PhD thesis of one of the authors (DP). This work was financially supported by the Swiss National Science Foundation (grant No. 3200-100657).

References

- Bellet-Edimo, R, Betschart, B, Gern L. Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmissions of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks. Bull Soc Neuch Sci Nat 2005; 128: 117-125.
- Burri, C, Morán Cadenas, F, Douet, V, Moret, J, Gern, L. *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). Vector-Borne Zoon Dis 2007; 7: 50-58.
- Burri, C, Bastic, V, Maeder, G, Patalas, E, Gern, L. Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland. J Med Entomol 2011; 48: 615-627.
- Carroll, JF, Schmidtman, ET. Tick sweep: modification of the tick drag-flag method for sampling nymphs of the deer tick (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1992; 29: 352-355.
- Casjens, SR, Fraser-Liggett, CM, Mongodin, EF, Qiu, WG, Dunn, JJ, Luft, BJ, Schutzer, SE. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. J Bacteriol 2011; 193: 1489-1490.
- Dizij, A, Kurtenbach, K. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. Paras Immunol 1995; 17: 177-183.

- Eisen, RJ, Eisen, L, Castro, MC, Lane, RS. Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in Northern California: effect of climatic conditions and habitat type. *Environm Entomol* 2003; 32: 1010-1018.
- FOPH, 2010. Federal Office for Public Health: La borréliose de Lyme: enquête Sentinella 2008/2009 – Le Centre national de référence pour les maladies transmises par les tiques se présente. *Bulletin* 2010; 22/10: 579-82 available from <http://www.bag.admin.ch/dokumentation/publikationen/01435/07914/index.html?lang=fr>
- Gern, L, Siegenthaler, M, Hu, CM, Leuba-Garcia, S, Humair, PF, Moret, J. *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur J Epid* 1994; 10: 75-80.
- Gern, L, Rais, O. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1996; 33: 189-192.
- Gern, L, Douet, V, Lopez, Z, Rais, O, Morán Cadenas, F. Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks Tick-borne Dis* 2010; 1: 23–29.
- Gray, J, Kirstein, F, Robertson, J. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 717-729.
- Hanincová, K, Taragelova, V, Koci, J, Schäfer, SM, Hails, R, Ullmann, AJ, Piesman, J, Labuda, M, Kurtenbach, K. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environm Microbiol* 2003; 69: 2825-2830.
- Hu, CM, Humair, PF, Wallich, R, Gern, L. *Apodemus* sp rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zentbl Bakt* 1997; 185: 558-564.
- Hu, CM, Wilske, B, Lobet, Y, Gern, L. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to Balb/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1169-1171.
- Hu, CM, Cheminade, Y, Perret, JL, Weynants, V, Lobet, Y, Gern, L. Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Med Microbiol* 2003; 293: 421-426.
- Huegli, D, Hu, CM, Humair, PF, Wilske, B, Gern, L. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4735-4737.

- Huegli, D, Moret, J, Rais, O, Moosmann, Y, Erard, P, Malinverni, R, Gern L. Tick bites in a Lyme borreliosis highly endemic area in Switzerland. *Int J Med Microbiol* 2009; 299: 155-160.
- Hulinska , D, Votypka, J, Kriz, B, Holinkova, N, Novakova, J, Hulinsky, V. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia* spp. isolated from *Ixodes ricinus* ticks by using electrophoretic chips and real-time polymerase chain reaction. *Folia Microbiol* 2007; 52: 315-324.
- Humair, PF, Turrian, N, Aeschlimann, A, Gern, L. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: The epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Paras* 1993; 40: 65-70.
- Humair, PF, Péter, O, Wallich, R, Gern, L. Strain variation in *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in the same Swiss localities. *J Med Entomol* 1995; 32: 433-438.
- Humair, PF, Gern, L. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop* 1998; 69: 213-227.
- Humair, PF, Postic, D, Wallich, R, Gern, L. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochete. *Zentrblt Bakt Hyg* 1998; 287: 521-538.
- Humair, PF, Rais, O, Gern, L. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitol* 1999; 118: 33-42.
- Jones, LD, Davies, CR, Steele, GM, Nuttall, PA. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* 1987; 237: 775-777.
- Jouda, F, Perret, JL, Gern, L. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J Med Entomol* 2004a; 41: 162-170.
- Jouda, F, Perret, JL, Gern, L. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector-Borne Zoon Dis* 2004b; 4: 23-32.
- Kurtenbach, K, Kampen, H, Dizij, A, Arndt, S, Seitz, HM, Schaible, UE, Simon, MM. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s. l. in German woodlands. *J Med Entomol* 1995; 32: 807-817.

- Kurtenbach, K, Sewell, HS, Ogden, HO, Randolph, SE, Nuttall, PA. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun* 1998; 66: 1248–1251.
- Labuda, M, Kozuch, O, Zuffová, E, Elecková, E, Hails, RS, Nuttall, PA. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 1997; 235: 138-143.
- Margos, G, Vollmer, SA, Cornet, M, Garnier, M, Fingerle, V, Wilske, B, Bormane, A, Vitorino, L, Collares-Pereira, M, Drancourt, M, Kurtenbach, K. A new *Borrelia* species defined by multi-locus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 5410-5416.
- Michalik, J, Skotarczak, B, Skoracki, M, Wodecka, B, Sikora, B, Hofman, T, Rymaszewska, A, Sawczuk, M. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in yellow-necked mice and feeding *Ixodes ricinus* ticks in a forest habitat of west central Poland. *J Med Entomol* 2005; 42: 850-856.
- Morán Cadenas, F, Rais, O, Jouda, F, Douet, V, Humair, PF, Moret, J, Gern, L. Phenology of the tick *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north-and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J Med Entomol* 2007a; 44: 683-693.
- Morán Cadenas, F, Rais, O, Humair, PF, Douet, V, Moret, J, Gern, L. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J Med Entomol* 2007b; 44: 1109-1117.
- Olsén, B, Jaenson, TG, Bergström, S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 1995; 6: 3082-3087.
- Perret, JL, Guigoz, E, Rais, O, Gern, L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res* 2000; 86: 554-557.
- Perret, JL, Rais, O, Gern, L. Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *J Med Entomol* 2004; 41: 361-365.
- Piesman, J, Gern, L. Lyme Borreliosis in Europe and North America. *Parasitol* 2004; 129: 191-220.
- Postic, D, Assous, MV, Grimont, PA, Baranton, G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 743-752.

- Randolph, SE, Storey, K. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): Implications for parasite transmission. *J Med Entomol* 1999; 36: 741-748.
- Randolph, SE, Miklisova, D, Lysy, J, Rogers, DJ, Labuda, M. Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis. *Parasitol* 1999; 118: 177-186.
- Randolph, SE, Green, RM, Hoodless, AN, Peacey, MF. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Intern J Parasitol* 2002; 32: 979-989.
- Randolph, SE. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitol* 2004; 129: S37-S65.
- Rauter, C, Hartung, T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7203-7216.
- Richter, D, Postic, D, Sertour, N, Livey, I, Matuschka, FR, Baranton, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 873-881.
- Shaw, DJ, Grenfell, BT, Dobson, AP. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitol* 1998; 117: 597-610.
- Sinsky, RJ, Piesman, J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1723-1727.
- Vassallo, M, Pichon, B, Cabaret, J, Figureau, C, Pérez-Eid, C. Methodology for sampling questing nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), the principal vector of Lyme disease in Europe. *J Med Entomol* 1992; 29: 352-355.
- Wyler, R, Matile, H. Die Zeckenzephalitis in der Schweiz. 1. Klinik und Epidemiologie. 2. Diagnose und Immunprophylaxie. *Schweiz Rundschau Med* 1984; 73: 601-619.

Figures and tables

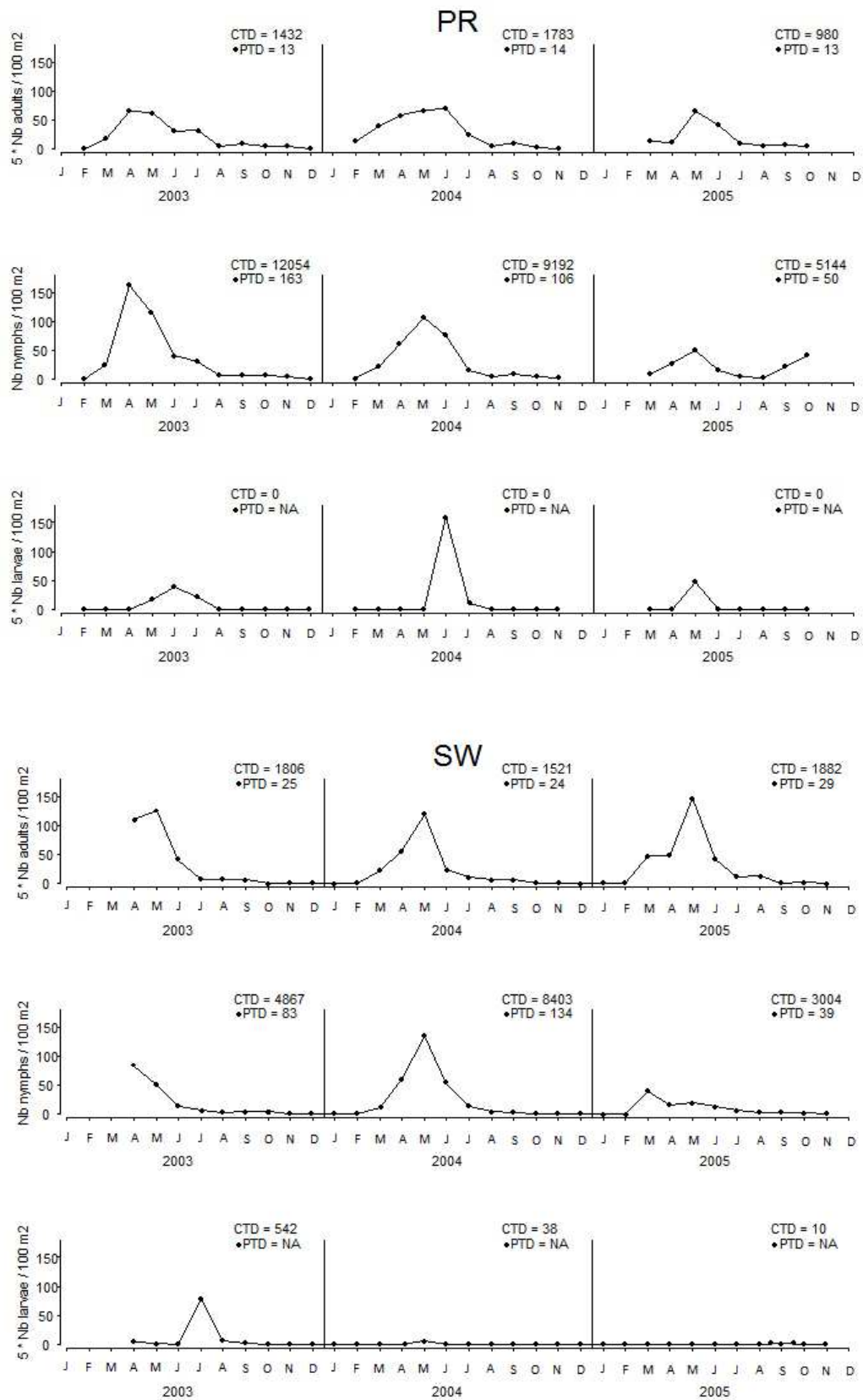


Figure 1: Seasonal evolution of *I. ricinus* questing tick density at Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW).

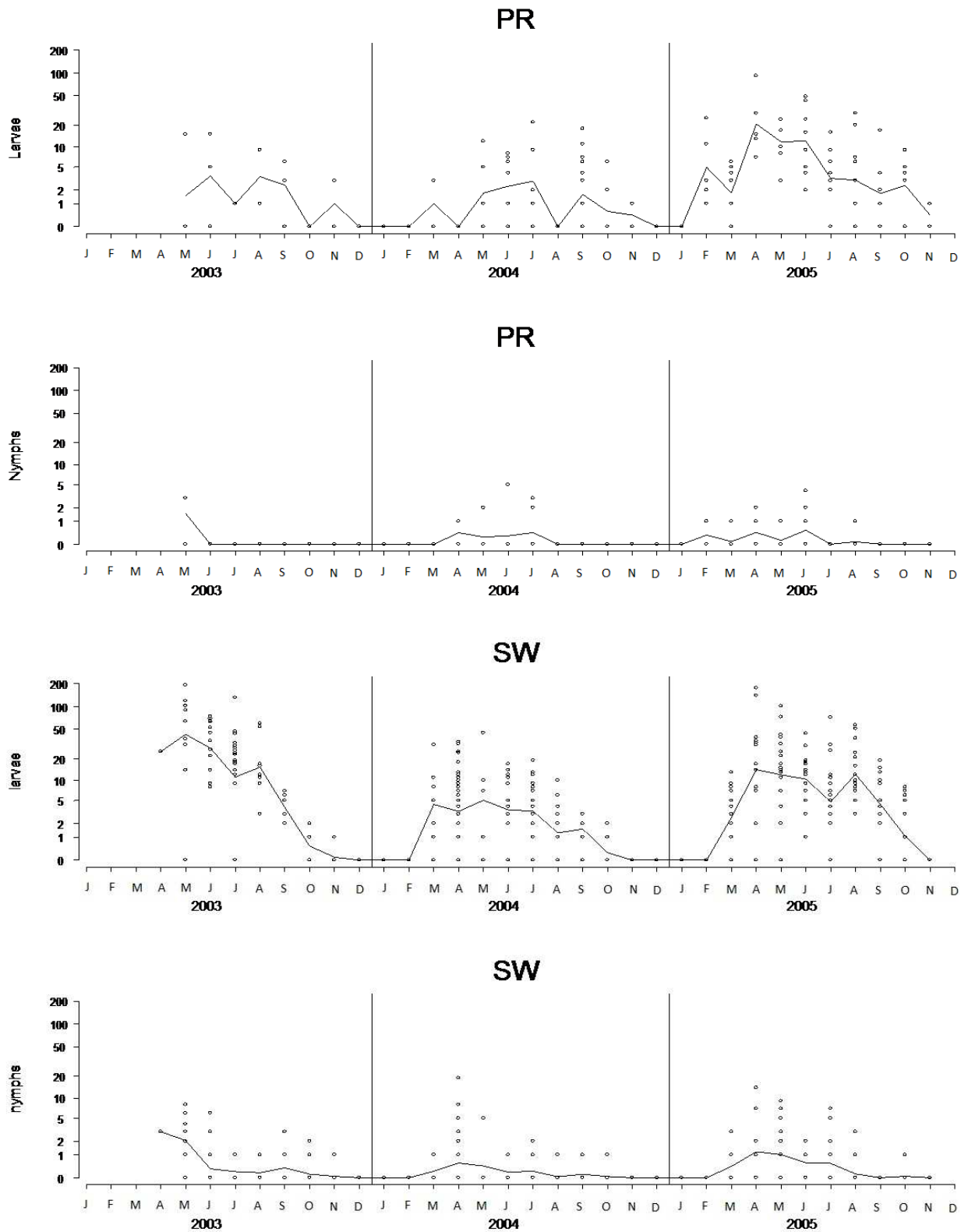


Figure 2: Annual distribution of the median number of *I. ricinus* immature stages per rodent at Staatswald (SW) and Portes-Rouges (PR).
 ◦: individual rodent

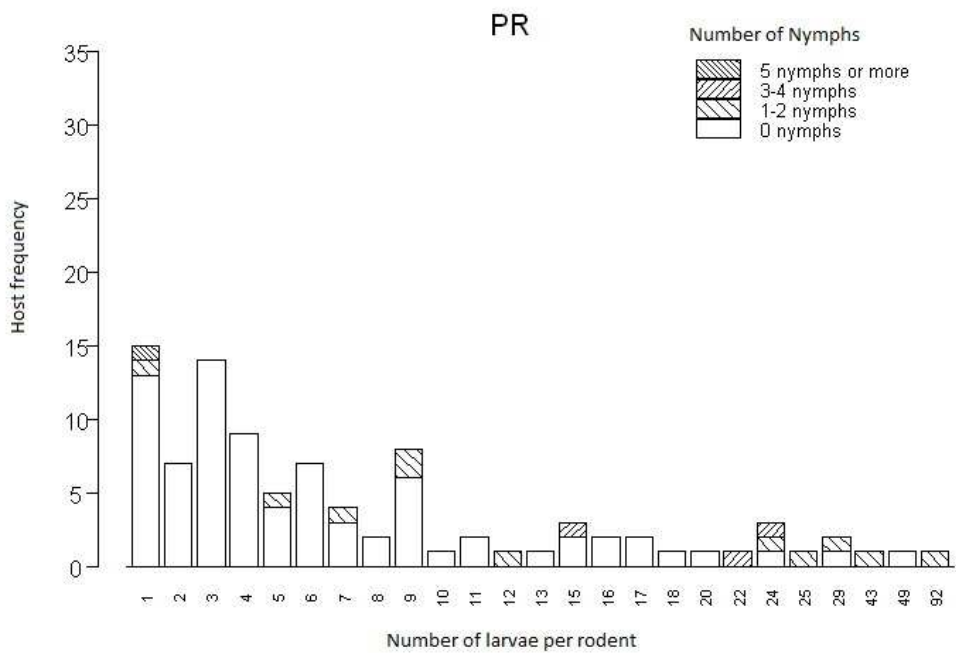
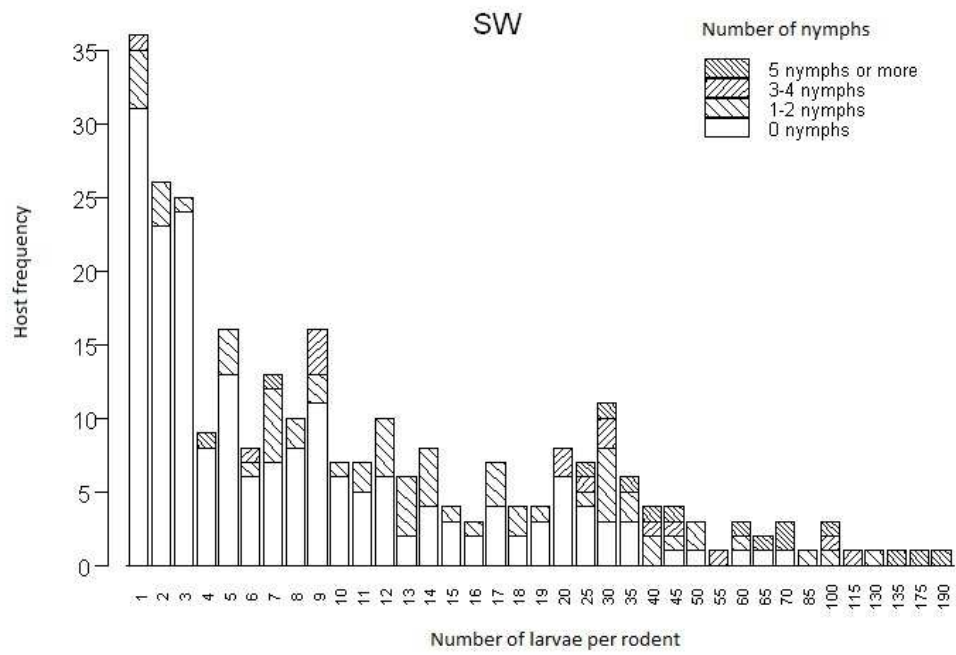


Figure 3: Coincident aggregated frequency distributions of *I. ricinus* larvae and nymphs on rodents.

