

Dynamique de transmission de *Borrelia afzelii* par *Ixodes ricinus* : comparaisons entre groupes *ospC*



Thèse

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

Par Nicolas Tonetti
Sous la direction du Dr Lise Gern
Neuchâtel, Mars 2012

Jury

Dr Lise Gern, directrice de thèse
Prof. Bruno Betschart
Prof. Peter-Allan Diehl
Dr Nathalie Boulanger

unine

UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL

FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat-Décanat de la faculté
Rue Emile-Argand 11
CH-2000 Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Dynamique de transmission de *Borrelia afzelii* par *Ixodes ricinus*: comparaisons entre groupes *ospC*

Nicolas TONETTI

UNIVERSITE DE NEUCHATEL


FACULTE DES SCIENCES

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

Dr Lise Gern, directrice de thèse
Prof. Bruno Betschart, Neuchâtel
Prof. Peter-Allan Diehl, Neuchâtel
Dr Nathalie Boulanger, Strasbourg

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 15 mai 2012



Le doyen :
P. Kropf

Table des matières

1	Introduction	11
1.1	Préambule	13
1.2	Maladie de Lyme	14
1.2.1	Historique	14
1.2.2	Répartition	16
1.2.3	Symptômes	18
1.2.4	Diagnostic et traitement	20
1.3	Le pathogène	21
1.3.1	Répartition de <i>Borrelia burgdorferi</i> sl.	23
1.3.2	Organisation génétique de <i>B. burgdorferi</i> sl.	24
1.3.2.1	Transferts génétiques	26
1.3.2.2	Lipoprotéines de surface (<i>Osp</i> s)	27
1.4	Le vecteur	28
1.4.1	<i>Ixodes ricinus</i>	30
1.4.1.1	Infection d' <i>Ixodes</i> sp. par <i>B. burgdorferi</i> sl.	31
1.5	L'hôte	35
1.5.1	Réservoirs de <i>Borrelia</i> sp.	36
1.6	Le gène <i>ospC</i>	37
1.6.1	Fonction d' <i>OspC</i>	39
1.6.2	<i>ospC</i> et invasivité	41
1.7	Distribution des groupes <i>ospC</i> dans la nature	44
1.8	Problématique	45
2	Matériel et méthodes	47
2.1	<i>Borrelia afzelii</i>	49
2.1.1	Provenance des isolats et culture de spirochètes	49
2.1.2	Isolement et détection de spirochètes depuis l'hôte	51
2.1.3	Isolement et détection de spirochètes depuis le vecteur	51

2.2	Le vecteur	52
2.2.1	Elevage d' <i>Ixodes ricinus</i>	52
2.2.2	Infection des tiques par capillaires	53
2.3	L'hôte	54
2.3.1	Entretien des animaux.....	54
2.3.2	Anesthésie.....	54
2.3.3	Infestation	55
2.4	Dynamique de transmission par infection artificielle	55
2.4.1	Infection des souris par <i>B. afzelii</i>	55
2.4.2	Xénodiagnose.....	56
2.5	Dynamique de transmission par infection naturelle	56
2.5.1	Prévalence d'infection, infectivité et co-feeding	57
2.5.2	Temps de latence avant transmission de la tique à l'hôte et de l'hôte à la tique.....	57
2.6	<i>ospC</i>	59
2.6.1	Détermination du groupe <i>ospC</i>	59
2.6.1.1	"Single Strand Conformation Polymorphism"	59
2.6.1.2	Séquençage du gène <i>ospCxi</i>	
2.7	Microscopie confocale	62
2.7.1	Transformation de <i>B. afzelii</i> pour l'expression de "GFP"	62
2.7.1.1	Plasmide utilisé, production et purification du plasmide.....	62
2.7.1.2	Transformation de <i>B. afzelii</i>	64
2.7.1.3	Examen des cultures de Borrélias transformées.....	65
2.7.1.4	Dissection des tiques et examen in vivo des borrélias transformées	65
2.8	Outils statistiques	65
3	Résultats	67
3.1	Détermination du groupe <i>ospC</i> des isolats utilisés	69
3.2	Influence des groupes <i>ospC</i> sur la dynamique de transmission de <i>B. afzelii</i> par <i>I. ricinus</i>	72