		PR			
		Larvae		Nymphs	
Host species	No infested/ examined hosts	No	Mean no per host \pm SD	No	Mean no per host \pm SD
<i>A. flavicollis</i>	36/59 (61%)	453	7.7 \pm 15	11	0.19 \pm 0.66
<i>A. sylvaticus</i>	30/52 (58%)	238	4.6 \pm 7	20	0.38 \pm 1.03
<i>M. glareolus</i>	32/54 (59%)	166	3.1 \pm 5.1	3	0.06 \pm 0.23
Total	98/165 (59.4%)	857	5.2 \pm 10.4	34	0.21 \pm 0.72
		SW			
		Larvae		Nymphs	
Host species	No infested/ examined hosts	No	Mean no per host \pm SD	No	Mean no per host \pm SD
<i>A. flavicollis</i>	112/162 (69%)	2786	17.2 \pm 30.2	139	0.86 \pm 2.16
<i>A. sylvaticus</i>	24/50 (48%)	495	9.9 \pm 25.6	26	0.52 \pm 2.04
<i>M. glareolus</i>	149/255 (58%)	1386	5.4 \pm 10.1	85	0.33 \pm 1.06
Total	285/467 (61%)	4667	10 \pm 21.6	250	0.54 \pm 1.65

Table 1: Infestation of small mammals with larval and nymphal *I. ricinus* at Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW). SD: standard deviation.

	Stage	No infected/tested ticks (%)	Distribution of <i>Borrelia</i> species (%)					
			BA	BG	BB	BV	Bsp	Mixed
P R	N	267/1497 (17.8)	127 (47.6)	62 (23.2)	43 (16.1)	11 (4.1)	18 (6.8)	6 (2.2)
	A	211/651 (32.4)	71 (33.6)	62(29.4)	31 (15.2)	28 (13.3)	6 (2.8)	13(6.2)
	Total	478/2148 (22.3)	198 (41.4)	124 (25.9)	74 (15.5)	39 (8.2)	24 (5)	19 (4)
S W	N	60/576 (10.4)	32 (53.3)	11 (18.3)	3 (5)	3 (5)	10 (16.7)	1 (1.7)
	A	100/404 (24.8)	31 (31)	27 (27)	19 (19)	11 (11)	9 (9)	3 (3)
	Total	160/980 (16.3)	63 (39.4)	38 (23.8)	22 (13.8)	14 (8.7)	19 (11.9)	4 (2.5)

Table 2: Distribution of *Borrelia* species in questing *I. ricinus* ticks collected at Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW). N: nymphs; A: adults; BA: *B. afzelii*; BG: *B. garinii*; BB: *B. burgdorferi* ss, BV: *B. valaisiana*, Bsp: untyped *Borrelia*.

Host species	Site	Hosts	Nymphs			Adults				
		No with infected ticks /tested (%)	No infected /tested (%)	BA	Bbav	Bsp	No infected /tested (%)	BA	Bbav	Bsp
<i>A. flavicollis</i>	PR	5/17 (29.4)	43/157 (27.4)	42	0	1	2/2 (100)	1	0	1
	SW	26/40 (65)	80/370 (21.6)	71	1	8	21/47 (44.7)	18	0	3
<i>A. sylvaticus</i>	PR	10/21 (47.6)	47/125 (37.6)	45	0	2	3/6 (50)	3	0	0
	SW	2/6 (33.3)	16/72 (22.2)	16	0	0	9/12 (75)	9	0	0
<i>M. glareolus</i>	PR	7/18 (38.9)	19/102 (18.6)	17	0	2	0/3	0	0	0
	SW	13/28 (46.4)	53/166 (31.9)	53	0	0	3/12 (25)	3	0	0

Table 3: Infection prevalence and genospecies distribution of *B. burgdorferi* sl in *I. ricinus* feeding on different rodent species captured at Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW). BA: *B. afzelii* ; Bbav: *B. bavariensis*, Bsp: untyped *Borrelia*

Host species	Site	Hosts	Xenodiagnostic ticks			
		No with infected ticks/tested (%)	No infected/tested (%)	BA	Bbav	Bsp
<i>A. flavicollis</i>	PR	4/6 (66.7)	23/75 (30.7)	19	0	4
	SW	14/23 (60.9)	83/389 (21.3)	67	6	10
<i>A. sylvaticus</i>	PR	9/12 (75)	31/157 (19.7)	26	0	5
	SW	2/7 (28.6)	8/120 (6.7)	7	0	1
<i>M. glareolus</i>	PR	3/5 (60)	27/56 (48.2)	26	0	1
	SW	7/8 (87.5)	37/107 (34.6)	35	0	2

Table 4: Infection prevalence and genospecies distribution of *B. burgdorferi* s.l. in xenodiagnostic *I. ricinus* ticks fed on different rodent species captured at Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW). BA: *B. afzelii*; Bbav: *B. bavariensis*; Bsp: untyped.



3.2. Publication 2

Borrelia afzelii ospC genotype diversity in *Ixodes ricinus* questing ticks and ticks from rodents in two Lyme borreliosis endemic areas: contribution of co-feeding ticks.

Pérez David¹, Kneubühler Yvan¹, Rais Olivier¹, Jouda Fatima¹ and Gern Lise¹

Papier accepté pour publication dans Ticks and Tick-Borne Diseases

¹Institut de Biologie, Université de Neuchâtel, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Corresponding author: Dr Lise Gern
Institute of Biology-Laboratory of Eco-Epidemiology of
Parasites
Université de Neuchâtel
Rue Emile-Argand 11
CH-2000 Neuchâtel
Tel: 0041 32 718 30 52
Fax: 0041 32 718 30 01
E-mail: Lise.Gern@unine.ch

Abstract

In Europe, the Lyme borreliosis (LB) agents like *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. afzelii* and *B. garinii* are maintained in nature by enzootic transmission cycles between vertebrate hosts and *Ixodes ricinus* ticks. The outer surface protein C is a highly antigenic protein expressed by spirochetes during transmission from ticks to mammals as well as during dissemination in the vertebrate hosts. Previous studies based on analysis of *ospC* gene sequences have led to the classification of *ospC* genotypes into *ospC* groups. The aim of this study was to analyse and compare *ospC* group distribution among isolates of the rodent associated genospecies, *B. afzelii*, at three levels (questing ticks, ticks feeding on rodents and xenodiagnostic ticks). Isolates were obtained during a study carried out in two LB endemic areas located on the Swiss Plateau (Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW)) where rodents were differently infested by co-feeding ticks (Pérez et al. submitted).

Overall, we identified 10 different *ospC* groups with different distributions among isolates from questing ticks, ticks that detached from rodents and xenodiagnostic ticks at the two sites. We observed a higher *ospC* diversity among isolates from ticks that fed on rodents at SW, and mixed infections by two *ospC* groups were also more frequent among isolates from ticks that fed on rodents at SW (n=18) than at PR (n= 1). At both sites, *B. afzelii* isolates obtained from larvae that were feeding on the rodents simultaneously with nymphs displayed a higher diversity of *ospC* groups (mean number of *ospC* groups: 2.25 for PR and 1.75 for SW) than isolates from larvae feeding without nymphs (mean number of *ospC* groups: 1.17 for PR and 1 for SW). We suggest that co-feeding transmission of *Borrelia*, previously described in laboratory models, contributes in nature in promoting and maintaining *ospC* diversity within local tick populations.

Key words: *Borrelia afzelii*, co-feeding, *ospC* groups, *Ixodes ricinus*, rodents

Introduction

Lyme borreliosis (LB) is a multisystemic tick-borne disease caused by spirochetes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) complex. The first clinical sign of LB is a primary skin lesion called *Erythema migrans* (EM) that spreads from the site of the tick bite. Later, bacteria may disseminate to secondary sites and induce different clinical manifestations, i.e., articular (arthritis), neurological (neuroborreliosis), cardiac and cutaneous (Strle and Stanek, 2009). In Europe, the tick *Ixodes ricinus* is the main vector of *B. burgdorferi* sl and the

genospecies the most frequently reported as pathogenic for humans are *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* and *B. bavariensis* (Baranton and De Martino, 2009; Margos et al., 2009). In nature the spirochete population is maintained by a transmission cycle involving *I. ricinus* ticks and some of their vertebrate hosts like for example *Apodemus* mice, *Myodes (Clethrionomys)* voles, dormice, hedgehogs, squirrels, various species of ground frequenting birds, and lizards (Piesman and Gern 2004).

Plasmid-encoded outer surface protein C is a major 23-kDa protein expressed by *B. burgdorferi* during transmission of spirochetes from ticks to mammals as well as during dissemination in vertebrate hosts (Schwan et al., 1995; Montgomery et al., 1996; Pal et al., 2004). The genetic diversity at the *ospC* locus has led to a classification into groups of alleles. On the basis of *ospC* sequence analysis, Wang et al. (1999) defined *ospC* major groups as groups of alleles that are different in >8% of their nucleotide sequence from alleles in other *ospC* groups and <2% different from other alleles in the same groups. In 1999, Seinost et al. (1999) described 21 *ospC* groups based on *B. burgdorferi* ss sequence divergence among which four cause systemic infections in humans. Strains of *B. burgdorferi* sl isolated from clinical samples in disseminated forms (referred to secondary sites) were defined as invasive. In North America, where *B. burgdorferi* ss clearly dominates, Brisson et al. (2004) demonstrated that each vertebrate host species in nature is infected by a subset of *B. burgdorferi* ss *ospC* groups but never by all *ospC* groups identified in questing ticks. They observed *ospC* frequency distribution within different *B. burgdorferi* ss populations and suggested that this locus was under balancing selection caused by the host immune response. This type of selection can maintain genetic diversity within a population when the environment is heterogeneous and no one genotype has the highest fitness in all environments. *B. burgdorferi* ss infects a huge variety of vertebrates corresponding to heterogeneous niches and *ospC* groups frequency distribution should differ if the fitness of a strain depends upon an interaction between *ospC* groups and host species factors. Inter- and intra-specific difference between hosts could both operate in this system to maintain *ospC* polymorphism (Brisson et al., 2004).

In Europe, 58 *ospC* groups were defined within the three main pathogenic species *B. burgdorferi* ss (22 *ospC* groups), *B. garinii* (22 *ospC* groups) and *B. afzelii* (14 *ospC* groups), (Seinost et al., 1999; Baranton et al., 2001). Only 10 of these groups contained all of the invasive strains isolated from different clinical samples. Lagal et al. (2003) extended the investigation and identified a total of 24 invasive strains belonging to 69 *ospC* groups within the three *Borrelia* pathogenic species.

The aim of this study was to compare *ospC* group distribution in the rodent associated genospecies, *B. afzelii*, within two LB endemic areas located on the Swiss Plateau (Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW)). Therefore, we investigated the intra-specific diversity of *ospC* groups among *B. afzelii* isolates from questing *I. ricinus* ticks, ticks infesting small rodents and xenodiagnostic ticks fed on these hosts that were obtained in a previous study (Pérez et al. submitted). In this context, we were particularly interested in the role of co-feeding transmission in the maintenance of *B. afzelii ospC* diversity.

Material and Methods

Borrelia* isolation from *I. ricinus

Spirochetes were isolated from questing ticks, ticks feeding on rodents and xenodiagnostic ticks from a previous study that was carried out in two mixed forests located on the Swiss Plateau: SW (Ins, Canton Bern, 433m elevation, 46°92'North, 07°07'East) and PR (Bois de l'Hôpital, Neuchâtel, Canton Neuchâtel, 47°01'N and 06°56'E) (Pérez et al. submitted).

Briefly, questing *I. ricinus* ticks were collected by flagging low vegetation and maintained in the laboratory at relative humidity close to saturation and room temperature until processed for spirochete isolation (within 7 to 10 days). Lived-trapped rodents (*Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus*) were brought into the laboratory and caged individually over a pan of water until the feeding ticks dropped off. One week later, a xenodiagnosis was performed. Briefly, about 100 *I. ricinus* larvae, from a laboratory colony free of *Borrelia* infection, were placed on rodents and allowed to engorge until repletion. Ticks collected from rodents and xenodiagnostic ticks were maintained as described above and were processed for *Borrelia* isolation one month after their moult.

Borrelia isolation from questing ticks, ticks collected on rodents and xenodiagnostic ticks was performed in BSK medium. Ticks were briefly soaked in 70% ethanol and individually squashed with sterilised forceps in tubes containing modified BSK-II medium (Sinsky and Piesman, 1989). The culture mediums were screened by dark-field microscopy after 7 and 14 days of incubation at 34°C.

***Borrelia* genospecies identification by PCR and restriction fragment length polymorphism**

For DNA extraction, 1,5 ml of positive spirochete subcultures were washed by centrifuging and double washing with 1 ml of PBS-MgCl₂. Pellet was suspended in 50 µl of ultra-filtered water and DNA was extracted after incubation at 100°C for 10min according to Postic et al. (1994). Thermolysates were stored at -20°C until use for Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to identify the *Borrelia* species (Postic et al., 1994). Briefly, the variable spacer region between two repeated genes encoding for ribosomal 23S and 5S using primers P1 (5'-CTGCGAAGTTCGCGGGAGA-3') and P2 (3'-TCCTAGGCATTCACCATA-3') was amplified in a Whatman Biometra T Gradient Thermocycler 96 (Göttingen, Germany). Negative and positive controls were included in each PCR. In negative controls, water replaced DNA samples. For RFLP, positive PCR products were digested overnight with *Mse*I restriction endonuclease (Postic et al., 1994) and then separated by electrophoresis in a 16% acrylamide gel for 1h 30min at 120 V. Digested DNA was stained with ethidium bromide. Only *B. afzelii* isolates were further analysed to identify the *ospC* group.

***ospC* group identification by PCR and cold single strand conformational polymorphism analysis**

The *ospC* gene of *B. afzelii* isolates was amplified by PCR as described by Lagal et al. (2003). A 277 bp fragment of the variable central part of *ospC* was amplified using forward primer B1 (SC32): 5'-AAAGCTATTGGTAAAAAAT-3' and reverse primer B2 (OspC9): 5'-GTTTTTAAAATAGCT(TG)(TC)TTTTG-3'. PCR amplifications were carried out in a Whatman Biometra T Gradient Thermocycler 96 (Göttingen, Germany) using the following conditions: 94°C for 3 min followed by 34 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 9 min. PCR products were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide.

For cold SSCP analysis, 4 µl of PCR product were added to 4 µl denaturation solution (94% formamide, 0,05% xylene cyanol) in a 100 µl tube and heated at 98°C for 5 min in a T Gradient thermocycler. After heat shock, samples were immediately placed into ice to prevent DNA hybridization. Samples (six µl) were loaded on a denaturated polyacrylamide gel (GenGel Excel 12.5/24 Amersham Pharmacia Biotech, Switzerland) and electrophoresis was performed in a temperature-controlled electrophoresis system (GenPhor Amersham

Pharmacia Biotech, Switzerland) at 6°C, with a first run at 600 V, 25 mA, 15 W for 10 min and then a second run at 600 V, 37 mA, 21 W for 2h30 (modified from Lagal et al., 2003). Gels were revealed by silver staining according to manufacturer's instruction (Plus One DNA Silver Staining Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Switzerland).

Amplicons of samples that displayed the most frequent undetermined SSCP profiles were sequenced by Synergene Biotech GmbH (Schlieren, Switzerland).

Statistical analysis

The Goodness-of-fit test was used to test the distribution of the various *ospC* groups. The chi-square Goodness-of-fit test with uniform distribution was used to compare the distribution of the genotypes in the two studied sites, and in the ticks fed on the various host species. The Chi-square test and the Fisher's test were used to compare the frequencies of the various genotypes between sites and between ticks fed on various host species. Statistical results were considered significant if the p-value was less than 0.05. All statistics were calculated with S-Plus 7.0 for Windows (Insightful, Reinach, Switzerland).

Results

Overall, 392 *B. afzelii* isolates obtained from questing ticks (n=132), moulted ticks that detached from captured rodents (n=123) and xenodiagnostic ticks (n=137) were tested by PCR and SSCP. Ten *ospC* groups were identified among these *B. afzelii* isolates (Table 1). Their distribution among isolates from questing ticks, ticks that detached from rodents and xenodiagnostic ticks differed significantly between the two studied sites (Fisher's test, questing ticks: $p < 0.001$, ticks from rodents: $p < 0.001$, xenodiagnostic ticks: $p < 0.001$) (Figure 1).

***B. afzelii ospC* groups isolated from questing ticks**

A total of 81 *B. afzelii* isolates from questing ticks collected at PR and 51 *B. afzelii* isolates from ticks collected at SW were tested by PCR and SSCP. Nine different *ospC* groups were detected among isolates from questing ticks collected at the two sites: six invasive (A1, A2, A3, A4, A5 and A6) and one non-invasive *ospC* group (VS461) as well as two groups, ME and YU, (pending accession numbers), with SSCP profiles that did not match with any published SSCP profiles (Table 1, Figure 1). Seven different *ospC* groups were detected in questing ticks at SW and eight at PR (Table 1). Their distribution at each site was not uniform (Goodness of fit test, PR: $p=0.001$ and SW: $p < 0.001$) and the distribution of the different

groups between sites was different (Fisher exact Test, $p < 0.001$). YU was the dominant group among questing ticks at PR (17/83, 20.5%) and was as frequent as A6 (17/83, 20.5%) sharing the highest values for this site but without being statistically more frequent than ME (13/83, 15.7%, Chi-square test, $p = 0.54$). At SW, YU (17/51, 33.3%) was dominant, but similarly was not more frequent than A1 (16/51, 31.4%) (Chi-square test, $p = 1$). Interestingly some *ospC* groups, like A2, A5, VS461 at PR and A4 at SW, were detected in questing ticks only.

***B. afzelii ospC* groups isolated from ticks feeding on rodents**

A total of 123 *B. afzelii* isolates obtained from moulted ticks that detached from 19 rodents belonging to three species (*A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *M. glareolus*) were tested and seven different *ospC* groups were identified among them (Table 1, Figure 1). At both sites, the distribution of the various *ospC* groups among isolates from ticks that fed on rodents was not uniform (Goodness of fit test, PR: $p < 0.001$ and SW: $p < 0.001$ for) and the distribution of the different groups between sites was different (Fisher exact Test, $p = 0$). Four *ospC* groups (A1, A6, ME, YU) were identified among 47 isolates from ticks that detached from seven rodents trapped at PR and seven *ospC* groups (A1, A2, A3, A4, A6, ME, YU) were detected among 76 isolates from ticks that engorged on 12 rodents at SW (Figure 1). ME was the dominant *ospC* group (25/48, 52.1%) among isolates from ticks that had fed on rodents at PR (Chi-square test, $p = 0.006$) whereas YU was the dominant group at SW (46/90, 51.1%) (Chi-square test, $p = 0.006$).

At both sites, we identified a higher mean number of *ospC* groups (PR: 2.25 and SW: 1.75) among isolates from larvae that were feeding on rodents infested by larvae and nymphs than from larvae feeding on rodents infested by larvae only (PR: 1.17 and SW: 1) Wilcoxon Mann Whitney test, PR: $p = 0.04$; SW: $p = 0.029$).

***B. afzelii ospC* groups isolated from xenodiagnostic ticks**

Xenodiagnosis performed on 19 rodents allowed the analysis of 137 *B. afzelii* isolates ($n = 42$ for PR and $n = 95$ for SW) by SSCP (Table 1). Seven *ospC* groups (A1, A2, A3, A4, A6, ME, YU) were identified (Table 1, Figure 1). At PR, five *ospC* groups (A1, A4, A6, ME, YU) were identified in isolates from xenodiagnostic ticks and YU was the dominant group (25/42, 59.5%, Chi-square test, $p = 0.008$) (Figure 1). Similarly, at SW five *ospC* groups were recorded among isolates from xenodiagnostic ticks (A1, A2, A3, A6, YU). A1 was dominant (47/99, 47.5%) followed by YU (33/99, 33.3%, Chi-square test, $p = 0.059$). The distribution of

ospC groups among xenodiagnostic tick isolates was not uniform (Goodness of fit test, PR: $p=0$ and ST: $p<0.001$) and differed between sites (Fisher exact Test, $p<0.001$).

Mixed infections by *B. afzelii ospC* groups.