3.2.1	Dynamique de transmission de <i>B. afzelii</i> lors d'infections expérimentales ...	73
3.2.1.1	<i>Prévalence d'infection et infectivité des souris après une injection sous-cutanée de culture de borrelies</i>	73
3.2.1.2	<i>Prévalence d'infection et infectivité des souris lors d'infection par des nymphes infectées par capillaires</i>	79
3.2.1.3	<i>Comparaison des prévalences d'infection des souris et de leur infectivité entre les différentes méthodes d'infection expérimentales</i>	81
3.2.2	Effets d'infestations répétées sur l'infectivité des souris.....	82
3.2.3	Dynamique de transmission de <i>B. afzelii</i> lors d'infections naturelles	83
3.2.3.1	<i>Prévalence d'infection des souris</i>	84
3.2.3.2	<i>Infectivité des souris pour les tiques</i>	86
3.2.3.3	<i>Evolution de l'infectivité des souris infectées naturellement au cours du temps</i>	88
3.2.3.4	<i>Transmission par co-feeding</i>	90
3.2.3.5	<i>Relations entre les différentes voies de transmission de <i>B. afzelii</i> lors d'infection naturelle</i>	93
3.2.4	Comparaison des prévalences d'infection des souris et de leur infectivité entre les infections par injection sous-cutanée et naturelles.....	98
3.3	Temps de latence avant transmission de spirochètes de la tique à l'hôte	99
3.3.1	Taux d'infection des tiques infectantes au cours du repas sanguin	101
3.3.2	Evolution de l'infection des nymphes au cours du temps.....	103
3.4	Temps de latence avant transmission de l'hôte à la tique	104
3.5	Facteurs influençant l'infectiosité des spirochètes	106
3.5.1	Effets de la température sur l'infectiosité des spirochètes lors d'injections sous-cutanées de broyats de nymphes infectées.....	106
3.5.2	Effets de la température sur l'infectiosité des spirochètes lors d'infestation avec des nymphes infectées	108
3.6	Quantification des borrelies présentes dans les tiques	109
3.7	Transformation de <i>B. afzelii</i>	111
3.7.1	Production et purification de pTM61.....	111
3.7.2	Electroporation.....	113

3.7.3 Observations <i>in vivo</i> de spirochètes dans <i>I. ricinus</i>	114
4 Discussion	119
4.1 Détermination du groupe <i>ospC</i> des isolats utilisés	121
4.2 Détection de spirochètes chez la souris et chez les tiques	123
4.3 Mode d'infection des souris	126
4.4 Temps de latence avant transmission entre l'hôte et le vecteur et entre le vecteur et l'hôte	128
4.5 Effets de la température sur l'infectiosité des spirochètes	134
4.6 Dynamique de transmission de <i>B. afzelii</i>	137
4.7 Distribution des groupes <i>ospC</i> dans la nature	155
4.8 Transformation de <i>B. afzelii</i> et microscopie confocale	159
5 Conclusion et perspectives	161
6 Remerciements	165
7 Bibliographie	169
8 Résumé	189
9 Annexes	I
9.1 Régions variables du gène <i>ospC</i>	III
9.2 Système expérimental hôte-vecteur-pathogène.....	IV
9.3 Résultats bruts lors d'infection naturelle	VII
9.4 Résultats bruts lors d'injection sous-cutanée.....	IX