Isolates containing more than one *ospC* groups were obtained from two questing ticks at PR (one with A5-YU, one with A5-A6) whereas none was identified at SW. Among isolates from ticks that detached from rodents, infections with more than one *ospC* groups were detected once at PR (A1-YU) and in 14 isolates from ticks collected from 4 rodents at SW (four with A1-A2, one with A3-YU, six with A6-YU, two with A1-YU and one with A8-YU). No infection by more than one *ospC* group was detected in isolates from xenodiagnostic ticks that fed on rodents from PR whereas more than one group was identified in four isolates from xenodiagnostic ticks collected from 2 rodents from SW (one with A1-YU, two with A2-YU and one with A6-YU) (Table 1). Overall, the *ospC* groups the most frequently involved in mixed infections were A6 (8/39, 20.5%), followed by A5 (2/11, 18.2%) – present at PR only-, and YU (15/149, 10.1%). At SW, some *ospC* groups showed high prevalence of mixed infection. In fact, at this site, 46% (6/13) of representatives of A2 were involved in mixed infections, followed by 35.3% of isolates of group A6 and 25% of isolates belonging to group YU. Conversely no representative of group ME (n=55) or group A4 (n=5) was involved in mixed infections.

Discussion

In this study, we focused our attention on the *ospC* gene diversity among *B. afzelii* isolates obtained from free-living *I. ricinus* and from *I. ricinus* that engorged on rodents at two different LB endemic areas in Switzerland. Questing ticks showed higher *ospC* group diversity at PR and SW compared to ticks that engorged on rodents and xenodiagnostic ticks, except for ticks that detached from rodents at SW. *ospC* is a highly antigenic protein that induces a strong immune response in vertebrate hosts (Wilske et al., 1993; Margolis et al., 1994; Stevenson and Barthold, 1994) that quickly eliminates *Borrelia* with certain antigenic *OspC* epitopes and according to Brisson et al. (2004) rodents can only be infected by some *B. burgdorferi* *ospC* groups. Therefore, it is not surprising that some *ospC* groups in the present study were not detected at the host level even if they were identified in questing ticks.

Several studies have demonstrated that the *ospC* genetic diversity within a population is almost equal to the worldwide diversity suggesting that geographic variations should not influence frequency distribution in *ospC* groups (Wang et al., 1999; Seinost et al., 1999).

However, in the present study, *ospC* group distribution among questing ticks, ticks that engorged on rodents and xenodiagnostic ticks differed between the two collection sites leading us to postulate that geographic parameters should be taken into account, some groups being maintained only in restricted geographical areas. Here, the two studied sites displayed different ecological conditions. In fact, at SW, rodents were infested by a higher mean number of ticks (10 larvae and 0.54 nymph versus 5.2 larvae and 0.2 nymph at PR) and more rodents displayed an infestation by co-feeding larvae and nymphs (28%) than at PR (11%) (Pérez et al., submitted).

Co-feeding transmission of *B. burgdorferi* sl between infected *I. ricinus* nymphs and uninfected larvae has been reported in the laboratory (Gern and Rais, 1996). However its role in nature is poorly documented. Pérez et al. (submitted) reported that larvae feeding simultaneously with nymphs were significantly more infected by *B. afzelii* than larvae feeding alone (for example, at PR 44% of larvae feeding with nymphs were infected and 18.8% of larvae feeding without nymphs), suggesting that co-feeding transmission enhanced *B. afzelii* infection prevalence in larvae. Here, we observed that at the intra-specific level, *B. afzelii* isolates obtained from the larvae that were feeding on the rodents simultaneously with nymphs displayed a higher diversity of *ospC* groups (mean number of *ospC* groups: 2.25 for PR and 1.75 for SW) than isolates from larvae feeding without nymphs (mean number of *ospC* groups: 1.17 for PR and 1 for SW). This shows that nymphs that were feeding simultaneously with larvae contributed to enhance the diversity of *ospC* groups in larvae through co-feeding transmission. Because co-feeding ticks were more frequently observed at SW the contribution of co-feeding transmission to *ospC* diversity is higher at this site. Similarly, we postulate that the higher diversity of *ospC* groups detected in moulted ticks that detached from rodents at SW (n=7) than at PR (n=4) compared to the diversity in questing ticks at SW and PR (n=7 and n=8, respectively) might be due to more frequent co-feeding transmission of *Borrelia* at SW. Mixed infections by two *ospC* groups were also more frequent among isolates from ticks that fed on rodents at SW (n= 18) where almost one third of rodents were infested by co-feeding ticks than at PR (n=1), a site where 11% of rodents only were infested by larvae and nymphs (Pérez et al. submitted). All this indicates that co-feeding transmission plays a role in the maintenance of *ospC* groups in nature. Interestingly, investigating *B. afzelii* diversity at the intra-specific level allowed reveal an important aspect of co-feeding transmission. This contrasts with results obtained at the species level showing that co-feeding transmission on rodents does not contribute to the presence of more than one *Borrelia* genospecies in questing ticks and does not participate in maintaining *Borrelia*

genospecies diversity although it enhances tick infection prevalence (Pérez et al. submitted). At the intra-specific level, the contribution of co-feeding transmission in the maintenance and in the diversity of *B. afzelii ospC* groups is probably associated with biological mechanisms specific to the various *ospC* groups that regulate host-tick-host transmissions. We observed that some *ospC* groups were more frequently involved in mixed infections than other groups. For example, 20.5% of representatives of A6 and 10.1% of YU at both sites were involved in mixed infections. Higher percentages were even observed at individual site, reaching 35.6% of representatives of A6 at SW involved in mixed infections, 18.2% of A5 at PR, 25% of YU at SW and even 46% of A2 at SW. Conversely, no representatives of *ospC* group ME or A4 was ever identified in mixed infections, suggesting that some groups better disseminate in the host and that some others are probably better transmitted through co-feeding transmission, or because they probably remain at the inoculation site for a longer period. Currently, the dynamic of transmission of *Borrelia* genospecies at the intra specific level between hosts and ticks and among ticks remains a poorly exploited field of research, particularly concerning *B. afzelii* and *B. garinii*.

The presence of rare *ospC* groups, like A2, A5, VS461 at PR and A4 at SW, that were detected in questing ticks only, could be explained by the sampling size or by different biological processes. One explanation could be that questing ticks have acquired these rare *ospC* groups while feeding on another host as for example squirrels (*Sciurus vulgaris*) that, like small mammals are hosts for immature ticks and reservoirs for *B. afzelii* (Humair et al., 1998; Morán Cadenas et al., 2007). In fact, two of these rare *ospC* groups, A5 and VS461, were identified at PR only, a site where squirrels have been reported as important hosts for ticks and for *B. afzelii* (Humair et al., 1998; Morán Cadenas et al., 2007). Therefore, it would be interesting to further investigate the competence of squirrels for the different *ospC* groups at this specific site. Another explanation for the presence of rare *ospC* groups might be found in the biology of the spirochetes. In fact, recently, several studies have demonstrated that genotypes of *B. burgdorferi* ss displayed different dynamics of host-to-tick transmission efficiencies and different dissemination patterns in *Peromyscus leucopus*, the main reservoir host in North America (Derdakova et al., 2004; Hanincová et al., 2008). As already mentioned, concerning *B. afzelii ospC* groups nothing is known on their host-to-tick transmission efficiencies and therefore possibly some *B. afzelii* genotypes do not persist long enough in rodents or are not efficiently transmitted from rodents to ticks leading to low prevalence of these groups in questing ticks as observed here. Those intraspecies variations have not yet been investigated for *B. afzelli ospC* populations but could influence *ospC* group

distribution among free-living, questing and xenodiagnostic ticks. Therefore studies on the infectivity of *B.afzelii ospC* groups for ticks and hosts are needed to better understand the natural situation observed at the two study sites. All the more so since such data (Derdakova et al., 2004; Hanincová et al., 2008) allowed Gatewood et al. (2009) link those differences in maintaining, transmission and dissemination between *B. burgdorferi* ss genotypes to climate and tick seasonality, showing that the climate-associated variability in the timing of host seeking ticks influenced heterogeneity and frequency of some *B. burgdorferi* ss genotypes.

The three pathogenic *B. burgdorferi* sl are preferentially associated with a given clinical presentation: *B. burgdorferi* ss with arthritis, *B. garinii* with neurological symptoms and *B. afzelii* with cutaneous syndromes (Assous et al., 1993; Canica et al., 1993; Van Dam et al., 1993). It is possible that the course of symptoms will differ for the various *ospC* groups within a single pathogenic genospecies, some groups, due to their invasiveness, may promote a more severe disease than others. *ospC* gene, according to its sequence can be used for epidemiological studies of tick isolates or EM isolates in order to evaluate the proportion of invasive strains and to predict infectivity and pathogenesis in humans in a geographic area (Seinost et al., 1999, Wang et al., 1999, Baranton et al., 2011, Lagal et al., 2003). Therefore, extensive geographical studies to determine the distribution and frequency of *ospC* groups into local areas should be encouraged.

This paper represents a step towards a better understanding of tick-rodent-*B. afzelii* relationship by showing the importance of co-feeding in maintaining and promoting *ospC* groups diversity. Further studies investigating the role of co-feeding transmission in the diversity of *B. burgdorferi* sl at the intraspecific level in other natural systems, like in the system involving *B. garinii* and several species of birds are encouraged.

Acknowledgements

We would like to thank V. Lagal and G. Baranton from the Institut Pasteur in Paris for their introduction to SSCP, for providing us with strains and for their precious advices. We also acknowledge J. Moret for the precious help with statistical analysis. Results presented here are part of the PhD thesis of one of the authors (DP). This work was financially supported by the Swiss National Science Foundation (grant No. 3200-100657).

References

- Assous, M.V., Postic, D., Paul, G., Nénot, P., Baranton, G., 1993. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 261-268.
- 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. *Res Microbiol.* 152,149-156.
- Baranton, G., De Martino, S.J., 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. In: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Eds), Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol. Basel, Karger*, 37, 1-17.
- Brisson D., Dykhuizen D.E., 2004. *ospC* diversity in *Borrelia burgdorferi*: different hosts are different niches. *Genetics.* 168, 713-722.
- Canica, MM, Nato, F, du Merle, L, Mazie, JC, Baranton, G, Postic, D., 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 441-448.
- Derdakova, M., Dudioak, V., Brei, B., Brownstein, J. S., Schwartz, I., Fish, D., 2004. Interaction and transmission of two *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in a tick-rodent maintenance system. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6783–6788.
- Gatewood A.G., Liebman, K.A., Vourc'h, G., Bunikis, J., Hamer, S.A., Cortinas R., Melton F., Cislo P., Kitron U., Tsao J., Barbour A.G., Fish D, Diuk-Wasser M.A., 2009. Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(8), 2476-2483.
- Gern, L., Rais, O., 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 33,189-192.
- Hanincová K., Ogden N.H, Diuk-Wasser M., Pappas C.J., Iyer R., Fish D., Schwartz I., Kurtenbach K., 2008. Fitness variation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in mice. *Appl. Environm. Microb.* 74,153-157.
- Humair, P.F., Gern, L., 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop.* 69, 213-227.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 41,5059-5065.

- Margolis, N., Hogan D., Cieplak W., Schwan T.G., Rosa, P.A., 1994. Homology between *Borrelia burgdorferi* OspC and members of the family of *Borrelia hermsii* variable major proteins. *Gene* 143, 105-110.
- Margos, G., Vollmer, S.A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., Kurtenbach, K., 2009. A new *Borrelia* species defined by multi locus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environm. Microbiol.* 75, 5410-5416.
- Montgomery, R.R., Malawista, S.E., Feen, K.J., Bockenstedt, L.K., 1996. Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. *J. Exp. Med.* 183, 261-269.
- Morán Cadenas, F., Rais, O., Humair, P.F., Douet, V., Moret, J., Gern, L., 2007. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J. Med. Entomol.* 44,1109-1117.
- 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. *J. Clin. Invest.* 113, 220-230.
- Pérez, D., Kneubühler, Y., Rais, O., Gern, L., Submitted. Seasonality of *Ixodes ricinus* ticks on vegetation and on rodents and *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies diversity in two Lyme borreliosis endemic areas in Switzerland. *Vector-Borne Zoon. Dis.*
- Piesman, J., Gern, L., 2004. Lyme Borreliosis in Europe and North America. *Parasitol.* 129,191-220.
- Postic, D., Assous, M.V., Grimont, P.A., Baranton, G., 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 743-752.
- Randolph, S.E., Storey, K., 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *J. Med. Entomol.* 36,741-748.
- Randolph, S.E., Miklisova, D., Lysy, J., Rogers, D.J., Labuda, M.,1999. Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis. *Parasitol.* 118,177-186.

- Schwan, T.G., Piesman, J., Golde, W.T., Dolan, M.C., Rosa, P.A., 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 2909-2913.
- Seinost, G., Dykhuizen, D.E., Dattwyler, R.J., Golde, W.T., Dunn, J.J., Wang, I.N., Wormser, G.P., Schriefer, M.E., Luft, B.J., 1999. Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. Infect. Immun. 67, 3518-3524.
- Stevenson, B., Barthold, S.W., 1994. Expression and sequence of outer surface protein C among North American isolates of *Borrelia burgdorferi*. FEMS Microbiol. Lett. 124,367-372.
- Strle, F. and Stanek, G., 2009. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. In: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Eds), Lyme borreliosis. Curr. Probl. Dermatol. Basel, Karger, 37, 1-17.
- Van Dam, A.P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B.M., Spanjaard, L., Ramselaar, A.C., Kramer, M.D., Dankert, J., 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin. Infect. Dis.17, 708-717.
- Wang, I.N., Dykhuizen, D.E., Quin, W.G., Dunn, J.J., Bosler, E.M., Luft, B.J., 1999. Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Genetics, 151, 15–30.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Jauris, S., Hofmann, A., Pradel, I., Soutschek, E., Schwab, E., Will, G., Wanner, G., 1993. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun., 61, 2182-2191.

Figure and table

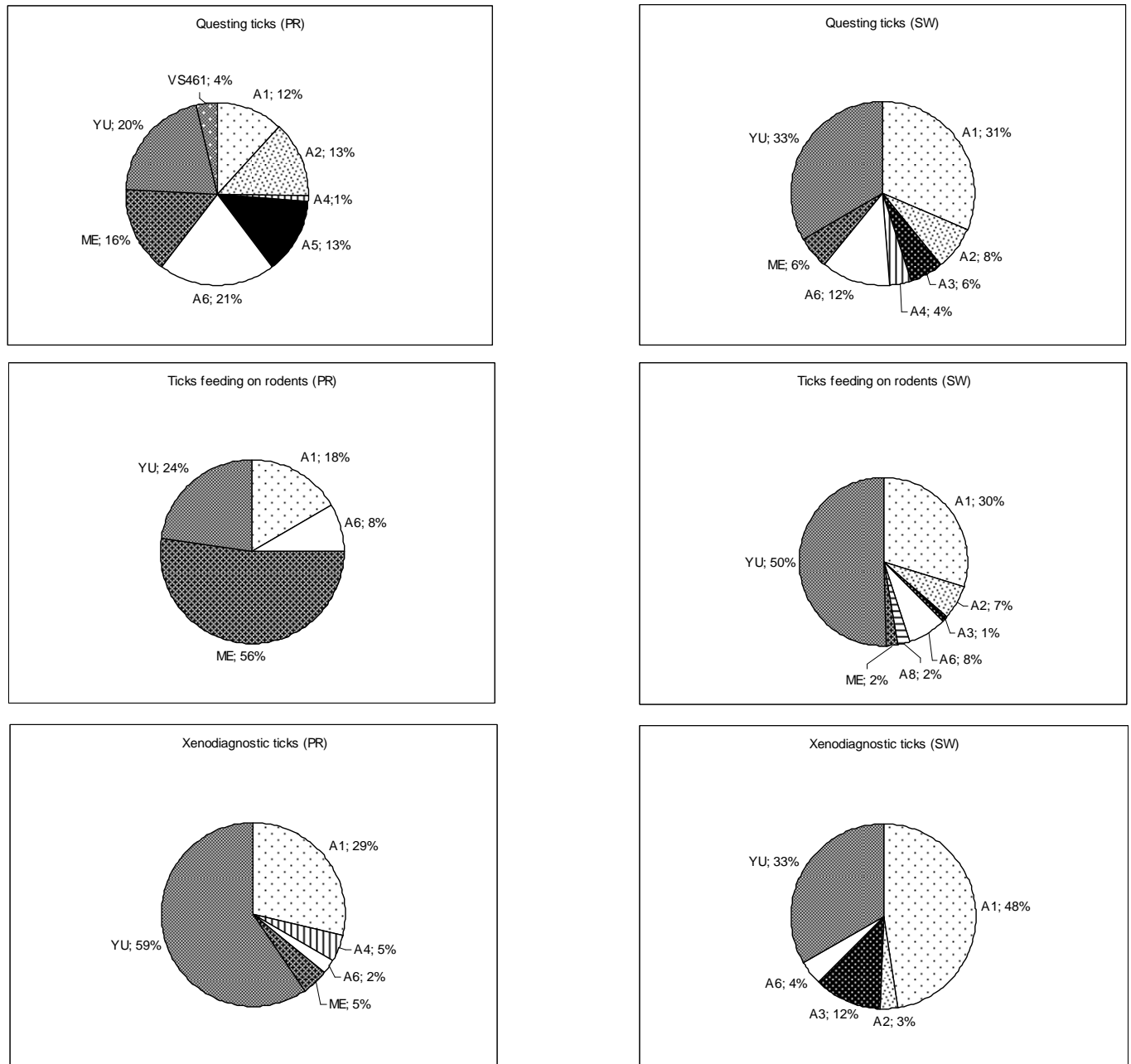


Figure 1: Distribution of the different *ospC* groups among *B. afzelii* isolates obtained from questing ticks, ticks feeding on rodents and xenodiagnostic ticks at Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW).

	<i>ospC</i> groups									
PR	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A8	ME	YU	VS461
Questing ticks (n=81 isolates*)	10	11		1	11	17		13	17	3
Ticks fed on rodent (n=47 isolates*, 7 rodents)	8 ²					4 ²		25 ²	11 ³	
Xenodiagnostic ticks (n=42 isolates, 7 rodents)	12 ²			2 ¹		1 ¹		2 ¹	25 ³	
SW										
Questing ticks (n=51 isolates)	16	4	3	2		6		3	17	
Ticks fed on rodents (n=76 isolates*, 12 rodents)	27 ⁷	6 ²	1 ¹			7 ²	2 ¹	2 ¹	46 ⁸	
Xenodiagnostic ticks (n=95 isolates*, 12 rodents)	47 ⁶	3 ¹	12 ²			4 ³			33 ⁶	

Table 1: Distribution of *ospC* groups in questing ticks, ticks fed on rodents and xenodiagnostic ticks at Portes-Rouges (PR) and Staatswald (SW). X^y: X: number of infected ticks; ^y number of rodents with infected ticks.

* some isolates contained more than one *ospC* groups, see text.

4. Discussion générale

Le point de départ de cette thèse a été la publication de différents travaux portant sur la diversité génétique du gène *ospC* chez *B. burgdorferi* sl (Seinost et al. 1999, Wang et al. 1999a, Baranton et al. 2001, Lagal et al. 2003, Earnhart et al. 2005). Ces études ont permis la classification de populations de borréliés en groupes *ospC* selon leur degré de similitude génétique. De plus, grâce à ces travaux, une corrélation entre le caractère invasif des isolats chez l'être humain et les groupes *ospC* a été établie. Néanmoins, les différentes recherches précédemment citées n'intégraient pas plusieurs problématiques intéressantes pour notre laboratoire, telles que par exemple l'influence des relations entre les hôtes-réservoirs et les tiques et notamment les tiques en co-feeding sur la diversité des groupes *ospC*. Afin de pouvoir intégrer ces différentes variables à notre recherche sur la diversité des groupes *ospC*, nous avons choisi de travailler sur deux populations de tiques *I. ricinus* dans deux sites, le SW et les PR. En plus des récoltes mensuelles de tiques libres, nous avons également piégé les micromammifères, hôtes de choix pour les borréliés, dans les sites considérés. En raison de sa spécificité pour les micromammifères (Humair et al. 1995, 1999, Hu et al. 1997, Richter et al. 1999, Piesman and Gern, 2004), la gènespèce *B. afzelii* a été choisie. Le modèle « micromammifère-*B. afzelii* » nous a également permis d'obtenir en laboratoire des résultats sur les tiques se nourrissant sur les rongeurs, les tiques de xénodiagnose et de mener à bien nos travaux sur le co-feeding. Nous possédions ainsi un cadre idéal pour observer la diversité des groupes *ospC* de *B. afzelii* dans 2 sites et cela à plusieurs niveaux (tiques libres, tiques se nourrissant sur les rongeurs, tiques de xénodiagnose et tiques se nourrissant par co-feeding).

La première partie de cette thèse a été consacrée à l'acquisition et au traitement du matériel et des données récoltées nous permettant ensuite une analyse en laboratoire de ce matériel. Néanmoins, les étapes de récolte et de laboratoire se sont superposées tout au long de cette thèse. Les techniques déjà éprouvées dans notre groupe de recherche telles que la collecte des tiques libres au drapeau, discutée plus en détails par la suite, la récolte des tiques s'étant nourries sur les rongeurs, la xénodiagnose, la culture, l'isolement et le génotypage des borréliés se sont révélés être des outils de travail bien adaptés à notre étude. A noter que la capture des rongeurs en utilisant des pièges tchèques a été efficace notamment au SW (SW : 0.3 rongeurs par piège et par nuit, PR : 0.11 rongeurs par piège et par nuit) avec peu de décès observés, même durant les mois froids d'hiver. La technique du drapeau s'est avérée adéquate

dans la récolte des tiques libres bien que cette approche présente des inconvénients : en effet, la végétation dense, les branches et ronces le long du site de prélèvement au SW ont représenté différents obstacles pour le drapeau qui n'a pu pénétrer les strates les plus inférieures de la végétation. Cette problématique déjà décrite par d'autres auteurs (Carroll et al. 1992 et Vassallo et al. 2000) peut déboucher sur une sous-estimation du nombre de tiques récoltées puisque celles se trouvant proches du sol ne peuvent être atteintes par le drapeau. Notons que ceci est particulièrement important lorsqu'il s'agit d'estimer la densité des tiques et plus encore lorsque la densité des tiques est comparée entre différents biotopes comme cela est le cas dans notre travail.

Le choix de la SSCP nous a semblé une évidence au moment de définir la technique nous permettant d'étudier la diversité du gène *ospC*, cette technique ayant permis dans les recherches précédemment citées la caractérisation de groupes *ospC* basés sur de très faibles variations nucléotidiques. La SSCP est un puissant outil de screening permettant de réunir facilement des isolats en groupes présentant le même profil de migration électrophorétique. Bien que cette technique soit simple d'utilisation et facilement implantable dans un laboratoire, différents inconvénients peuvent être relevés. L'interprétation visuelle des gels n'est pas particulièrement aisée, une même souche pouvant présenter de faibles différences de profils après migration sur deux gels différents. D'autre part, le traitement des groupes ne pouvant être rattachés à des profils déjà caractérisés s'est avéré fastidieux. En effet, réunir des groupes inconnus n'est pas aisé, en raison du manque de profils de référence. De plus, le besoin de recharger sur un même gel les groupes semblant présenter le même profil de migration s'est révélé par moment long et laborieux. L'utilisation d'un logiciel de traitement d'image pourrait peut-être réduire les inconvénients décrits ci-dessus. L'analyse génétique de *ospC* a été, au cours des dernières années, réalisée grâce à d'autres outils moléculaires tels que le « multilocus sequence typing » (MLST) (Qiu et al. 2004, Attie et al. 2006, Margos et al. 2008) ou le séquençage (Lin 2002, Earnhart 2005). D'autres groupes de recherches ont utilisé une technique actuellement implantée dans notre laboratoire, la « reverse line blot » (RLB) (Qiu et al. 2002, Brisson et al. 2004, Wormser et al. 2008). La RLB est une méthode efficace permettant le génotypage d'échantillons dont les allèles sont connus, le séquençage n'étant pas réalisable dans des échantillons multi-alléliques (Brisson et al. 2004). Qui et al. (2002) décrivent de façon claire et complète les avantages et les inconvénients de la SSCP et de la RLB dans le cadre de l'analyse génétique de *ospC*. La RLB est plus sensible et les résultats mieux interprétables que ceux obtenus par gel SSCP. Néanmoins, la SSCP présente l'avantage de détecter des variations mineures de séquences d'ADN sans besoin d'élaborer

des sondes spécifiques et représente un outil de screening intéressant à l'heure d'étudier la génétique d'une population dont la diversité allélique n'est pas connue. En résumé, les différentes méthodes précédemment citées sont complémentaires et adaptables selon le cadre de recherche, au génotypage de OspC.

Dans notre étude, la densité faible de nymphes en quête observée au SW (CTD 2003 : 4807, 2004 : 8403, 2005 : 3004) contraste avec le nombre élevé de stades immatures d'*I. ricinus* se nourrissant sur les rongeurs de ce site. En effet, les rongeurs du SW présentaient en moyenne 10 ± 21.6 larves et 0.54 ± 1.65 nymphes, soit le double de la moyenne observée pour les rongeurs des PR (5.2 ± 10.4 larves et 0.21 ± 0.72 nymphes) alors que ce site présentait des densités de nymphes libres plus importantes (CTD 2003 : 12054, 2004 : 9192, 2005 : 5144). Nous estimons donc que la faible densité de nymphes en quête au SW, contrastant avec un nombre important de tiques se nourrissant sur les rongeurs, peut être expliquée par le biais méthodologique introduit par le drapeau. Néanmoins, un comportement différencié des stades immatures d'*I. ricinus* (quête plus basse sur la végétation, quête de nuit) entre les deux sites pourrait également expliquer nos résultats.

Nous avons également observé un décalage entre l'activité saisonnière des tiques libres et des tiques se nourrissant sur les rongeurs et cela dans les deux sites (Pérez et al. submitted). En effet, des stades immatures d'*I. ricinus* ont fréquemment été détectés sur les micromammifères durant les mois de février à mars, même en été alors que le nombre de tiques libres récoltées au drapeau diminuait. Ces résultats laissent supposer que les tiques sont en fait actives durant une plus longue période que ce que pourrait laisser supposer la récolte au drapeau des tiques en quête. En plus du décalage observé lorsque l'on superpose les activités saisonnières des populations de tiques libres et celles se nourrissant sur les rongeurs, un décalage similaire est également observé en comparant l'activité saisonnière des tiques libres et la saisonnalité du nombre de piqûres chez l'Homme (Huegli et al. 2009 ; FOPH, 2010. En effet, chez l'Homme les piqûres sont plus importantes en été alors que la densité des tiques libres a très fortement diminué à cette période de l'année. Les valeurs de densité de tiques libres seules ne semblent donc pas être un paramètre suffisant pour déterminer sur une zone donnée le risque de contact entre Homme et tiques, les tiques étant, comme précédemment expliqué, actives durant une plus longue période que ce que pourrait laisser supposer la récolte au drapeau seule. Ceci est un point important à prendre en considération lors de campagnes de prévention.

Bien que le nombre de rongeurs infestés ait été similaire entre les 2 sites (PR : 59.4%, SW : 61%), les rongeurs infestés au SW portaient un nombre plus important de tiques, tant au

niveau des larves que des nymphes. Il est intéressant de noter que le genre *Apodemus* présentait des taux d'infestations plus élevés que ceux observés chez le genre *Myodes*, comme déjà décrit par d'autres auteurs (Humair et al. 1993, Kurtenbach et al. 1995, Gray et al. 1999, Michalik et al. 2005). Néanmoins, la xénodiagnose a démontré que le genre *Myodes* était le genre le plus infectieux pour les tiques et cela sur les deux sites, corroborant les résultats de Humair et al. (1999). Cependant, ces auteurs n'ont pas analysé les tiques après la mue. Or on sait que les tiques présentes sur le genre *Myodes* se nourrissent et muent de façon peu optimale (Dizij et Kurtenbach, 1995) à cause du développement d'une résistance immunitaire contre *I. ricinus*. Ainsi, nos résultats obtenus post-mue démontrent que la contribution du genre *Myodes* à l'infection des tiques semble malgré tout plus importante que précédemment proposée.

Le nombre faible de rongeurs piégés au PR et les taux d'infestations faibles nous laissent supposer que d'autres micromammifères devraient également être pris en compte sur ce site, tels que les écureuils (*S. vulgaris*). En effet, il est envisageable que les écureuils réquisitionnent une partie non négligeable du stock disponible des stades immatures d'*I. ricinus* qui ainsi ne pourront infester les micromammifères dans ce site. En effet, les travaux de Humair et al. 1998 et de Moràn Cadenas et al. 2007a ont démontré l'importance des écureuils comme hôtes d'*I. ricinus* dans ce site. Il est également intéressant de noter que *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss, des génoespèces connues comme associées aux écureuils, présentaient des prévalences plus élevées aux PR qu'au SW parmi les isolats provenant de nymphes en quête, laissant supposer qu'un nombre important de larves s'étaient nourries sur les genres *Myodes*, *Apodemus* et *Sciurus* aux PR. A noter également que nos travaux ont confirmé les différentes recherches décrivant l'association entre *B. afzelii* et les rongeurs *Myodes* spp et *Apodemus* spp ainsi que la transmission possible par ces derniers de *B. bavariensis* (Hu et al. 1997, 2001, Huegli et al. 2002).

Le nombre de rongeurs portant simultanément des nymphes et des larves était deux fois plus important au SW (28%) qu'aux PR (13%), décrivant donc un cadre de transmission de *B. afzelii* par co-feeding potentiellement plus favorable sur ce site. Notons que le SW est une région endémique de l'encéphalite à tiques (Wyler et Matile, 1984) et que la transmission par co-feeding du virus responsable joue un rôle important dans la persistance du virus de l'encéphalite à tiques dans un site (Randolph et al. 1999 ; Burri et al. 2011). Bien que le rôle du co-feeding dans la transmission de *B. burgdorferi* ait été démontré en laboratoire (Gern et Rais, 1996), son rôle et son importance dans la nature restent peu étudiés. Dans notre étude, nous avons montré que l'infestation des rongeurs par des tiques en co-feeding n'engendre pas

de diversité au niveau des géoespèces de borrelies observées dans les tiques en quête puisque seule *B. afzelii* a été détectée au niveau des larves et des nymphes se nourrissant simultanément sur les rongeurs (mis-à-part un isolat de *B. bavariensis* provenant d'une nymphe s'étant nourrie au stade larvaire sur un rongeur du SW). Le phénomène du co-feeding ne permet donc pas le maintien d'une diversité de *B. burgdorferi* si au niveau interspécifique. Par contre, il est intéressant de noter que le co-feeding est un promoteur de l'infection chez les larves se nourrissant sur *Apodemus* spp aux PR et sur *M. glareolus* au SW. Afin d'expliquer ces observations, il est important de considérer les profils d'infestation des rongeurs pour chaque site. Comme précédemment expliqué, les rongeurs du SW présentaient en moyenne 10 ± 21.6 larves et 0.54 ± 1.65 nymphes, soit le double de la moyenne observée pour les rongeurs des PR (5.2 ± 10.4 larves et 0.21 ± 0.72 nymphes), cette observation étant également valable pour le nombre de rongeurs infestés par au moins une nymphe (PR: 13%, SW: 29%). Un hôte s'infecte suite à la piqure d'une nymphe, elle-même infectée, et reste infectieux tout au long de sa vie (Gern et al. 1994), laissant supposer qu'au SW, un pourcentage important de rongeurs présentait des infections systémiques constantes au cours du temps. De plus, les rongeurs infectés de façon systémique transmettent avec plus d'efficacité les borrelies aux tiques se nourrissant sur eux lors d'infestations répétées par des stades immatures d'*I. ricinus* et cela particulièrement chez *Apodemus* spp (Gern et al. 1994). Cette constante infectiosité (d'*Apodemus* spp principalement) au SW masque l'effet de la transmission de *Borrelia* par co-feeding et ne permet pas d'observer son apport réel. L'effet du co-feeding peut par contre être mis en évidence aux PR (infestations des rongeurs par des larves et des nymphes plus faibles) puisque les larves se sont infectées en plus grand nombre après un repas sanguin simultanément avec une nymphe. La même observation a pu être réalisée chez les larves se nourrissant sur *M. glareolus* au SW. Cette espèce y est moins infestée par les tiques qu'*Apodemus* spp présente ainsi une moindre probabilité d'être infectée de manière systémique. Ceci permet d'observer l'effet de la transmission par co-feeding sur le taux d'infection des larves.

La diversité du gène *ospC* de *B. afzelii* a été observée parmi les isolats récoltés sur chaque site et cela dans trois populations différentes de tiques : les tiques libres, les tiques s'étant nourries sur des rongeurs et les tiques de xénodiagnose. La plus grande diversité de groupes *ospC* a été observée dans les tiques libres et les tiques s'étant nourries sur les rongeurs du SW (7 groupes). La protéine OspC est une protéine très immunogène qui provoque une forte réponse immunitaire chez l'hôte qui éliminera rapidement les borrelies présentant certains épitopes d'OspC (Wilske et al. 1993; Margolis et al. 1994, Stevenson and Barthold, 1994) : certains

groupes *ospC* seront donc éliminés et ne seront plus détectables au niveau des tiques s'étant nourries sur les rongeurs de la nature ou des tiques de xénodiagnose. Cette diminution de la diversité du nombre de groupes *ospC* est en accord avec les travaux réalisés par Brisson et al. en 2004 qui décrivaient la présence d'un nombre restreint de groupes *ospC* au niveau des hôtes vertébrés, la totalité des groupes *ospC* propres à une population de tiques n'étant détectée qu'au niveau des tiques libres.

Comment expliquer que les tiques s'étant nourries sur les rongeurs présentent une diversité similaire aux tiques libres au SW ? Nous estimons que le grand nombre de rongeurs présentant des infestations simultanées par les nymphes et les larves, permettant une transmission de borrelies par co-feeding, tel qu'observé au SW, est responsable du maintien d'un haut taux de diversité de groupes *ospC* dans les tiques récoltées sur les rongeurs dans ce site. En effet, nous postulons qu'au SW, certains groupes *ospC* sont transmis par co-feeding en absence d'infection systémique par le groupe *ospC* considéré. Cette situation n'est pas observée aux PR étant donné que les rongeurs dans ce site étaient moins fréquemment infestés à la fois par des larves et des nymphes et que donc, l'apport de la transmission par co-feeding à la diversité génétique chez les tiques de rongeurs dans ce site est moindre.

En plus de participer au maintien de la diversité des groupes *ospC* au SW, la transmission de *Borrelia* par co-feeding augmente le nombre de groupes *ospC* transmis aux tiques. En effet, cette observation faite dans les deux sites a été possible grâce à l'analyse du nombre de groupes *ospC* acquis par des larves se nourrissant seules ou simultanément avec une ou des nymphes. En situation de co-feeding avec une ou des nymphes, une larve se nourrissant sur un rongeur obtient en moyenne 2.25 groupes *ospC* pour les PR et 1.75 pour le SW, contre 1.17 groupes *ospC* pour les PR et 1 pour le SW dans le cas où la larve se nourrit sans nymphe. Comme mentionné précédemment, la transmission par co-feeding ne contribue pas au maintien de la diversité interspécifique au niveau des tiques libres et l'infection continue des rongeurs empêche d'évaluer son apport réel dans la prévalence d'infection des tiques. Par contre, l'analyse au niveau intra-spécifique nous permet de mettre en avant, de façon très intéressante et pour la première fois, l'importance de la contribution de la transmission par co-feeding au maintien de la diversité de *B. afzelii* dans la nature.

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés aux différences intra-spécifiques au sein d'une géoespèce de borrelies et de leurs implications sur la biologie des spirochètes, notamment sur des modèles murins (Derdakova et al. 2004, Hanincová et al. 2008). Ces travaux ont démontré de façon expérimentale que, au sein d'une géoespèce de borrelies, certaines souches ou groupes génotypiquement similaires semblaient être plus efficacement

transmis et perduraient plus longuement chez l'hôte considéré. Ces observations de laboratoire nous permettent de réfléchir sur l'impact de ces résultats dans un contexte naturel tel que la relation rongeurs-*I. ricinus* ayant servi de base à nos travaux. Certains génotypes ou groupes *ospC* pourraient donc produire des infections de courte durée. Bien que les résultats précédemment cités soient basés sur *B. burgdorferi* ss et d'autres types de modèles murins, ces observations nous permettent de postuler que dans le cadre de notre étude, certains groupes *ospC* chez *B. afzelii*, tels que les groupes rarement observés, perdurent peu de temps chez l'hôte et tendent avec le temps à apparaître à des fréquences faibles chez les tiques libres. Une deuxième explication à la présence de groupes *ospC* rares chez les tiques libres serait l'intervention d'autres hôtes que les rongeurs, comme les écureuils, hôtes compétents pour les stades immatures d'*I. ricinus* et réservoirs de *B. afzelii* (Humair et al. 1998, Morán Cadenas et al. 2007a).

Les résultats obtenus dans cette thèse représentent un pas supplémentaire dans la compréhension de la relation tique-*B. afzelii*-rongeur en démontrant l'apport du co-feeding dans le maintien et la promotion de certains groupes *ospC*. L'analyse d'autres modèles naturels (*B. garinii* et oiseaux par exemple) devrait être encouragée afin d'expliquer avec plus de poids le rôle du co-feeding sur le maintien et la diversité intraspécifique au sein d'une génoespèce de borrelie.

Comme déjà décrit dans ce manuscrit, de nombreux auteurs ont démontré les corrélations entre génotypes de *B. burgdorferi* sl présentant des séquences *ospC* différentes, invasivité et pathogénicité chez l'Homme (Seinost et al. 1999, Baranton et al. 2001, Lin et al. 2002, Lagal et al. 2003, Strle et al. 2011). Au sein d'une génoespèce de *B. burgdorferi* sl, les différences intraspécifiques au niveau du gène *ospC* provoquent chez l'Homme souffrant d'une BL, des symptômes plus ou moins graves. Une caractérisation précise des groupes *ospC* chez *B. burgdorferi* sl, tant au niveau de leur distribution, de leur transmission ou de leurs hôtes réservoirs permettrait d'évaluer la pathogenèse et le risque de contracter une BL sévère pour une population donnée sur un site décrit.

5. Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier ma directrice de thèse, Dr Lise Gern pour sa disponibilité, ses encouragements, sa patience et son soutien autant scientifique qu'humain dans la réalisation de cette thèse.

Un grand merci à Yvan Kneubühler, mon jeune « Padawan » qui s'est occupé de la partie « terrain » et de tout le travail de laboratoire durant la dernière année de cette thèse.

Un grand merci à Jacqueline Moret pour sa collaboration précieuse dans la réalisation des statistiques.

Merci à Olivier Rais et Delphine Hügli qui se sont occupés de la récolte des tiques libres, de leur mise en culture et du génotypage des *B. burgdorferi* sl pour le site PR.

Merci à Fatima Jouda pour son aide dans la réalisation des SSCP.

Merci à Dr Vanessa Lagal et au Dr Guy Baranton qui m'ont accueilli à l'Institut Pasteur de Paris et m'ont formé à la technique de la SSCP. Un grand merci également pour les isolats de *B. afzelii* ayant servi de contrôles.

Un grand merci à mon jury de thèse, Dr Lorenza Beati, Dr Lise Gern, Dr Guy Baranton et Prof. Bruno Betschart pour leur collaboration dans le cadre de cette thèse et leur disponibilité dans l'organisation de l'examen durant une période estivale peu propice.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues et le personnel de l'Université de Neuchâtel rencontrés lors de mes années d'études au sein de l'Institut de Biologie pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens également à remercier du fond du cœur mes parents et ma sœur pour leur encouragement constant et sans faille tout au long de mes études. Rien n'aurait été possible sans vous et jamais je ne pourrai assez vous remercier pour toute l'aide et le soutien apporté.

Os quiero !

Un grand merci à Delphine pour sa patience, ses encouragements et son engagement durant les moments difficiles liés à la réalisation de cette thèse et pour l'amour qu'elle me porte.