I Introduction

1.1 Préambule

L'étude des protéines de surface des agents responsables de maladies vectorielles et dans une plus large mesure de tous les agents pathogènes, a toujours été d'un intérêt majeur en science, qu'il s'agisse de virus, de bactéries, de protozoaires, ou encore d'helminthes. De par leur position anatomique, elles constituent une interface avec l'environnement changeant dans lequel les pathogènes évoluent; à l'intérieur de l'hôte ou du vecteur, intra ou extra cellulièrement. Elles peuvent donc jouer un rôle important pour la survie du parasite, son expansion, mais aussi pour la lutte contre ces agents. Leurs actions sont extrêmement variées, allant de l'évasion du système immunitaire de l'hôte ou du vecteur à la reconnaissance des sites à parasiter en passant par l'invasion des tissus. Ainsi, les "Variable Surface Glycoproteins", ou VSG chez *Trypanosoma brucei*, protozoaire responsable de la maladie du sommeil, permettent l'évasion du système immunitaire de l'hôte en changeant périodiquement et plus rapidement que le temps nécessaire au système immunitaire de l'hôte pour reconnaître ces protéines comme antigènes (Barbour et Restrepo, 2000). Les "variable major protein" (VMP) chez les borrelies responsables des fièvres récurrentes jouent aussi le même rôle (Barbour, 1988a). Les porines des bactéries gram-négatif, servant aux échanges moléculaires avec l'extérieur, sont aussi intensément étudiées, étant les principales voies d'entrée des antibiotiques (Pagès, 2005). Finalement, les adhésines bactériennes et les facteurs de dissémination permettent la reconnaissance des sites à parasiter, la fixation de l'agent pathogène aux tissus cibles et leur invasion, telles que les "Outer Surface Proteins" (Osp) chez *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), l'agent responsable de la maladie de Lyme. Ces protéines font l'objet d'une attention particulière, puisqu'elles contribuent à la pathogénicité de ces organismes, mais aussi parce qu'elles peuvent être inhibées par le système immunitaire dans certains cas et sont donc potentiellement utilisables pour le développement de vaccins. Ces quelques exemples ne sont qu'une infime fraction des interactions complexes existantes entre ces protéines et l'environnement entourant ces agents pathogènes.

1.2 Maladie de Lyme

1.2.1 Historique

Lyme est une petite ville du Connecticut, rendue tristement célèbre par l'infection bactérienne éponyme, la borréliose de Lyme. Dès 1972, une épidémie est observée dans l'est du Connecticut et une surveillance est organisée dans les communautés de Lyme, Old Lyme et East Haddam, où plusieurs dizaine d'enfants et une dizaine d'adultes sont atteints d'arthrite diagnostiquée au début comme une arthrite rhumatoïde juvénile (Steere *et al.*, 1977). Après l'auscultation de nombreux habitants et l'évaluation du contexte épidémiologique, l'étude conclut à une maladie vectorielle transmise par un arthropode, nommée arthrite de Lyme. Cette hypothèse est étayée par la présence de lésions particulières précédant l'apparition des premiers symptômes d'arthrite chez un quart des patients. Ces lésions étaient similaires à des manifestations cliniques observées déjà en Europe au début du XXème siècle, *l'erythema chronicum migrans*, et supposées être transmises par la tique *Ixodes ricinus* (Lipschütz, 1913; Afzelius, 1921). Bien que d'autres études montrent par la suite que l'érythème peut être contagieux expérimentalement (Binder *et al.*, 1955; Sonck, 1965), Steere et collaborateurs concluent sans pouvoir identifier ni agent pathogène ni vecteur (Steere *et al.*, 1977). Il faut attendre les années 80 pour obtenir un début de réponse, lorsque des spirochètes ressemblant au genre *Treponema* sp. sont détectés dans la tique *Ixodes scapularis* (Burgdorfer *et al.*, 1982). Mis en contact avec des sérums de patients atteints par cette arthrite de Lyme, appelée entre temps maladie de Lyme, Burgdorfer et collaborateurs (1982) remarquent que les spirochètes induisent une réaction immunitaire. La confirmation viendra juste après, par l'isolement de spirochètes depuis le sang de patients atteints, aux profils antigéniques identiques à ceux isolés depuis *I. scapularis* (Benach *et al.*, 1983) et la découverte de spirochètes chez la tique *I. ricinus* en Europe (Burgdorfer *et al.*, 1983). En 1984, finalement, ce spirochète transmis par les tiques du genre *Ixodes* est taxonomiquement identifié et nommé *Borrelia burgdorferi* (Hyde et Johnson, 1984).

Depuis ces découvertes, les recherches sur cette nouvelle maladie s'étendent à de nombreux laboratoires. Grâce à un nombre croissant de nouveaux isolats, les

scientifiques révèlent des différences génétiques notables entre certains organismes (Adam *et al.*, 1991; Boerlin *et al.*, 1992; Marconi et Garon, 1992). La première nouvelle espèce décrite est *B. garinii* (Postic *et al.*, 1990; Baranton *et al.*, 1992), puis viennent *B. afzelii* (Baranton *et al.*, 1992; Canica *et al.*, 1993) et *B. valaisiana* (Wang *et al.*, 1997). La notion de *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) pour l'espèce *B. burgdorferi* et sensu lato (sl) pour l'ensemble du complexe de génoespèces est dès lors adoptée.

Ainsi, le complexe *B. burgdorferi* sl contient aujourd'hui 19 espèces connues à travers le monde, la dernière ayant été officiellement validée en 2011 (Casjens *et al.*, 2011a; Rudenko *et al.*, 2011; Stanek et Reiter, 2011)(tableau 1). Six d'entre elles sont responsables de la maladie chez l'Homme, principalement causée par *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. bavariensis* et dans une moindre mesure par *B. spielmanii* et *B. lusitaniae*. Deux autres espèces, *B. bissettii* et *B. valaisiana* sont soupçonnées d'être aussi pathogéniques, mais une controverse concernant *B. bissettii* et le peu d'évidences pour *B. valaisiana* implique de nouvelles recherches pour le démontrer (Baranton et De Martino, 2009). Les espèces *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis* et *B. kurtenbachii* aux Etats-Unis ainsi que *B. carolinensis* aux Etats-Unis et en Europe et finalement *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* et *B. yangtze* en Asie n'ont jamais été isolées depuis un patient. Finalement, une nouvelle espèce découverte en Finlande, *B. finlandensis* (Casjens *et al.*, 2011a) est en cours de validation.

Introduction

Tableau 1 : Espèces de *Borrelia* appartenant au complexe *Borrelia burgdorferi* sl. Distribution géographique, principaux vecteurs et réservoirs.

Espèces	vecteurs	Réservoirs	Distribution géographique
<i>B. afzelii</i>	I. r, I. pe, I. h	M. mam	Eu, Asie
<i>B. americana</i>	I. p, I. m	M. mam, oiseaux	USA côte ouest
<i>B. andersonii</i>	I. s, I. d	M. mam, lagomorphes	USA côte est
<i>B. bavariensis</i>	I. r	M. mam	Eu centrale
<i>B. bissettii</i>	I. r, I. s, I. sp, I. m, I. a, I. pe	M. mam, oiseaux	Eu centrale, USA
<i>B. burgdorferi</i> ss	I. an, I. r, I. s, I. p	M. mam, oiseaux	Eu, USA
<i>B. californiensis</i>	I. p, I. j, I. sp	M. mam	USA côte ouest
<i>B. carolinensis</i>	I. p, I. m	M. mam	USA côte ouest, Eu
<i>B. finlandensis</i>	I. r	M. mam	Fin.
<i>B. garinii</i>	I. r, I. pe, I. u	M. mam, oiseaux	Eu, Asie
<i>B. japonica</i>	I. o	M. mam	Japon
<i>B. kurtenbachii</i>	I. s	M. mam	USA côte est
<i>B. lusitaniae</i>	I. r	Lézards	Méd.
<i>B. sinica</i>	I. o	M. mam	Chine, Népal
<i>B. spielmanii</i>	I. r	M. mam	Eu centrale
<i>B. tanukii</i>	I. t	M. mam	Japon, Népal
<i>B. turdi</i>	I. tu	Oiseaux	Japon
<i>B. valaisiana</i>	I. r, I. g, I. n, I. c	Oiseaux	Eu, Asie
<i>B. yangtze</i>	I. g	M. mam	Chine

En gras, les espèces pathogènes pour l'Homme.

I. a= *I. affinis*; **I. an**= *I. angustus*; **I. c**= *I. columnae*; **I. d**= *I. dentatus*; **I. g**= *I. granulatus*; **I. h**= *I. hexagonus*; **I. j**= *I. jellisoni*; **I. m**= *I. minor*; **I. n**= *I. nipponensis*; **I. o**= *I. ovatus*; **I. p**= *I. pacificus*; **I. pe**= *I. persulcatus*; **I. r**= *I. ricinus*; **I. s**= *I. scapularis*; **I. sp**= *I. spinipalpis*; **I. t**= *I. tanuki*; **I. tu**= *I. turdus*; **I. u**= *I. uriae*.