Un grand merci à toute la BRK pour les moments de décompression et votre précieuse et infaillible amitié ! Vous l'avez votre Dr Vacuno !

Un immense merci à Guido Mueller et la société Axonlab AG pour leur soutien, leurs encouragements et leur flexibilité dans l'adaptation de mon taux d'activité professionnelle durant la finalisation de cette thèse.

Merci à Céline pour son aide précieuse et ses conseils dans la mise-en-page de ce manuscrit.

6. Bibliographie

- Aeschlimann, A., 1972. *Ixodes ricinus*, Linneus, 1758 (Ixodoidea: Ixodidae). Preliminary study of the biology of the species in Switzerland. Acta Trop. 29, 321-340.
- Afzelius, A., 1910. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Arch. Dermatol. Syph. 101, 404-406.
- Aguilar, A., Roemer, G., Debenham, S., Binns, M., Garcelon, D., Wayne, R.K., 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 3490-3494.
- Antonara, S., Chafel, R.M., LaFrance, M., Coburn, J., 2007. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using *in vivo* phage display. Mol. Microbiol. 66, 262-276.
- Asbrink, E.; Hovmark, A., 1988. Early and late cutaneous manifestations in *Ixodes*-borne borreliosis (*Erythema migrans* borreliosis, Lyme borreliosis). Ann. NY. Acad. Sci. 539, 4-15.
- Assous, M.V., Postic, D., Paul, G., Nénot, P., Baranton, G., 1993. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12, 261-268.
- Attie, O., Bruno, J.F., Xu, Y., Qiu, D., Luft, B.J., Qiu, W.G., 2006. Co-evolution of the outer surface protein C gene (*ospC*) and intraspecific lineages of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in the northeastern United States. Infect. Genet. Evol. 7, 1-12.
- Balashov, Yu.S., 1972. Bloodsucking ticks (*Ixodoidea*) – vectors of diseases of man and animals. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 8, 163–376.
- Balmelli, T., Piffaretti, J.C., 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res. Microbiol. 146, 329-340.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., Grimont, P.A., 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 378-383.
- 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. Res. Microbiol. 152, 149-156.

- Baranton, G., De Martino, S.J., 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. In: Lyme borreliosis, (Ed.), Lipsker, D., Jaulhac, B. Curr. Probl. Dermatol. Basel, Karger, 37, 1-17.
- Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Péter, O., Aeschlimann, A., 1983. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. Curr. Microbiol. 8, 123–126.
- Barbour, A.G., 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57, 521–555.
- Barbour, A.G., Hayes, S.F., 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50, 381-400.
- Barbour, A.G., 1988. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. J. Clin. Microbiol. 26, 475-478.
- Barbour, A.G., Garon, C.F., 1988. The genes encoding major surface proteins of *Borrelia burgdorferi* are located on a plasmid. Ann. NY. Acad. Sci. 539, 144-153.
- Barthold S.W., 1999. Specificity of infection-induced immunity among *Borrelia burgdorferi* sensu lato species. Infect. Immun. 67, 36-42.
- Beier, D.R., 1993. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genetic mapping. Mamm. Genome. 4, 627-631.
- Bellet-Edimo, R., Betschart, B., Gern, L., 2005. Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat. 128, 117–125.
- Berger, B.W., Johnson, Kodner, R.C., Coleman, L., 1992. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from *Erythema migrans* lesions and perilesional skin. J. Clin. Microbiol. 30, 359-361.
- Bergström, S., 2002. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (Ed.), Gray, J.S., Kahl, O., Lane R.S., Stanek, G. CABI Publishing, New York, 47-89.
- Brandt, M.E., Riley, B.S., Radolf, J.D., Norgard, M.V., 1990. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. Infect. Immun. 4, 983–991.
- Brisson, D., Dykhuizen, D.E., 2004. *ospC* diversity in *Borrelia burgdorferi*: different hosts are different niches. Genetics. 168, 713-722.
- Buchwald, A., 1883. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut Atrophie. Arch. Derm. Syph. 15, 553-556.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P., 1982. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? Science. 216, 1317–1319.

- Burgdorfer, W., 1984. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J. Biol. Med.* 57, 515-520.
- Burri, C, Morán Cadenas, F, Douet, V, Moret, J, Gern, L., 2007. *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). *Vector-Borne Zoon. Dis.* 7, 50-58.
- Burri, C, Bastic, V, Maeder, G, Patalas, E, Gern, L., 2011. Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 48, 615-627.
- Calderaro, A., Dettori, G., Grillo, R., Plaisant, P., Amalfitano, G., Chezzi, C., 1998. Search for bacteriophages spontaneously occurring in cultures of haemolytic intestinal spirochetes of human and animal origin. *J. Basic Microbiol.* 38, 313-322.
- Camicas , J.L., Hervy, J.P., Adam, F., Morel, P.C., 1998. Les tiques du monde. Orstom éditions. Paris, 233 pp.
- Campbell, J.A., 1948. The life history and development of the sheep tick *Ixodes ricinus* Linnaeus in Scotland, under natural and controlled conditions. PhD thesis, University of Edinburgh.
- Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G., Postic, D., 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 441-448.
- Carroll, J.F., Schmidtman, E.T., 1992. Tick sweep: modification of the tick drag-flag method for sampling nymphs of the deer tick (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 29, 352-355.
- Carroll, J.A., Cordova, R.M., Garon, C.F., 2000. Identification of 11 pH-regulated genes in *Borrelia burgdorferi* localizing to linear plasmids. *Infect. Immun.* 68, 6677-6684.
- Casjens, S., Van Vugt, R., Tilly, K., Rosa, P.A., Stevenson, B., 1997. Homology throughout the multiple 32-kilobase circular plasmids present in Lyme disease spirochetes. *Bacteriol.* 179, 217-227.
- Casjens, S., 1999. Evolution of the linear DNA replicons of the *Borrelia* spirochetes. *Curr. Opinion in Microbiol.* 2, 529-534.
- Casjens, S., 2000. *Borrelia* genomes in the year 2000. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 401-410.
- Casjens, S.R., Fraser-Liggett, C.M., Mongodin, E.F., Qiu, W.G., Dunn, J.J., Luft, B.J., Schutzer, S.E., 2011. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J. Bacteriol.* 193, 1489-1490.
- Chu, C.Y., Liu, W., Jiang, B.G., Wang, D.M., Jiang, W.J., Zhao, Q.M., Zhang, P.H., Wang, Z.X., Tang, G.P., Yang, H., Cao, W.C., 2008. Novel genospecies of *Borrelia*

- burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. J. Clin. Microbiol. 46, 3130-3133.
- 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. Clin. Microbiol. 42, 1316-1318.
- Comstock, L.E., Fikrig, E., Shoberg, R.J., Flavell, R.A., Thomas, D.D., 1993. A monoclonal antibody to OspA inhibits association of *Borrelia burgdorferi* with human endothelial cells. Infect. Immun. 61, 423-431.
- Cordas, T., Aeschlimann, A., Morel, P.C., 1993. Ixodidae S Str (Schülze, 1937) in Switzerland-Morphological study by scanning electronic microscope. Acarol. 34, 21-46.
- Cotty, A., 1985. Clé de détermination des Ixodidae et Amblyomidae de Suisse. Université de Neuchâtel.
- Craft, J.E., Grodzicki, R.L., Sterne, A.C., 1984. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. Infec. Dis. 149, 789-795.
- Craine, N.G., Nuttall, P.A., Marriott, A.C., Randolph, S.E., 1997. Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochete, in the U.K. Folia Parasitol. 44, 155-160.
- De Boer, R., Hovius, K.E., Nohlmans, M.K., Gray, J.S., 1993. The woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) as a reservoir of tick-transmitted spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in The Netherlands. Zentralbl. Bakteriologie. 279, 404-416.
- Derdakova, M., Beati, L., Pet'Ko, B., Stanko, M., Fish, D., 2003. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. 69, 509-516.
- Derdakova, M., Dudioak, V., Brei, B., Brownstein, J.S., Schwartz, I., Fish, D., 2004. Interaction and transmission of two *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in a tick-rodent maintenance system. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6783-6788.
- De Silva, A.M., Fish, D., Burkot, T.R., Zhang, Y., Fikrig, E., 1997. OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks. Infect. Immun. 65, 3146-50.
- Dizij, A., Kurtenbach, K., 1995. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. Parasite Immunol. 17, 177-183.

- Dolan, M.C., Piesman, J., Schneider, B.S., Schriefer, M., Brandt, K., Zeidner, N.S., 2004. Comparison of disseminated and nondisseminated strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in mice naturally infected by tick bite. *Infect. Immun.* 72, 5262–5266.
- Dykhuizen, D.E., Polin, D.S., Dunn, J.J., Wilske, B., Preac-Mursic, V., Dattwyler, R.J., Luft, B.J., 1993. *Borrelia burgdorferi* is clonal: implications for taxonomy and vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10163-10167.
- Dykhuizen, D.E., Baranton, G., 2001. The implications of a low rate of horizontal transfer in *Borrelia*. *Trends Microbiol.* 9, 344-350.
- Earnhart, C.G., Buckles, E.L., Dumler, J.S., Marconi, R.T., 2005. Demonstration of OspC type diversity in invasive human Lyme disease isolates and identification of previously uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. *Infect. Immun.* 73, 7869-7877.
- Eggers, C.H., Samuels, D.S., 1999. Molecular evidence for a new bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 181, 7308-7313.
- Eicken, C., Sharma, C., Klabunde, T., Owens, R.T., Pikas, D.S., Hook, M., Sacchettini, J.C., 2001. Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 276, 10010-10015.
- Eisen, L., Lane, R.S., 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (Ed.), Gray, J.S., Kahl, O., Lane R.S., Stanek, G. CABI Publishing, New York, 91-115.
- Eisen, R.J., Eisen, L., Castro, M.C., Lane, R.S., 2003. Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in Northern California: effect of climatic conditions and habitat Type. *Environm. Entomol.* 32, 1010-1018.
- Ercolini, C., Ferrari, A., Fisichella, S., Guerci Lena, P., Mandola, M.L., Masoero, L., Mignone, W., Perruchon, M., Poggi, M., 1995. Serological survey of wild boar (*Sus scrofa*) in Liguria, Italy. *J. Mt. Ecol.* 3, 83-84.
- Farlow, J., Postic, D., Smith, K.L., Jay, Z., Baranton, G., Keim, P., 2002. Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 12, 4612-4618.
- FOPH, 2010. Federal Office for Public Health: La borréliose de Lyme: enquête Sentinella 2008/2009 – Le Centre national de référence pour les maladies transmises par les tiques se présente. Bulletin 2010; 22/10: 579-82 available from <http://www.bag.admin.ch/dokumentation/publikationen/01435/07914/index.html?lang=fr>.

- Franke, J., Moldenhauer, A., Hildebrandt, A., Dorna, W., 1999. Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*? *Ticks Tick-borne Dis.* 1, 109-112.
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter, J.C., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 390, 580-586.
- Fuchs, H., Wallich, R., Simon, M.M., Kramer, M.D., 1994. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 12594–12598.
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M. 1996. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol. Immunol.* 40, 877-881.
- Garin, C., Bujadoux, C., 1922. Paralyse par les tiques. *J. Med. Lyon.* 71, 765-767.
- Gatewood A.G., Liebman, K.A., Vourc'h, G., Bunikis, J., Hamer, S.A., Cortinas, R., Melton F., Cislo, P., Kitron, U., Tsao J., Barbour, A.G., Fish, D., Diuk-Wasser, M.A., 2009. Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2476–2483.
- Gern, L., Toutoungi, L.N., Hu, C.M., Aeschlimann, A., 1991. *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med. Vet. Entomol.* 5, 431-435.
- Gern, L., Siegenthaler, M., Hu, C.M., Leuba-Garcia, S., Humair, P.F., Moret, J., 1994. *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur. J. Epid.* 10, 75-80.
- Gern, L., Rais, O., 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 33, 189-192.
- Gern, L., Rouvinez, E., Toutoungi, L.N., Godfroid, E., 1997. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia. Parasitol.* 44, 309-314.

- Gern, L., Humair, P.F., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (Ed.), Gray, J.S., Kahl, O., Lane R.S., Stanek, G. CABI Publishing, New York, 149-174.
- Gern, L., 2009. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. In: Lyme borreliosis, (Ed.), Lipsker, D., Jaulhac, B. Curr. Probl. Dermatol. Basel, Karger, 37, 18-30.
- Gern, L., Douet, V., Lopez, Z., Rais, O., Morán Cadenas, F., 2010. Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. Ticks Tick-borne Dis. 1, 23–29.
- Gigandet, L., Stauffer, E., Douet, V., Rais, O., Moret, J., Gern, L., 2011. Prevalence of three zoonotic *Babesia* species in *Ixodes ricinus* (Linné, 1758) nymphs in a suburban forest in Switzerland. Ticks Tick-borne Dis. 11, 363-366.
- Gigon, F., 1985. Biologie d'*Ixodes ricinus* sur le Plateau Suisse-une contribution à l'écologie de ce vecteur. Thèse, Université de Neuchâtel.
- Gilmore, R.D., Jr., Piesman, J., 2000. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. Infect. Immun. 68, 411-414.
- Godfroid, E., Hu, C.M., Humair, P.F., Bollen, A., Gern, L., 2003. PCR-reverse line blot typing method underscores the genomic heterogeneity of *Borrelia valaisiana* species and suggests its potential involvement in Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 41, 3690-3698.
- Goettner, G., Gern, L., Schulte-Spechtel, U., Wilske, B., Fingerle, V., 2006. OspC of *B. afzelii* is crucial for dissemination in the vector as shown by transformation and complementation of a European OspC-deficient *B. afzelii* strain. Int. J. Med. Microbiol. 296S1, 122–124.
- Goldstein, S.F., Charon, N.W., Kreiling, J.A., 1994. *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 3433–3437.
- Grange, F., Wechsler, J., Guillaume, J.C., Tortel, J., Tortel, M.C., Audhuy, B., Jaulhac, B., Cerroni, L., 2002. *Borrelia burgdorferi* -associated lymphocytoma cutis simulating a primary cutaneous large B-cell lymphoma. J. Am. Acad. Dermatol. 47, 530–534.

- Gray J.S., Kahl, O., Janetzki-Mittman, C., Stein, J., Guy, E., 1994. Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. Exp. Appl. Acarol. 18, 485-491.
- Gray, J.S., Kirstein, F., Robertson, J., 1999. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. Exp. Appl. Acarol. 23, 717-729.
- 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. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 3142-3147.
- Gross, D.M., Forsthuber, T., Tary-Lehmann, M., Etling, C., Ito, K., Nagy, Z.A., Field, J.A., Steere, A.C., Huber, B.T., 1998. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. Science. 5377, 703-7066.
- Hanincová, K., Taragelova, V., Koci, J., Schäfer, S.M., Hails, R., Ullmann, A.J., Piesman, J., Labuda, M., Kurtenbach, K., 2003. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl. Environm. Microbiol. 69, 2825-2830.
- Hanincová, K., Ogden, N.H, Diuk-Wasser, M., Pappas, C.J., Iyer, R., Fish, D., Schwartz, I., Kurtenbach, K., 2008. Fitness variation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in mice. Appl. Environm. Microb. 74, 153-157.
- Hayashi, K., 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods Appl. 1, 34-38.
- Hayes, S.F., Burgdorfer, W., Barbour, A.G., 1983. Bacteriophage in the *Ixodes dammini* spirochete, etiological agent of Lyme disease. J. Bacteriol. 154, 1436-1439.
- Hedrick, P.W., Thomson, G., 1983. Evidence for balancing selection at HLA. Genetics. 104, 449-456.
- Hedrick, P.W., 1998. Balancing selection and MHC. Genetica. 104, 207-214.
- Herzer, P., 1991. Joint manifestations of Lyme borreliosis in Europe. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 77, 55-63.
- Hollström, E., 1951. Successful treatment of *erythema migrans* Afzelius. Acta. Derm. Venereol. 31, 235-243.
- Hu, C.M., Humair, P.F., Wallich, R., Gern, L., 1997. *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. Zentralbl. Bakteriologie. 285, 558-564.

- Hu, C.M., Wilske, B., Lobet, Y., Gern, L., 2001. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to Balb/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1169-1171.
- Hu, C.M., Cheminade, Y., Perret, J.L., Weynants, V., Lobet, Y., Gern, L., 2003. Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 421-426.
- Hubálek, Z., Halouzka, J., 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol. Res.* 84, 167-172.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4735-4737.
- Huegli, D., Moret, J., Rais, O., Moosmann, Y., Erard, P., Malinverni, R., Gern L., 2009. Tick bites in a Lyme borreliosis highly endemic area in Switzerland. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 155-160.
- Hulinska, D., Votypka, J., Kriz, B., Holinkova, N., Novakova, J., Hulinsky, V., 2007. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia* spp. isolated from *Ixodes ricinus* ticks by using electrophoretic chips and real-time polymerase chain reaction. *Folia Microbiol.* 52, 315-324.
- Humair, P.F., Turrian, N., Aeschlimann, A., Gern, L., 1993. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: The epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Paras.* 40, 65-70.
- Humair, P.F., Péter, O., Wallich, R., Gern, L., 1995. Strain variation in *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in the same swiss localities. *J. Med. Entomol.* 32, 433-438.
- Humair, P.F., Postic, D., Wallich, R., Gern, L., 1998a. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl. Bakteriol.* 287, 521-38.
- Humair, P.F., Gern, L., 1998b. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop.* 69, 213-227.
- Humair, P.F., Rais, O., Gern, L., 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and over wintering maintenance. *Parasitol.* 118, 33-42.

- Humphrey, S.B., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Zuerner, R.L., 1997. Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. J. Bacteriol. 179, 323-329.
- Jaenson, T.G., Tälleklint, L., 1992. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. J. Med. Entomol. 29, 813-817.
- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Fred, W.H., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 496-497.
- Jones, L.D., Davies, C.R., Steele, G.M., Nuttall, P.A., 1987. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. Science. 237, 775-777.
- Jones, K.L., Glickstein, L.J., Damle, N., Sikand, V.K., McHugh, G., Steere, A.C., 2006. *Borrelia burgdorferi* genetic markers and disseminated disease in patients with early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 44, 4407– 4413.
- Jones, K.L., McHugh, G.A., Glickstein, L.J., Steere, A.C., 2009. Analysis of *Borrelia burgdorferi* genotypes in patients with Lyme arthritis: high frequency of ribosomal RNA intergenic spacer type 1 strains in antibiotic-refractory arthritis. Arthritis Rheum. 60, 2174–2182.
- Jouda, F., Perret, J.L., Gern, L., 2004a. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. J. Med. Entomol. 41, 162-170.
- Jouda, F., Perret, J.L., Gern, L., 2004b. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. Vector-Borne Zoon. Dis. 4, 23-32.
- Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiol. Immunol. 843-848.
- Kalish, R.A., Leong, J.M., Steere, A.C., 1993. Association of treatment-resistant chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and antibody reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 61, 2774-2779.
- Kalish, R.A., Leong, J.M., Steere, A.C., 1995. Early and late antibody responses to full-length and truncated constructs of outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. Infect. Immun. 63, 2228-2235.
- Kelly, R., 1971. Cultivation of *Borrelia hermsii*. Science, 173, 443-444.