M. mam= micro mammifères; **Eu**= Europe; **Fin.**=Finlande; **Méd.**= pourtour méditerranéen et Portugal.

(Younsi *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 2003; Sarih *et al.*, 2003; Masuzawa, 2004; Younsi *et al.*, 2005; Kurtenbach *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2008; Baranton et De Martino, 2009; Rudenko *et al.*, 2009; Cotte *et al.*, 2010; Margos *et al.*, 2010; Ogden *et al.*, 2011; Stanek et Reiter, 2011)

1.2.2 Répartition

La borréliose de Lyme est présente dans l'hémisphère nord, où elle touche les zones tempérées, ainsi que dans l'hémisphère sud grâce aux oiseaux migrateurs, comme nous le verrons plus loin. Liée à la répartition de ses vecteurs (tableau 1, chapitre 1.4), elle est recensée en Amérique du nord, en Europe et en Asie (Hubalek, 2009)(fig. 1). Sa présence a aussi été démontrée en Afrique du nord; en Tunisie, au Maroc et en Algérie, mais son impact sur l'Homme semble peu important au vu des cas cliniques recensés (Younsi *et al.*, 2001; Sarih *et al.*, 2003; Bouattour *et al.*, 2004).

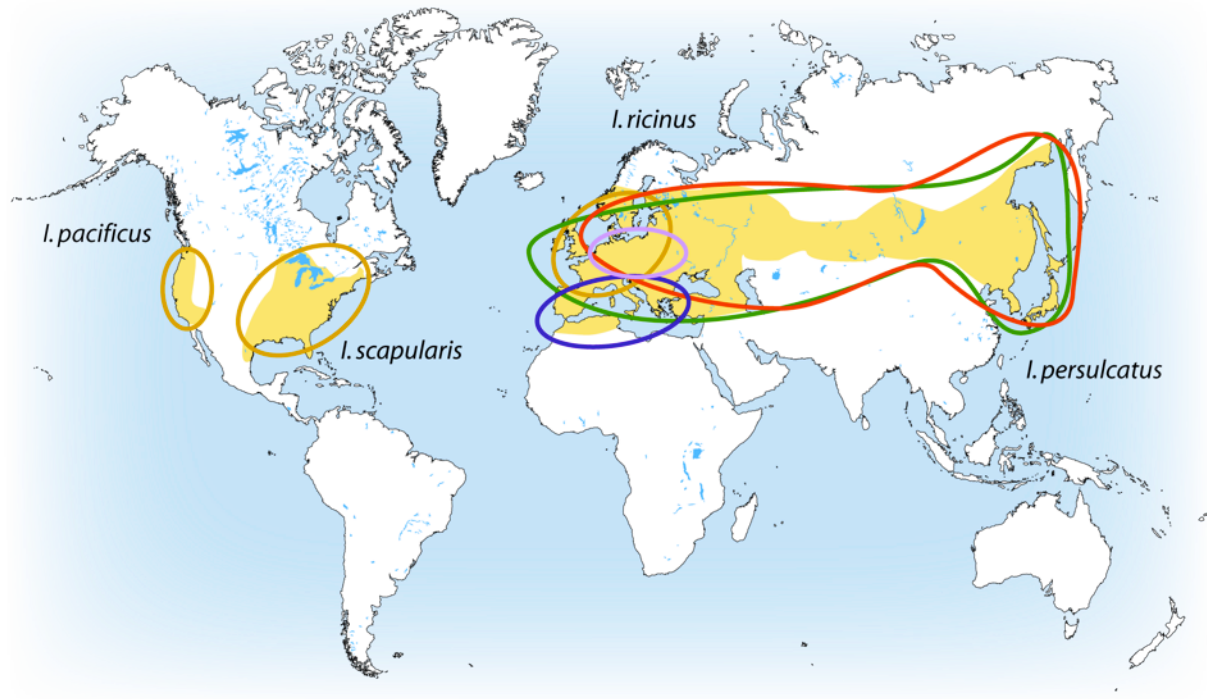


Fig. 1 : Répartition mondiale de la maladie de Lyme.

Distribution de ses principaux vecteurs et des principales espèces pathogènes pour l'Homme, modifié d'après Kurtenbach *et al.* (2006).

En beige: ■ Distribution de la maladie de Lyme

Entouré, la distribution des espèces pathogènes pour l'Homme: ● *B. afzelii*; ● *B. garinii*; ● *B. burgdorferi* ss; ● *B. bavariensis*, *B. spielmanii*; ● *B. lusitaniae*.