- Korenberg, E.I., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. In: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (Ed.), Gray, J.S., Kahl, O., Lane R.S., Stanek, G. CABI Publishing, New York, 175-200.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Luft, B.J., Koide, S., Dunn, J.J., Lawson, C.L., Swaminathan, S., 2001. Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. EMBO J. 20, 971-978.
- Kurtenbach, K., Kampen, H., Dizij, A., Arndt, S., Seitz, H.M., Schaible, U.E., Simon, M.M., 1995. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s. l. in German woodlands. J. Med. Entomol. 32, 807-817.
- Kurtenbach, K., Carey, D., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., Randolph, S.E., 1998a. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. Med. Entomol. 35, 77-81.
- Kurtenbach, K., Peacey, M., Rijpkema, S.G., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., Randolph, S.E., 1998b. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1169-1174.
- Kurtenbach K., Hanincová, K., Tsao, J.I., Margos, G., Fish, D., Ogden, N.H., 2006. Fundamental processes in the evolutionary of Lyme borreliosis. Nat. Rev. Microbiol. 4, 660-669.
- Labandeira-Rey, M., Seshu, J., Skare, J.T., 2003. The absence of linear plasmid 25 or 28-1 of *Borrelia burgdorferi* dramatically alters the kinetics of experimental infection via distinct mechanisms. Infect. Immun. 71, 4608-4613.
- Labuda, M., Kozuch, O., Zuffová, E., Elecková, E., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. Virol. 235, 138-143.
- 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. J. Clin. Microbiol. 41, 5059-5065.
- Lagal, V., Portnoi, D., Faure, G., Postic, D., Baranton, G., 2006. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. Microbes Infect. 8, 645-652.
- Lees, A.D., 1946. The water balance in *Ixodes ricinus* L. and certain other species of ticks. Parasitol. 37, 1-20.

- Lees, A.D., Milne, A., 1951. The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*I. ricinus* L.). *Parasitol.* 27, 123-144.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., Baranton, G., 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 921-925.
- Liveris, D., Gazumyan, A., Schwartz, I., 1995. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 589-595.
- Lin, T., James H. Oliver, J.H., Jr., Gao, L., 2002. Genetic diversity of the outer surface protein C gene of Southern *Borrelia* isolates and its possible epidemiological, clinical, and pathogenetic implications. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2572-2583.
- Lipschutz, B., 1914. Uber eine seltene Erythemaform (*erythema chronicum migrans*). *Arch. Dermatol. Syph.* 118, 349-356.
- Liveris, D., Wormser, G.P., Nowakowski, J., Nadelman, R., Bittker, S., Cooper, D., Varde, S., Moy, F.H., Forseter, G., Pavia, C.S., Schwartz, I., 1996. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1306-1309.
- Livey, I., Gibbs, C.P., Schuster, R., Dorner, F., 1995. Evidence for lateral transfer and recombination in OspC variation in Lyme disease *Borrelia*. *Mol. Microbiol.* 18, 257-269.
- MacLeod, J., 1935. *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. II. The factors governing survival and activity. *Parasitol.* 27, 123-144.
- Mammifères de la Suisse, 1995. Edité par la Commission des Mémoires de l'Académie Suisse des Sciences Naturelles. Ed. Birkhäuser. 268-278, 298-302.
- Maraspin, V., Ruzic-Sabljić, E., Strle, F., 2006. Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1177.
- Marconi, R.T., Samuels, D.S., Garon, C.F., 1993. Transcriptional analyses and mapping of the *ospC* gene in Lyme disease spirochetes. *Bacteriol.* 175, 926-932.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2427-2434.

- Margolis, N., Hogan, D., Cieplak, W., Schwan, T.G., Rosa, P.A., 1994. Homology between *Borrelia burgdorferi* OspC and members of the family of *Borrelia hermsii* variable major proteins. *Gene* 143, 105–110.
- Margos, G., Gatewood, A.G., Aanensen, D.M., Hanincová, K., Terekhova, D., Vollmer, S.A., Cornet, M., Piesman, J., Donaghy, M., Bormane, A., Hurn, M.A., Feil, E.J., Fish, D., Casjens, S., Wormser, G.P., Schwartz, I., Kurtenbach, K., 2008. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 8730-8735.
- Margos, G., Vollmer, S.A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., Kurtenbach, K., 2009. A new *Borrelia* species defined by multi locus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environm. Microbiol.* 75, 5410–5416.
- Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R.S., Cornet, M., Fingerle, V., Rudenko, N., Ogden, N., Aanensen, D.M., Fish, D., Piesman, J., 2010. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick-borne Dis.* 4, 151-158.
- Masters, E.J., Grigery, C.N., Masters, B.E., 2008. STARI or Masters Disease: Lone Star tick-vectored Lyme-like illness. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22, 361-376.
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Ezaki, T., 2001. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1817-1824.
- Masuzawa, T., 2004. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, in East Asia. *Jap. J. Infect. Dis.* 57, 229–235.
- Matuschka, F.R., Fischer, P., Heiler, M., Richter, D., Spielman, A., 1992. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J. Infect. Dis.* 165, 479-483.
- Matuschka, F.R., Eiffert, H., Ohlenbusch, A., Spielman, A., 1994. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. *J. Infect. Dis.* 170, 122-127.
- Matuschka, F.R., Allgöwer, R., Spielman, A., Richter, D., 1999. Characteristics of garden dormice that contribute to their capacity as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 707-711.
- Matuschka, F.R., Schinkel, T.W., Klug, B., Spielman, A., Richter, D., 2000. Relative incompetence of European rabbits for Lyme disease spirochetes. *Parasitol.* 121, 297-302.

- Michalik, J., Skotarczak, B., Skoracki, M., Wodecka, B., Sikora, B., Hofman, T., Rymaszewska, A., Sawczuk, M., 2005. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in yellow-necked mice and feeding *Ixodes ricinus* ticks in a forest habitat of west central Poland. J. Med. Entomol. 42, 850-856.
- Miyamoto, K., Masuzawa, T., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. In: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (Ed.), Gray, J.S., Kahl, O., Lane R.S., Stanek, G. CABI Publishing, New York, 201-222.
- Montgomery, R.R., Malawista, S.E., Feen, K.J., Bockenstedt, L.K., 1996. Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. J. Exp. Med. 183, 261–269.
- Morán Cadenas, F., Rais, O., Humair, P.F., Douet, V., Moret, J., Gern, L., 2007a. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). J. Med. Entomol. 44, 1109-1117.
- Morán Cadenas, F., Rais, O., Jouda, F., Douet, V., Humair, P.F., Moret, J., Gern, L., 2007b. Phenology of the tick *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north-and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. J. Med. Entomol. 44, 683-693.
- Motaleb, M.A., Corum, L., Bono, J.L., Elias, A.F., Rosa, P., Samuels, D.S., Charon, N.W., 2000. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 10899-10904.
- Needham, G., Teel, P., 1986. Water balance by ticks between bloodmeals. In: Morphology, physiology and behavioral biology of ticks, (Ed.), Sauer, J.R., Hair, J.A. Ellis Horwood Series in Acarology, Chichester. E. Horwood, Chichester, West Sussex, England, 100-151.
- Nefedova, V.V., Korenberg, E.I., Gorelova, N.B., Kovalevskii, Y.V., 2004. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. Folia Parasitol. 51, 67-71.
- Neubert, U., Schaller, M., Januschke, E., Stolz, W., Schmieger, H., 1993. Bacteriophages induced by ciprofloxacin in a *Borrelia burgdorferi* skin isolate. Zentralbl Bakteriol. 279, 307-315.

- Norris, S.J., Howell, J.K., Garza, S.A., Ferdows, M.S., Barbour, A.G., 1995. High and low infectivity phenotypes of clonal populations of *in vitro*-cultured *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63, 2206-2212.
- Olsén, B., Jaenson, T.G., Noppa, L., Bunikis, J., Bergström, S., 1993. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature.* 362, 340-342.
- Olsén, B., Jaenson, T.G., Bergström, S., 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3082-3087.
- Pal, U., De Silva, A.M., Montgomery, R.R., Fish, D.; Anguita, J., Anderson, J.F., Lobet, Y., Fikrig, E., 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J. Clin. Invest.* 106, 561-569.
- 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. *J. Clin. Invest.* 113, 220–230.
- Pérez, D., Kneubühler, Y., Rais, O., Gern, L., 2011. Seasonality of *Ixodes ricinus* ticks on vegetation and on rodents and *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies diversity in two Lyme borreliosis endemic areas in Switzerland. Submitted. *Vector-Borne Zoon. Dis.*
- Pérez, D., Kneubühler, Y., Rais, O., Jouda, F., Gern, L., 2011. *Borrelia afzelii* ospC genotype diversity in *Ixodes ricinus* questing ticks and ticks from rodents in two Lyme borreliosis endemic areas: contribution of co-feeding ticks. In press. *Ticks Tick-borne Dis.*
- Perret, J.L., Guigoz, E., Rais, O., Gern, L., 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.* 86, 554 -557.
- Perret, J.L., Rais, O., Gern, L., 2004. Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *J. Med. Entomol.* 41, 361-365.
- Picken, R.N., Cheng, Y., Strle, F., Picken, M.M., 1996. Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. *J. Infect. Dis.* 174, 1112-1115.
- Piesman, J., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North America. In: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (Ed.), Gray, J.S., Kahl, O., Lane R.S., Stanek, G. CABI Publishing, New York, 223-249.
- Piesman, J., Gern, L., 2004. Lyme Borreliosis in Europe and North America. *Parasitol.* 129, 191-220.

- Postic, D., Assous, M.V., Grimont, P.A., Baranton, G., 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 743–752.
- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Hendson, M., Baranton, G. 1998. Expanded diversity among Californian *borrelia* isolates and description of *Borrelia bissetii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.* 36, 3497-3504.
- Postic, D., Garnier, M., Baranton, G., 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.* 4, 263-271.
- Poupon, M.A., Lommano, E., Humair, P.F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, L., Gern, L., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 976-979.
- Priem, S., Burmester, G.R., Kamradt, T., Wolbart, K., Rittig, M.G., Krause, A., 1998. Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 57, 118-121.
- Qiu, W.G., Bosler, E.M., Campbell, J.R., Ugone, G.D., Wang, I.N., Luft, B.J., Dykhuizen, D.E., 1997. A population genetic study of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto from eastern Long Island, New York, suggested frequency-dependent selection, gene flow and host adaptation. *Hereditas.* 127, 203-216.
- Qiu, W.G., Dykhuizen, D.E., Acosta, M.S., Luft, B.J., 2002. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the northeastern United States. *Genetics.* 160, 833–849.
- Qiu, W.G., Schutzer, S.E., Bruno, J.F., Attie, O., Xu, Y., Dunn, J.J., Fraser, C.M., Casjens, S.R., Luft, B.J., 2004. Genetic exchange and plasmid transfers in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto revealed by three-way genome comparisons and multilocus sequence typing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 14150-14155.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F.S., Anderson, J.F., Koski, R.A., Fikrig, E., 2005. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature.* 436, 573-577.
- Randolph, S.E., Gern, L., Nuttall, P.A., 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today.* 12, 472-479.

- Randolph, S.E., Storey, K., 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): Implications for parasite transmission. *J. Med. Entomol.* 36, 741-748.
- Randolph, S.E., Miklisova, D., Lysy, J., Rogers, D.J., Labuda, M., 1999. Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis. *Parasitol.* 118, 177-186.
- Randolph, S.E., Green, R.M., Hoodless, A.N., Peacey, M.F., 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Intern J Parasitol.* 32, 979-989.
- Randolph, S.E., 2004 Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitol.* 129, Suppl: S37-65.
- Rauter, C., Hartung, T., 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7203-7216.
- Richter, D., Endepols, S., Ohlenbusch, A., Eiffert, H., Spielman, A., Matuschka, F.R., 1999. Genospecies diversity of Lyme disease spirochetes in rodent reservoirs. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 291-296.
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F.R., Baranton, G., 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 873-881.
- Rijpkema, S.G., Tazelaar, D.J., Molkenboer, M.J., Noordhoek, G.T., Plantinga, G., Schouls, L.M., Schellekens, J.F., 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with *Erythema migrans* and *Acrodermatitis chronica atrophicans*. *Clin. Microbiol. Infect.* 3, 109-116.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver, J.H., Jr., 2009. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3875-3880.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J.H., Jr., 2011. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolated from rodents and a tick from the south-eastern USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 381-383.

- Rudolph, D., Knülle, W., 1979. Mechanisms contributing to water balance in non-feeding ticks and their ecological implications. *Rec. Adv. Acarol.* 1, 375-383.
- Sadziene, A., Wilske, B., Ferdows, M.S., Barbour, A.G., 1993. The cryptic *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61, 2192-2195.
- Schwan, T.G., Burgdorfer, W., Garon, C.F., 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of *in vitro* cultivation. *Infect. Immun.* 56, 1831-1836.
- Schwan, T.G., Piesman, J., Golde, W.T., Dolan, M.C., Rosa, P.A., 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2909-2913.
- Schwan, T.G., Piesman, J., 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochetes, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. Clin. Microbiol.* 38, 382-388.
- Scrimanti, R.J., 1970. *Erythema chronicum migrans*. *Arch. Dermatol.* 102, 104-105.
- Seinost, G., Dykhuizen, D.E., Dattwyler, R.J., Golde, W.T., Dunn, J.J., Wang, I.-N., Wormser, G.P., Schriefer, M.E., Luft, B.J., 1999. Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. *Infect. Immun.* 67, 3518-3524.
- Seshu, J., Boylan, J.A., Gherardini, F.C., Skare, J.T., 2004. Dissolved oxygen levels alter gene expression and antigen profiles in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 72, 1580-1586.
- Shaw, D.J., Grenfell, B.T., Dobson, A.P., 1998. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitol.* 117, 597-610.
- Sinsky, R.J., Piesman, J., 1989. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1723-1727.
- Skuballa, J., Oehme, R., Hartelt, K., Petney, T., Bücher, T., Kimmig, P., Taraschewski, H., 2007. European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp., Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 952-953.
- Sonenshine, D., 1991. *Biology of Ticks*. Vol. 1. Oxford University Press, Inc.
- Stanek, G., Burger, I., Hirschl, A., Wewalka, G., Radda, A., 1986. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 263, 29-33.

- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Hardin, J.A., Ruddy, S., Askenase, W., Andiman, W.A., 1977. *Erythema chronicum migrans* and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 86, 7-17.
- Steere, A.C., 1989. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321, 586-596.
- Steere A.C., Sikand, V.K., Scoen, R.T., Nowakowski, J., 2003. Asymptomatic infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clin. Infect. Dis.* 37, 528-532.
- Stevenson, B., Barthold, S.W., 1994. Expression and sequence of outer surface protein C among North American isolates of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 367-372.
- Stevenson, B., Schwan, T.G., Rosa, P., 1995. Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme Disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63, 4535-4539.
- Stevenson, B., El-Hage, N., Hines, M.A., Miller, J.C., Babb, K., 2002. Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 70, 491-497.
- Stewart, P.E., Wang, X., Bueschel, D.M., Clifton, D.R., Grimm, D., Tilly, K., Carroll, J.A., Weis, J.J., Rosa, P.A., 2006. Delineating the requirement for the *Borrelia burgdorferi* virulence factor OspC in the mammalian host. *Infect. Immun.* 74, 3547-3553.
- Strle, F., Picken, R.N., Cheng, Y., Cimperman, J., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Ruzic-Sabljić, E., Picken, M.M., 1997. Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clin. Infect. Dis.* 2, 273-280.
- Strle, F., Stanek, G., 2009. Clinical manifestations of Lyme borreliosis. In: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Eds), *Lyme borreliosis*. *Curr. Probl. Dermatol.* Basel, Karger, 37, 1-17.
- Strle, K., Jones, K.L., Drouin, E.E., Li, X., Steere, A.C., 2011. *Borrelia burgdorferi* RST1 (OspC type A) genotype is associated with greater inflammation and more severe Lyme disease. *Am. J. Pathol.* 178, 2726-2739.
- Tälleklint, L., Jaenson, T.G., 1993. Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents. *J. Med. Entomol.* 30, 273-276.
- Tälleklint, L., Jaenson, T.G., 1994. Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *J. Med. Entomol.* 31, 880-886.

- Theisen, M., Borre, M., Mathiesen, M.J., Mikkelsen, B., Lebech, A.M., Hansen, K., 1995. Evolution of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein OspC. *J. Bacteriol.* 177, 3036-3044.
- Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., Vanraden, M.J., Stewart, P., Rosa, P., 2006. *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect. Immun.* 74, 3554-3564.
- Tilly, K., Bestor, A., Jewett, M.W., Rosa, P., 2007. Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. *Infect. Immun.* 75, 1517-1519.
- Tilly, K., Bestor, A., Dulebohn, D.P., Rosa, P.A., 2009. OspC-independent infection and dissemination by host-adapted *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 77, 2672-2682.
- van Dam, A.P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B.M., Spanjaard, L., Ramselaar, A.C., Kramer, M.D., Dankert, J., 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin. Infect. Dis.* 17, 708-717.
- Vassallo, M., Pichon, B., Cabaret, J., Figureau, C., Pérez-Eid, C., 1992. Methodology for sampling questing nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), the principal vector of Lyme disease in Europe. *J. Med. Entomol.* 29, 352-355.
- Vernier, P., Philippe, H., Samama, P., Mallet, J., 1993. Bioamine receptors : evolutionary and functional variations of a structural leitmotiv. In: *Comp. Mol. Neurobiol.* Edited by Y. Pichon: Birkhäuser, 297-337.
- von Lackum, K., Miller, J.C., Bykowski, T., Riley, S.P., Woodman, M.E., Brade, V., Kraiczky, P., Stevenson, B., Wallich, R., 2005. *Borrelia burgdorferi* regulates expression of complement regulator-acquiring surface protein 1 during the mammal-tick infection cycle. *Infect. Immun.* 73, 7398-7405.
- Wang, G., van Dam, A.P., Le Fleche, A., Postic, D., Péter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J.; 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 926-932.
- Wang, I.N., Dykhuizen, D.E., Quin, W.G., Dunn, J.J., Bosler, E.M., Luft, B.J., 1999a. Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Genetics*, 151, 15-30.

- Wang, G., van Dam, A.P., Schwartz, I., Dankert, J., 1999b. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 633–653.
- Wang, G., Ojaimi, C., Wu, H., Saksenberg, V., Iyer, R., Liveris, D., McClain, S.A., Wormser, G.P., Schwartz, I., 2002. Disease severity in a murine model of Lyme borreliosis is associated with the genotype of the infecting *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strain. *J. Infect. Dis.* 186, 782–791.
- Weber, K., 1985. Das Lymphozytom-eine Borreliose? *Z. Hautkr.* 69, 1585-1598.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Jauris, S., Hofmann, A., Pradel, I., Soutschek, E., Schwab, E., Will, G., Wanner, G., 1993. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61, 2182-2191.
- Wormser, G.P., Liveris, D., Nowakowski, J., Nadelman, R.B., Cavaliere, L.F., McKenna, D., Holmgren, D., Schwartz, I., 1999. Association of specific subtypes of *Borrelia burgdorferi* with hematogenous dissemination in early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 180, 720–725.
- 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. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1089-134.
- Wormser, G.P., Brisson, D., Liveris, D., Hanincová, K., Sandigursky, S., Nowakowski, J., Nadelman, R.B., Ludin, S., Schwartz, I., 2008. *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 198, 1358–1364.
- Wyler, R., Matile, H., 1984. Die Zeckenzephalitis in der Schweiz. PhD Thesis, Institut für Virologie der Universität Zürich, Switzerland. 88.
- Wyss, C., Johnson, R., 1996. *Borrelia burgdorferi* is an adenine and spermidine auxotroph. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 9, 181-185.
- Xu, Y., Kodner, C., Coleman, L., Johnson, R.C., 1996. Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infect. Immun.* 64, 3870-3876.

- Xu, Q., Mc Shan, K., Liang, F.T., 2007. Identification of an *ospC* operator critical for immune evasion of *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 64, 220-231.
- Xu, Q., McShan, K., Liang, F.T., 2008. Essential protective role attributed to the surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* against innate defences. *Mol. Microbiol.* 69, 15-29.
- Yang, X., Goldberg, M.S., Popova, T.G., Schoeler, G.B., Wikel, S.K., Hagman, K.E., Norgard, M.V., 2000. Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 37, 1470-1479.
- Zhang, J.R., Hardham, J.M., Barbour, A.G., Norris, S.J., 1997. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell.* 89, 275–285.
- Zhioua, E., Aeschlimann, A., Gern, L., 1994. Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 31, 763–766.
- Zhioua, E., Gern, L., Aeschlimann, A., Sauvain, M.J., van der Linden, S., Fahrner, H., 1998. Longitudinal study of Lyme borreliosis in a high risk population in Switzerland. *Parasite.* 1998, 383-386.

7. Annexes

7.1. Préparation du gel d'agarose 1%

- Peser 0,5 g d'agarose en poudre (Eurobio, Courtaboeuf, France).
- Diluer l'agarose dans 50 ml de TBE 0,5x.
- Chauffer le mélange au micro-ondes jusqu'à obtenir une solution claire.
- Ajouter 10 µl de bromure d'éthidium.
- Couler le gel et placer le peigne.
- Laisser polymériser 20-30 mn.
- Charger 10 µl de produit PCR avec 2 µl de bleu de bromophénol.
- Laisser migrer le gel dans du tampon TBE 0,5x ,45 mn à 100 volts.

De plus, 6 µl de marqueur de poids moléculaire (Biolabs, 100 bp DNA ladder, 1 µg/µl, Ipswich, Angleterre) dilué (50 ng/µl) dans du tampon de bleu de bromophénol ont été chargés pour chaque migration.

7.2. Préparation du gel pour RFLP

Le gel est composé d'une couche de concentration et d'une couche de séparation (acrylamide 16 %). Lors de chaque RFLP, deux gels ont été coulés simultanément entre des plaques de verre de 1,5 mm (Bio-Rad, Glass PLT W, 1,5 mm, 5 M-P3, Hercules, Etats-Unis).

7.2.1. Gel de séparation

- Acrylamide (19 :1) 40 % (National Diagnostics, AccuGel, Atlanta, Etats-Unis) : 8 ml.
- H₂O pure (Milli-Q, Millipore, Billerica, Etats-Unis) : 9.90 ml.
- TBE : 10x : 2 ml.
- Persulfate d'ammonium 10 % : 150 µl (sous hotte).
- TEMED (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis) : 17,5 µl. (sous hotte).

Couler rapidement les deux gels de séparation et remplir jusqu'au $\frac{3}{4}$ de la hauteur des plaques de verre. Ajouter 0.5 ml de butanol saturé afin de tasser le gel et laisser polymériser environ

20 mn. Retirer ensuite l'excédent de butanol, rincer à l'eau distillée et sécher l'intérieur des plaques grâce à un papier buvard tout en évitant de toucher la partie supérieure du gel.

Préparez ensuite le gel de concentration.

7.2.2. Gel de de concentration

- Acrylamide (19 :1) 40 % (National Diagnostics, AccuGel, Atlanta, Etats-Unis) : 1.3 ml.
- H₂O pure (Milli-Q, Millipore, Billerica, Etats-Unis): 7.6 ml.
- TBE 10x : 1 ml.
- Persulfate d'ammonium 10 % : 80 µl.
- TEMED (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis) : 24 µl.

Si le gel de séparation a bien polymérisé, couler la solution de concentration et placer les peignes de 1,5 mm entre les plaques.

Une fois la polymérisation terminée, 6 µl de tampon de charge 6x ont été ajoutés au produit total de la PCR digéré par *Mse I*. Le tout a ensuite été chargé sur le gel d'acrylamide et l'électrophorèse a été réalisée dans un tampon TBE 1x à 120 V pendant environ 1h30 mn.

A noter que pour chaque gel, une souche contrôle digérée (mélangée également avec 6 µl de tampon de charge 6x) ainsi que 10 µl de marqueur moléculaire (Roche, DNA Molecular Weight Marker V, 8-587 bp, Bâle, Suisse) ont été chargés.

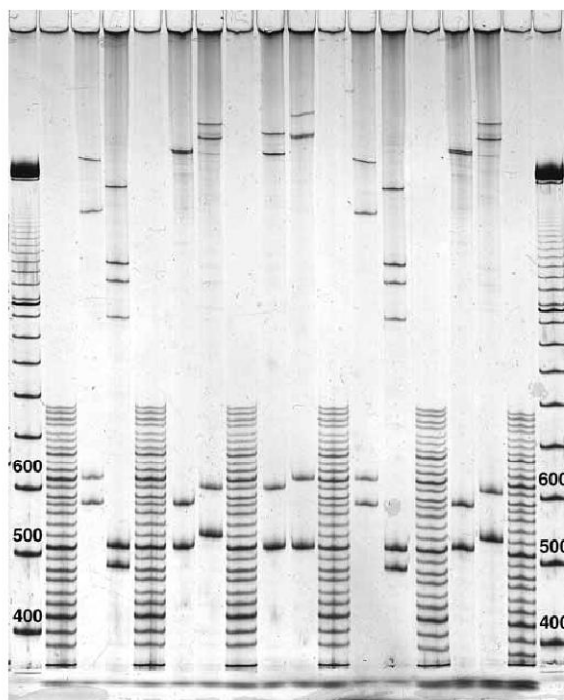
Une fois l'électrophorèse terminée, le gel a été coloré pendant 15 mn dans une cuve contenant 100 ml de TBE 1x et 5 µl de bromure d'éthidium. Le gel a ensuite été visualisé sous lampe UV et photographié comme précédemment décrit pour le gel d'agarose.

7.3. Protocole d'utilisation du kit GeneGel Exel

GE Healthcare

GeneGel Exel 12.5/24 Kit

Instructions



Contents

1. Introduction	5
2. Kit contents and technical data	5
2.1 Kit contents	6
3. Sample treatment	7
4. Electrophoresis	8
5. Detection	12
6. Trouble-shooting	13
7. Ordering information	14

1. Introduction

GeneGel™ Excel 12.5/24 Kit is designed for a variety of DNA electrophoresis techniques, such as RFLP, SSCP, VNTR, Heteroduplex analysis, ARDRA and RAPD*. Its separation range is 100–1500 base pairs (bp) with a resolution down to 8 bp in the 100–200 bp range. With the techniques SSCP and Heteroduplex analysis, the separation is based on the conformation of the fragments and thus the base sequence.

GeneGel Excel 12.5/24 Kit contains pre-cast, ready-to-use gels with pre-formed sample wells and high quality polyacrylamide strips containing all the buffer needed for electrophoresis. The buffer strips are supplied ready-to-use. The buffer strips together with the gel buffer, form a discontinuous buffer system specially designed for DNA separations.

GeneGel Excel 12.5/24 Kit is preferably run on GenePhor™ Electrophoresis Unit. Following separation, we recommend highly sensitive silver staining of the gels using Hoefer™ Automated Gel Stainer or GeneStain Automated Gel Stainer together with PlusOne DNA Silver Staining Kit. The resulting gel can be easily dried, allowing accurate evaluation and permanent documentation of the results.

- * RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
- SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism
- VNTR: Variable Number of Tandem Repeats
- ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
- RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA.

2. Kit contents and technical data



Fig 1. Gels and buffer strips.

2.1 Kit contents

GeneGel Excel 12.5/24 Kit contains instructions, 5 gels and 12 buffer strips (Fig 1). The gels and buffer strips are sufficient for 5 electrophoresis runs.

Designation	No. per kit
GeneGel Excel 12.5/24	5 gels
Anode buffer strip	6
Cathode buffer strip	6
Instructions	1

Technical data

<i>GeneGel Excel 12.5/24</i>	
Stacking gel	T=6%, C=3%
Separating gel	T=12.5%, C=2%
Sample wells	24
Loading capacity	6 µl
Gel dimensions	122 x 110 x 0.5 mm
Gel backing	Polyester film
Buffer system in ExcelGel™ 12.5/24	GeneGel Special buffer for DNA separations
<i>Buffer strips</i>	
Strip matrix	Polyacrylamide (T=12% C=3%)
Dimensions	Length 123 mm, height 4.5 mm
Buffer system in anode buffer strip	0.45 mol/l Tris/Acetate 4 g/l SDS and 0.05 g/L Orange G
Buffer system in cathode buffer strip	0.08 mol/l Tris, 0.80 mol/l Tricine and 6 g/l SDS
Shelf life	15 months (the expiry date is printed on each kit)
Storage	+4 °C to +8 °C

3. Sample treatment

Sample concentration

The sensitivity of the detection method used determines the minimum amount of sample that can be used.

General rule: The samples should be diluted with sample buffer to about 6 ng of DNA/band per 6 µl application volume when silver staining is used.

Sample solutions

0.5 mol/l Tris

1.5 g Tris

Dissolve and make up to 25 ml with distilled water.

0.1 mol/l EDTA

1.0 g EDTA disodium salt

Dissolve and make up to 25 ml with distilled water.

1% xylene cyanol

0.1 g xylene cyanol

Dissolve and make up to 10 ml with distilled water.

Sample buffer (total volume: 25 ml)

- 500 µl of 0.5 mol/l Tris solution (final concentration: 10 mmol/l)
- 250 µl of 0.1 mol/l EDTA solution (final concentration: 1 mmol/l)
- 1.25 ml of 1% xylene cyanol solution
- 10 mg of bromophenol blue
- 23 ml of distilled water

Mix thoroughly.

Adjust pH to 7.5 with acetic acid.

Storage: 1 month at +4 °C to +8 °C.

Denaturing solution (total volume: 25 ml)

- 23.75 ml of 99% formamide
- 1.25 ml of 1% xylene cyanol solution
- 10 mg of bromophenol blue

Storage: 12 months at +4 °C to +8 °C.

Note: If additional heteroduplex banding patterns are to be avoided, the samples can instead be denatured using 50 mmol/l NaOH and 1 mmol/l EDTA disodium salt at 50 °C for 10 minutes.

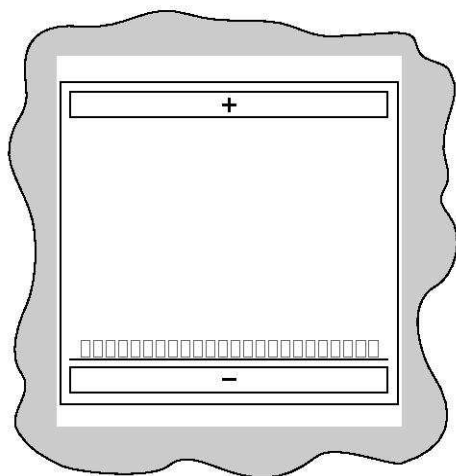


Fig 3. Position of the gel using the screen print as a guide.

Position the gel on the cooling plate. The sample wells should be on the cathode side (Fig 3). Use the screen print as a guide. Avoid trapping air bubbles under the gel.

Carefully remove the protective plastic film from the gel.

Apply the buffer strips

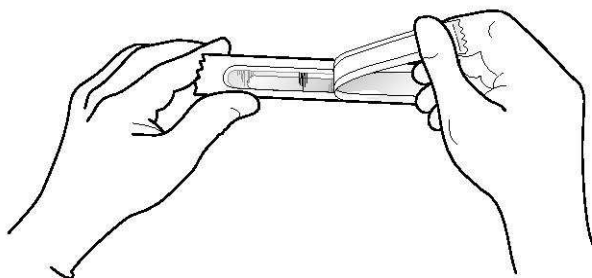


Fig 4. Opening of the buffer strip package.

Open one cathode and one anode buffer strip package. Carefully remove the aluminium foil by tearing, keeping the tearing edge in a perpendicular position with respect to the strip (Fig 4). Remember to use vinyl gloves when removing and applying the buffer strips. If the gloves stick to the buffer strips, moisten the gloves in distilled water.

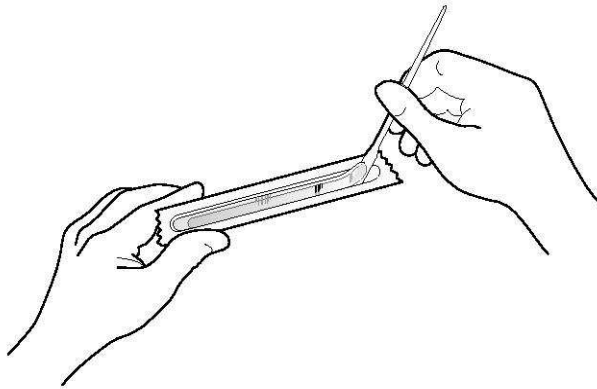


Fig 5. Use a spatula in order to remove the buffer strip from the tray.

Loosen the strips at one end of the package by putting a spatula between the strip and the plastic tray (Fig 5). Carefully take out the strip from the tray and hold it with both hands, about 1 cm away from the ends.

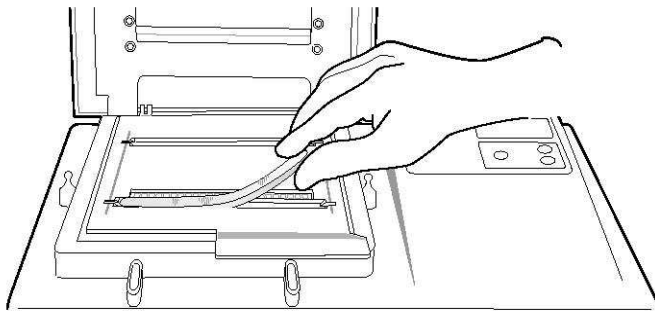


Fig 6. Sectional drawing showing the positioning of the buffer strips into the buffer strip holder.

Place the cathode and anode buffer strips in their respective buffer strip compartments in the buffer strip holder (Fig 6).

Note: The narrow side of the strip should be placed on the gel surface. (If the strip breaks, put the pieces together on the gel surface.)

Place the buffer strip holder in position as soon as possible to prevent the gel drying.

Applying the samples and running the separation

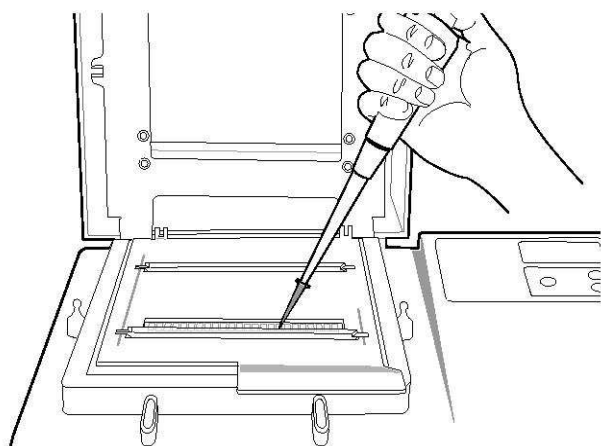


Fig 7. Applying samples using a micropipette.

Clean the electrodes with a wet tissue paper before (and after) each electrophoresis run. Lower the electrodes onto the buffer strips. Apply 6 μ l of sample using a micropipette (Fig 7).

Place the safety lid in position. Connect the power supply.

Table 1 gives recommended settings and running conditions.

Table 1. Recommended running conditions for one GeneGel Excel 12.5/24 run at 15 °C.

Voltage (V)	Current (mA)	Power (W)	Time (min)
600	25	15 About	80 min (until bromophenol blue reaches the anode buffer strip)

Running at higher temperatures

Prior to increasing the electrophoresis temperature above room temperature, the samples must be run into the gel and the gel surface must be covered with a plastic film (GeneGel Cover Sheets) to prevent it from drying during the separation.

Use silicone oil between the cooling plate and the gel.

First apply the samples at 20 °C and start the power supply. Allow the tracking dye in the samples to migrate out of the sample wells and to enter the gel. Then put the power supply in pause, open the lid and remove the buffer strips and buffer strip holder.

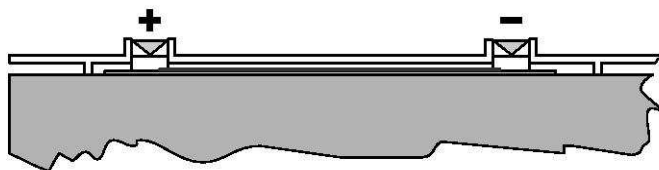


Fig. 8 . Position of GeneGel Cover Sheet on the surface of the gel.

Place a GeneGel Cover Sheet on the surface of the gel between the marks from the buffer strips. The film may protrude the strips 1 mm (Fig 8). Put the buffer strips and the buffer strip holder back in place and close the lid. Now set the higher running temperature.

Finally, when the correct running temperature is reached, continue the electrophoresis until the separation is complete.

5. Detection

For high sensitivity detection of 20–50 pg DNA per band, we recommend using Hoefer Automated Gel Stainer or GeneStain Automated Gel Stainer together with PlusOne DNA Silver Staining Kit, for automatic and reproducible staining. Full instructions are supplied with Hoefer Automated Gel Stainer, GeneStain Automated Gel Stainer and PlusOne DNA Silver Staining Kit.

6. Trouble-shooting

Symptom	Cause	Remedy
Inadequate separation, poor resolution, no polymorphism expressed. (SSCP: blurred bands)	Wrong temperature has been used. Different temperatures can result in different patterns. Important for SSCP.	Test for optimal temperatures. Run at 10 °C, 15 °C and 20 °C.
Smiling effect.	The gel has dried out too much.	<ol style="list-style-type: none">1. Use the gel directly after removal from the gel package.2. Apply only a very thin layer of kerosene with a tissue paper. Avoid trapping air bubbles under the gel.
Uneven front and band distribution.	Air bubbles under the buffer strip, uneven contact between gel edge and buffer strip.	Slide bent-tipped forceps along the centre of the strips.
Sample does not stay in the sample wells but spreads into the stacking gel.	Water condensation on the gel due to high humidity and/or high room temperature.	Apply the sample on the gel when the cooling plate is still at ambient temperature. Set the cooling temperature after sample application.*

* This remedy should not be applied for SSCP since it is important that the temperature is held constant. Instead dry the sample wells with filter paper.

7. Ordering information

Item	Code No.
GeneGel Excel 12.5/24 Kit	17-6000-14
GenePhor Electrophoresis Unit	18-1115-82
EPS 600 Power Supply	19-0600-00
Hoefler Automated Gel Stainer	80-6330-04
GeneStain Automatic Staining Unit	80-6330-42
PlusOne DNA Silver Staining Kit	17-6000-30
GeneGel Cover Sheets, Pack of 25	17-6000-49
DNA Marker (250 base pair ladder)	27-4006-01
DNA Marker (100 base pair ladder)	27-4001-01
DNA Marker (50 base pair ladder)	27-4005-01
PlusOne Bromophenol Blue, 10 g	17-1329-01
PlusOne Formamide, 250 ml	17-1320-01

www.gehealthcare.com

GE Healthcare Bio-Sciences AB
Björkgatan 30
751 84 Uppsala
Sweden

ExcelGel, GeneGel and GenePhor are trademarks of GE Healthcare companies. GE, imagination at work and GE monogram are trademarks of General Electric Company.

Hoefler is a trademark of Hoefler Inc.

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within GE Healthcare which supplies them. GE Healthcare reserves the right, subject to any regulatory and contractual approval, if required, to make changes in specifications and features shown herein, or discontinue the product described at any time without notice or obligation. Contact your local GE Healthcare representative for the most current information.

© 2006 General Electric Company – All rights reserved.

GE Healthcare Bio-Sciences AB, a General Electric Company.