Aux Etats-Unis, la maladie est surtout présente dans l'est du pays, du Maine à la Floride et du Minnesota au Texas, mais aussi sur la côte ouest, de la Californie à l'état de Washington. Le sud du Canada, du Québec à la Colombie britannique, possède des zones endémiques pour les deux principaux vecteurs du continent, *I. scapularis* et *I. pacificus*, mais très peu de cas de maladie de Lyme sont recensés encore aujourd'hui, la prévalence d'infection des vecteurs étant très faible (Ogden *et al.*, 2008a; Ogden *et al.*, 2008b; Ogden *et al.*, 2011). Toute l'Europe est touchée, avec une limite nord correspondant à la limite des vecteurs. Elle s'étend ensuite vers l'est, jusqu'au Japon (Güner *et al.*, 2003; Masuzawa, 2004; Younsi *et al.*, 2005; Kurtenbach *et al.*, 2006; Fingerle *et al.*, 2008; Baranton et De Martino, 2009; Hubalek, 2009; Ogden *et al.*, 2011).

1.2.3 Symptômes

La maladie de Lyme peut provoquer de nombreuses manifestations, les signes cliniques pouvant être d'ordre dermatologique, articulaire, neurologique, mais aussi cardiaque ou ophtalmologique. Elle se décline généralement en deux ou trois phases chronologiques selon les définitions: La phase précoce (localisée, puis disséminée) et la phase tardive. Ces phases sont décrites ci-dessous d'après Evison *et al.* (2006a, b) et Strle et Stanek (2009).

La phase précoce localisée débute dès l'infection et dure entre un et deux mois.

L'infection est localisée et se caractérise généralement par l'apparition d'un érythème migrant (EM), qui est le symptôme le plus fréquent, apparaissant dans plus de 70% des cas. L'invasion de la peau par *B. burgdorferi* si induit une rougeur à l'endroit de la piqûre qui s'étend circulairement de jour en jour. Après le passage des bactéries, l'intérieur de l'érythème retrouve une couleur chair, créant ainsi un anneau en expansion typique (fig. 2).



Fig. 2 : Erythème migrant. (CDC, James Gathany)

La phase précoce disséminée suit la phase localisée et se caractérise par l'apparition d'autres troubles cutanés, nerveux ou encore rhumatologiques. L'infection devient systémique. Les troubles cutanés typiques sont l'érythème migrant multiple et



Fig. 3 : Lymphocytome. (Gerold Stanek)

dans une moindre mesure le lymphocytome borrélien, développé dans moins de 10% des cas (fig. 3). Généralement localisé sur les lobes d'oreilles, les seins ou le scrotum, il touche surtout les enfants et est essentiellement rencontré en Europe. Les atteintes nerveuses se traduisent par de fortes céphalées ou une parésie faciale (fig. 4). Les atteintes rhumatologiques provoquent des arthrites des articulations principales. Tous ces symptômes



Fig. 4 : Parésie faciale. (CDC)

apparaissent en général quelques semaines à plusieurs mois après l'infection.

La phase tardive suit les deux précédentes et amène à des pathologies telles que l'acrodermatite chronique atrophiante (ACA, fig. 5), la neuroborréliose tardive, qui peut se développer jusqu'à plusieurs années après l'infection ou encore de l'arthrite



Fig. 5 : Acrodermatite chronique atrophiante (ACA).
(Gerold Stanek)

chronique. L'ACA est une lésion persistante du derme et de l'épiderme touchant généralement les extrémités des membres. La peau perd de sa souplesse, devient fine et prend l'apparence de papier froissé. A ce stade, l'atteinte neurologique amène entre autre à de l'encéphalite persistante, des paresthésies distales et des déficits cognitifs. Cette phase tardive n'apparaît généralement pas si le patient est traité dès le début de la maladie. Les troubles sévères et chroniques sont souvent l'apanage d'une borréliose de Lyme non décelée.

Les affections cardiaques et ophtalmologiques sont beaucoup plus rares. En Europe, moins de 5% des patients semblent développer une cardite, qui peut intervenir dès la première semaine et jusqu'à plusieurs mois après l'infection. Des conjonctivites ainsi que des troubles des nerfs optiques dans la phase précoce et des kératites dans la phase tardive apparaissent dans 5% à 10% des cas (Mikkilä *et al.*, 2000; Evison *et al.*, 2006a; Evison *et al.*, 2006b; Strle et Stanek, 2009).

Cette description de l'évolution de la borréliose de Lyme par phases et les symptômes normalement associés n'est pas immuable. Bien qu'un érythème migrant se déclare dans la majorité des cas, seuls des symptômes tardifs se déclarent chez certains patients. De même, la maladie n'évolue pas toujours dans les phases disséminées et tardives. Il est aussi à noter que seuls certains génotypes semblent à même de créer une systémie, les autres ne créant que des infections localisées (chapitre 1.6.2). L'espèce de borrélies influence aussi l'évolution de la maladie. Les quatre principales espèces pathogènes semblent avoir un tropisme préférentiel pour certains tissus. Ainsi, les EM et ACA sont principalement associés à *B. afzelii* (van Dam *et al.*, 1993), *B. garinii* et *B. bavariensis* sont les espèces majoritairement isolées lors de neuroborrélioses (Wilske *et al.*, 1996) et *B. burgdorferi* ss est souvent responsable d'arthrites (van Dam *et al.*, 1993).

1.2.4 Diagnostic et traitement

Alors que ces symptômes sont bien connus, leur grande diversité, l'occurrence variée des manifestations et la ressemblance avec d'autres affections rendent le diagnostic médical laborieux. Le diagnostic clinique est en général conforté par un test sérologique ainsi que par culture pour les EM et les ACA (Evison *et al.*, 2006b; Evison *et al.*, 2006a; Hansmann, 2009; Strle et Stanek, 2009). Les tests sont majoritairement de type "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) ou immunoblot (Western blot) et portent sur les immunoglobulines (Ig) M et G dirigées contre les antigènes bactériens, dont les protéines de surface OspA et OspC, pour Outer Surface Protein A et C (chapitre 1.3.2.2). Dans la phase précoce localisée, le diagnostic clinique et la culture sont prépondérants pour détecter une infection à *B. burgdorferi* s.l, la sérologie étant négative dans 40 à 60% des cas. Pour toutes les autres manifestations, la sérologie est indiquée pour étayer le diagnostic clinique et démontre une sensibilité de 80% pour le lymphocytome, l'arthrite, la cardite et la neuroborréliose précoce et de plus de 90% pour l'ACA et la neuroborréliose tardive (Evison *et al.*, 2006b). Toutefois, la sérologie ne permet pas d'affirmer que le pathogène est toujours présent ou actif. De plus, des résultats faussement positifs peuvent être rencontrés lors d'infections par d'autres spirochètes, comme la syphilis, la fièvre récurrente ou parfois par des spirochètes de la flore commensale. De même, comme la séroconversion s'effectue jusqu'à cinq semaines après la piqûre pour les IgM et de six à huit semaines pour les IgG, des résultats faussement négatifs peuvent survenir, surtout dans la phase précoce de l'infection (Evison *et al.*, 2006b). Les outils moléculaires tels que la PCR sont aussi utilisés, mais à nouveau, un résultat positif ne garantit pas que la maladie soit toujours active.

Le traitement s'effectue par antibiotiques pendant environ trois semaines, lors de la phase précoce localisée, et jusqu'à un mois pour les phases disséminées et tardives (Evison *et al.*, 2006a; Hansmann, 2009). Des traitements plus longs sont appliqués dans certains cas d'arthrite. Certains symptômes peuvent toutefois persister après le traitement, et ne se résorber progressivement que par la suite (Hansmann, 2009). Les antibiotiques de choix sont les tétracyclines et les β -lactamines, comme l'amoxicilline ou la doxycycline pour les atteintes cutanées et articulaires, et la ceftriaxone pour les atteintes nerveuses (Evison *et al.*, 2006a; Hansmann, 2009). L'antibiotique est en

général administré oralement, mais une administration par intraveineuse démontre une meilleure efficacité lors d'atteintes du système nerveux central et de cardite.

1.3 Le pathogène

Six des 19 espèces du complexe *B. burgdorferi* sl sont responsables de la maladie de Lyme. Toutes appartiennent à l'ordre des *Spirochaetes*, la famille des *Spirochaetaceae* et partagent le genre *Borrelia* avec 22 autres espèces, dont les agents responsables des fièvres récurrentes à tiques et à poux. Ce sont des bactéries hétérotrophes micro aérophiiles mesurant de 20-30µm pour environ 0.1-0.4µm de diamètre (Johnson *et al.*, 1984). Toutes les espèces du genre évoluent entre arthropodes hématophages et mammifères, oiseaux ou reptiles. Le complexe *B. burgdorferi* sl est quant à lui inféodé aux tiques de la famille des *Ixodidae* seulement. Cette bactérie est de forme hélicoïdale et possède une membrane interne homologue aux membranes des bactéries gram-négatif. Sa membrane externe bi-lipidique en diffère par contre, de par sa composition et une absence de lipopolysaccharides et de phosphatidylethanolamine, dans laquelle s'insèrent entre autres les porines et les protéines de surface (Osps) (Barbour et Hayes, 1986; Kudryashev *et al.*, 2009) (fig. 6).