GE Healthcare Europe GmbH
Munzinger Strasse 5, D-79111 Freiburg, Germany

GE Healthcare UK Ltd
Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire,
HP7 9NA, UK

GE Healthcare Bio-Sciences Corp
800 Centennial Avenue, P.O. Box 1327,
Piscataway, NJ 08855-1327, USA

GE Healthcare Bio-Sciences KK
Sanken Bldg. 3-25-1, Hyakunincho
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

Asia Pacific Tel: +852 2811 8693 Fax: +852 2811 5251 • Australasia Tel: +61 2 2899 0999 Fax: +61 2 9899 7511 • Austria Tel: 01 576 0616 25 Fax: 01 576 0616 27
• Belgium Tel: 0800 73 888 Fax: 03 272 1637 • Canada Tel: 1 800 463 5800 Fax: 1 800 567 1008 • Central, East, South East Europe Tel: +43 1 982 3826
Fax: +43 1 985 8327 • Denmark Tel: 45 16 2400 Fax: 45 16 2424 • Finland & Baltics Tel: +358 (0)9 512 3940 Fax: +358 (0)9 512 39 439 • France Tel: 0169 35 67 00
Fax: 0169 41 9677 • Germany Tel: 0761 4903 490 Fax: 0761 4903 405 • Italy Tel: 02 27322 1 Fax: 02 27302 212 Japan Tel: 81 3 5331 9336 Fax: 81 3 5331 9370
• Latin America Tel: +55 11 3933 7300 Fax: +55 11 3933 7304 • Middle East and Africa Tel: +30 210 9600 687 Fax: +30 210 9600 693 • Netherlands
Tel: 0165 580 410 Fax: 0165 580 401 • Norway Tel: 815 65 555 Fax: 815 65 666 • Portugal Tel: 21 417 7035 Fax: 21 417 3184 • Russia & other C.I.S. & N.I.S.
Tel: +7 (095) 232 0250,956 1137 Fax: +7 (095) 230 6377 • South East Asia Tel: 60 3 8024 2080 Fax: 60 3 8024 2090 • Spain Tel: 93 594 49 50 Fax: 93 594 49 55
• Sweden Tel: 018 612 1900 Fax: 018 612 1910 Switzerland Tel: 0848 802812 Fax: 0848 802813 • UK Tel: 0800 616 928 Fax: 0800 616 927
• USA Tel: +1 800 526 3593 Fax: +677 295 8102



GE imagination at work

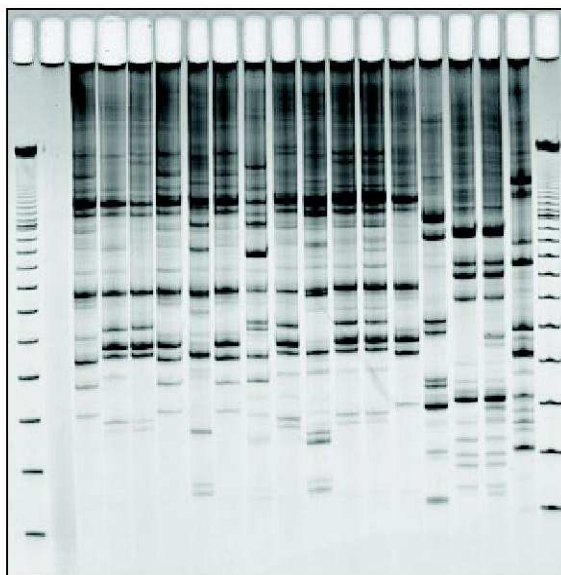
Instructions 71-5000-90 Edition AD 03/2006

Elanders Östervåla 2006

7.4. Protocole d'utilisation du kit DNA Silver Staining

A M E R S H A M B I O S C I E N C E S

DNA Silver Staining Kit



Instructions

70-5006-88

Edition AA



1. Introduction

PlusOne™ DNA Silver Staining Kit kit contains all essential components for staining of nucleic acids in polyacrylamide gels. To avoid transportation of large solution volumes, most of the solutions are in a 5× concentrated form, ready to use after a simple dilution. The high sensitivity of the visualization technique allows detection of nucleic acids down to 20–50 pg DNA/band. The method is reliable and reproducible and gives a gel with distinct bands on an essentially colourless background ready for drying and/or evaluation in about 1.5 h.

The formulation of the kit* minimizes production of toxic waste and optimizes sensitivity and robustness making the kit especially suitable for use in automatic staining equipment: Hoefer® Automated Gel Stainer and GeneStain™ Automated Gel Stainer. In addition, the kit also provides the method of choice for standard manual silver staining of DNA in polyacrylamide gels.

The kit performs best on 0.5–1.0 mm thick plastic-backed gels, or 0.75–1.5 mm thick un-backed gels.

The procedure described in this instruction is based upon the use of 125 ml solution per process step. Each kit contains material for 20 processes. When using the 125 ml tray in Hoefer Automated Gel Stainer or GeneStain Automated Gel Stainer this gives the following processing capacity for different gel sizes:

Gel Size	Gels/process	Gels/kit
7x8 cm (SE250 minigels)	1–4	80
14x16 (SE 600 type)	1	20
12.5x26 cm (ExcelGel, CleanGel)	1	20
11 x12.3 cm (GeneGel)	2	40

* Patent pending

Hoefer, ExcelGel, Multiphor, GeneStain, CleanGel, GeneGel, Red Rotor, PlusOne and its logo are registered trade marks owned by Amersham Biosciences.

2. Kit contents and technical data



Kit contents

DNA Silver Staining Kit (Code No. 17-6000-30) contains the following items:

Item	Composition	Quantity
Fixing solution, 5×	Benzene sulphonic acid; 3.0%w/v in 24%v/v ethanol	500 ml
Staining solution, 5×	Silver nitrate; 1.0%w/v Benzene sulphonic acid; 0.35%w/v	500 ml
Sodium carbonate solution, 5×	Sodium carbonate; 12.5%w/v	500 ml
Formaldehyde; 37%	Formaldehyde; 37%w/v in water	4 ml
Sodium thiosulphate; 2%	Sodium thiosulphate; 2%w/v in water	4 ml
Stopping & Preserving solution, 5×	Acetic acid; 5%v/v Sodium acetate; 25%w/v Glycerol; 50%v/v	500 ml
Instructions	Booklet	1
Short instructions	Laminated sheet	1

When used in Hoefer Automated Gel Stainer or GeneStain Automated Gel Stainer the Kit content is sufficient for staining 20 standard size gels (14×16 cm or 12×24 cm) or 80 minigels (7×8 cm).

Technical data

Sensitivity:	20-50pg DNA per band
Usage temperature:	+20 to +27 °C
Storage:	+10 to +30 °C
Shelf life:	1 year at recommended storage conditions

Precautions: The chemicals in this kit should not be discarded via public waste water systems. Please dispose of these chemicals properly. We recommend that you collect and dispose of the silver containing waste separately. Consult your local regulations for more information. Read the warning text on the label of each bottle.

3. Protocol and procedure for silver staining

General information

This protocol is optimized for precast GeneGel, CleanGel and ExcelGel media from Amersham Biosciences, but will also work on most other gel types.

When used in Hoefer Automated Gel Stainer or GeneStain Automated Gel Stainer instruments the protocol will provide excellent results for gels in sizes from 7×8 cm up to 18×24,5 cm (ExcelGel SDS 12-14) in thicknesses of 0.75–1.5 mm for unbacked gels and 0.5–1.0 mm plastic-backed gels. Gels outside of these dimensions may require modified procedures.

All procedures are based on all reagents used at a temperature of +20 to +27 °C. Using reagents outside this temperature range will require modification of development times for optimal results. If the temperature is below 20 °C, extend the development time to 8–10 min. If the temperature is above 27 °C, reduce development time to 4 min.

For manual use we recommend gentle shaking in all steps on an automated shaker like Red Rotor Orbital Shaker equipped with Staining Tray 1 or Staining Tray 2 (see Recommended Equipment and Accessories, p. 10). These trays have polished surfaces of SIS 2332 grade stainless steel that do not interfere with the silver staining technique.

For maximal convenience and reliability we recommend automated staining in programmable Hoefer Automated Gel Stainer or GeneStain Automated Gel Stainer with preset programs.

Chemicals required:

- Chemicals included in the DNA Silver Staining Kit, plus:
- Ethanol (24%) (Prepare in advance)
- Distilled or deionized water

Equipment required:

- Five Reagent vessels taking 125 ml solution
- Measuring cylinders; 25 and 100 ml
- Micropipette for delivering 125 ml
- Automated staining equipment or

Staining tray (preferably stainless steel) and rotating table for manual staining

- Bottles

Reagent preparation

For staining volumes of 125 ml, prepare the 5 reagents listed below in clean glass bottles. Adjust component volumes appropriately if staining in volumes other than 125 ml.

Reagent	Components required from Kit	Other components
1. Fixing solution	25 ml Fixing solution, 5×	100 ml 24% ethanol
2. Staining solution	25 ml Staining solution, 5×	100 ml water
3. Developing solution	25 ml Sodium carbonate, 5×	
	125 μ l Sodium thiosulphate	
	125 μ l Formaldehyde*	100 ml of water
4. Stopping & Preserving solution	25 ml Stopping & Preserving solution, 5×	100 ml water
5. Water for washing		> 125 ml

* **IMPORTANT:** The Developing solution with formaldehyde is very unstable and should be prepared immediately before use. When performing the staining in any of the automated gel stainers, it should be prepared as the last step before starting the staining process.

Please also note that the cloudy precipitate of polymerised formaldehyde that sometimes develops during normal storage does not affect staining performance.

Automated staining procedure:

Automated staining in Hoefer Automated Gelstainer or GeneStain Automated Gel Stainer.

1. Attach the staining reagent bottles to IN-ports and the waste bottles to OUT-ports according to the Table below. Make sure the suction pipes penetrate down to the bottom of the vessels to allow all reagent solution to be taken up.
2. Make sure all solutions are at the proper temperature (+20 to +27 °C).
3. Position the gel(s) in the staining tray with or without the aid of the magnets.
4. Choose the pre-programmed DNA Silver Staining protocol.
5. Start the protocol
6. Retrieve the stained gel after ca 1.5 h

Table 1: Hoefer Automated GelStainer Protocol #1: DNA Silver Stain

Step	Solution	IN-port	OUT-port	Processing step time
1	Fixing solution	1	8	30 min
2	Silver solution	3	9	30 min
3	Water (washing)	0	7	1 min
4	Developing solution	4	8	6 min
5	Stopping & Preserving solution	5	7	30 min & hold solution

Table 2: GeneStain Automated GelStainer: DNA Silver Staining protocol

Step	Solution	IN-port	OUT-port	Processing step time
1	Fixing solution	1	5	30 min
2	Silver solution	2	6	30 min
3	Water (washing)	0	7	1 min
4	Developing solution	3	8	6 min
5	Stopping & Preserving solution	4	9	30 min & hold solution

Manual staining procedure

1. Make sure that the temperature of the reagents are within the range of +20 to +27 °C. If not, adjust the temperature or modify the reaction times for the corresponding steps (see "General Information" p.5).
2. Use gloves and perform all steps with gentle shaking of the staining tray.
3. Be careful that the gel is evenly wetted with the entire solution volume during all process steps.

Procedure:

	Process step	Procedure	Time
1	Fixing	Soak the gel in fix solution	30 min (or longer, over night OK)
2	Silver impregnation	Replace fixing solution with silver solution. Incubate	30 min
3	Washing	Pour off silver solution. Add water	1 min
4	Development	Pour off water Add Developing solution	6 min
5	Stopping & preserving	Soak gel in Stopping & Preserving solution	At least 30 min (Over night OK)

4. Troubleshooting guide

This Troubleshooting Guide is primarily for manual staining but most parts are also relevant for automated staining. For more comprehensive information on staining, please consult Protocol Guide 80-6343-34 "Automated Silver and Coomassie Staining of Polyacrylamide Gels".

For problems when using automated staining, please also consult the User Manual for the relevant instrument.

Problem	Cause	Remedy
Bands do not develop	Temperature of reagent solution too low	Keep temperature of solution between 20 and 27 °C
	Gel not washed thoroughly enough	Repeat the washing procedure
	Did not fix properly	Check fixing solution or fixing properties of your particular nucleic acid(s)
	Protein samples containing reducing agents have been run on the gel(s)	Run and stain DNA samples separately
Background is excessively dark (over-developed)	Too long exposure to developing solution	Use no more than 10–15 minutes for development of bands at 21 to 25 °C
	Metal from magnets contaminating reagent solutions (Automated staining only)	Exchange magnets with damaged coating
	Water impure	Use distilled or deionized water
Silver mirror reaction	Insufficient washing with water	Extend the time of washing after staining
	Dirty tray	Replace the chamber for development with a new clean one
	Insufficient shaking	During the development step, shake the tray sufficiently to prevent the gel from sticking to the bottom of the tray
Gels come loose from backing	Gels left in fix for too long	Reduce fixing time: A minimum of 30 min required. Over night fixing usually OK.

5. Recommended equipment and accessories

Product		Code No.
Hoefer, Automated Gel Stainer,	230 V	80-6330-04
	, 115 V	80-6330-23
GeneStain Automated Gel Stainer,	230 V	80-6330-42
	, 115 V	80-6344-67
Red Rotor Orbital Shaker, 25X35 cm	115 V	80-6096-91
	230 V	80-6097-10
- " - , 50X50 cm	115 V	80-6098-05
	230 V	80-6098-24
Staining Tray 1 with lid and removable gel holder (60x150x300 mm)		18-1018-08
Staining Tray 2 with lid (60x260x320 mm)		18-1018-09
Cellophane Sheets		80-1129-38

6. Precast gels and related products

GenePhor gel media kits	Code No.
GeneGel Excel 12.5/24 Kit	17-6000-14
GeneGel Clean 15/24 Kit	17-6000-13
Multiphor II gel media kits	
ExcelGel DNA Analysis Kit	17-1198-07
DNA Fragment Analysis Kit	17-1198-06
CleanGel™ media for Multiphor II	
CleanGel 25S	18-1031-54
CleanGel 36S	18-1031-55
CleanGel 48S	18-1031-56
GelPool for rehydrating the gel	18-1031-58
PaperPool for soaking electrode strips	18-1031-59

DNA Molecular weight markers

Product name	Size range (bp)	Code No
øX174-Hinc II digest	79–1,049	27-4040-01
øX174-Hae III digest	72–1,342	27-4044-01
λ-Hind III digest	2,027–23,130	27-4048-01
λ-Hind III/øX174-Hinc II digest	79–23,130	27-4052-01
λ-Hind III/øX174-Hae III digest	72–23,130	27-4054-01
DRigest III (lyophilized)	72–23,130	27-4060-01

7. Literature

Protocol Guide "Automated Silver and Coomassie Straining of Polyacrylamide Gels" Code No 80-6343-34.

7.5. Nouveaux groupes ospC séquencés

7.5.1. Séquences de ME (230 pb)

5' :AGATAACAATAATGGTTTAAGTGCTAATGCGAATTTAAACACCTCATTGTTAGCAGGAGCCTATGCAATAT
CAACTCTAATAACACAAAAATTAAGTGATTGAATTCAGAAGGATTAAGGAAAAAATTGAAAAGGCTAAGA
ACGCTTCTGCAGCATTTACTAATAAATTAAAAAATAGTCATGCAGAGCTTGGAGTGGCGGGGAATGGTGCTAC
TACTGATGAAAATG : 3'

```
ME  AGATAACAATAATGGTTTAAGTGCTAATGCGAATTTAAACACCTCATTGTTAGCAGGAG
    60      80      100
ME  CCTATGCAATATCAACTCTAATAACACAAAAATTAAGTGATTGAATTCAGAAGGATTA
    120     140     160
ME  AAGGAAAAAATTGAAAAGGCTAAGAACGCTTCTGCAGCATTTACTAATAAATTAAAAA
    180     200     220
ME  TAGTCATGCAGAGCTTGGAGTGGCGGGGAATGGTGCTACTACTGATGAAAATG
```

7.5.2. Séquences de YU (230 pb)

5' :AGACCAAATGGTTTAGCTGCTGATGCGGCTGATCACAACACCTCATTGTTAGCAGGAGCCTATGCAATAT
CAGCCCTAATAAAACAAAAATTAGATGTATTAAGGTCCAGAAGGGTTAAATAAAGAAATTGATGAGGCTA
AGAAATGTTCTGATGCATTTACTAATAAATTAAAAAATAGTCATGCAGAGCTTGGGGCGGCGAATGGTGCTAC
TACTGCTGATAATG : 3'

```
YU  AGACCAAATGGTTTAGCTGCTGATGCGGCTGATCACAACACCTCATTGTTAGCAGGAG
    60      80      100
YU  CCTATGCAATATCAGCCCTAATAAAACAAAAATTAGATGTATTAAGGTCCAGAAGGG
    120     140     160
YU  TTAAATAAAGAAATTGATGAGGCTAAGAAATGTTCTGATGCATTTACTAATAAATTA
    180     200     220
YU  AAATAGTCATGCAGAGCTTGGGGCGGCGAATGGTGCTACTACTGCTGATAATG
```

7.6. Relevées météorologiques

Mois	Lieu	RH	Tsol	T10cm	T60cm
mars.03	SW	64.6	Nd*	nd	6.7
avr.03	SW	63.2	nd	nd	16.1
mai.03	SW	78.1	nd	nd	16.5
juin.03	SW	38.2	nd	nd	26.2
juil.03	SW	58	10.9	24.20	24.35
août.03	SW	39	11.15	28.45	28.8
sept.03	SW	69.5	6.75	18.55	17.8
oct.03	SW	71	-0.3	7.55	7.55
nov.03	SW	74	-1.3	0.75	0.35
déc.03	SW	54	nd	nd	1.1
janv.04	SW	85.5	-4.4	3.45	5.75
févr.04	SW	50	-3.2	2.20	2.1
mars.04	SW	32	3.1	17.70	17.15
avr.04	SW	24	6.1	22.30	19.8
mai.04	SW	34	7.35	21.45	20.6
juin.04	SW	75	10.8	19.55	21.7
juil.04	SW	71	7.5	22.50	22
août.04	SW	33	8.15	24.80	21.4
sept.04	SW	78	6.05	17.30	16.95
oct.04	SW	70	1.75	6.95	5.8
nov.04	SW	73	-2.8	1.75	1.4
déc.04	SW	55	-1.3	2.90	2.2
janv.05	SW	88	-1.1	3.20	2.8
févr.05	SW	50	-3.3	0.50	0.03
mars.05	SW	60	1.9	13.50	13.2
avr.05	SW	50	3.85	14.00	13.9
mai.05	SW	61.8	13	25.00	24.5
juin.05	SW	48	19	29.20	29.7
juil.05	SW	44	21.1	31.80	31
août.05	SW	64.3	17.6	23.90	23.9
sept.05	SW	68.9	12.7	17.10	17.2
oct.05	SW	78	10.8	15.10	16.6
nov.05	SW	70	1.6	2.30	2.4
janv.03	PR	nd	nd	nd	nd
févr.03	PR	40.9	-3.25	10.50	9.85
mars.03	PR	45		13.50	13.5
avr.03	PR	42.5	4.2	18.25	17.9
mai.03	PR	56	7.05	24.05	25.05
juin.03	PR	42	8.4	25.35	25.65
juil.03	PR	44.5	9.65	25.00	24.9
août.03	PR	44.5	11.05	26.60	28
sept.03	PR	79.4	7.2	17.35	16.15
oct.03	PR	66.1	2	7.00	6.7
nov.03	PR	69.8	1.2	8.00	6.2
déc.03	PR	57.75	-0.65	4.10	3.5

Mois	Lieu	RH	Tsol	T10cm	T60cm
janv.04	PR	48	-0.9	3.60	3.3
févr.04	PR	35.9	-1	11.45	10
mars.04	PR	41.4	2.1	16.50	13.7
avr.04	PR	32.2	10.1	21.80	19.9
mai.04	PR	44.8	9.1	19.90	18.8
juin.04	PR	70	13.4	19.00	18.8
juil.04	PR	46.6	15.7	23.80	22.2
août.04	PR	56.2	15	21.40	21.2
sept.04	PR	66.4	13	19.10	18.6
oct.04	PR	96.9	6.3	14.00	13.7
nov.04	PR	69.2	5.3	8.40	7.6
déc.04	PR	61	-0.5	0.50	0.4
janv.05	PR	62	0.2	4.70	4.2
févr.05	PR	68	-0.8	1.10	0.7
mars.05	PR	26.4	0.55	21.10	20.6
avr.05	PR	26	1	17.00	15.4
mai.05	PR	41.5	3.5	20.50	21.35
juin.05	PR	38.7	17.3	27.10	26.9
juil.05	PR	36.5	17.9	30.90	28.7
août.05	PR	60.8	15.5	20.70	20.6
sept.05	PR	47.1	15.6	24.60	23.1
oct.05	PR	65.6	12.6	17.20	16.9
nov.05	PR	nd	nd	nd	nd

RH : humidité relative (%), Tsol : température au sol (°C), T10cm : température à 10 cm (°C), T60cm : température à 60 cm (°C), nd : not done (pas de mesure).