L'espace périplasmique contient une couche de peptidoglycane et des fibrilles axiales, ou flagelles périplasmiques, pour la locomotion. Le nombre de ces fibrilles varie de 1 à 12 par cellule suivant l'espèce et l'individu. Cette forme spiralée et les mouvements induits par les fibrilles offrent aux spirochètes une meilleure motilité dans les milieux visqueux que fluides (Greenberg et Canale-Parola, 1977b; Greenberg et Canale-Parola, 1977a), leur permettant de rester mobiles dans des milieux aussi visqueux que les matrices extracellulaires et les tissus conjonctifs des hôtes (Kimsey et Spielman, 1990). Le temps de génération de *B. burgdorferi* sl en culture est d'environ 12 heures (Barbour, 1984).

Introduction

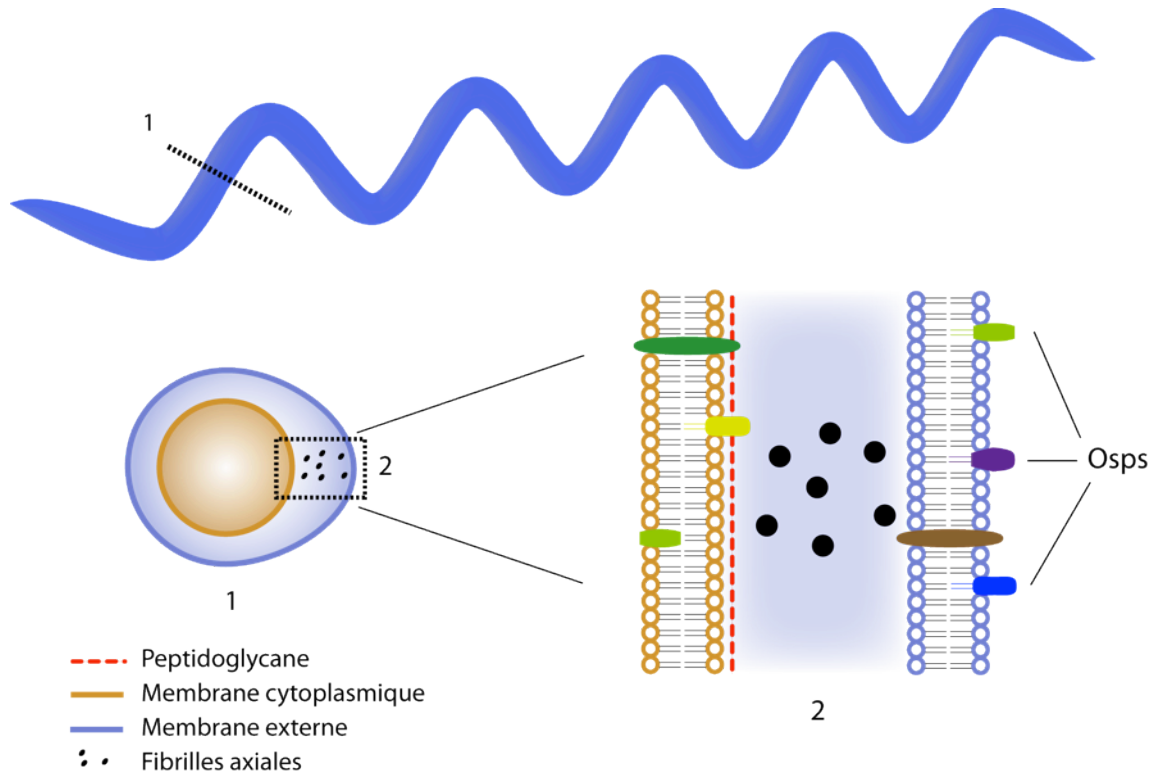


Fig. 6 : Représentation schématique de la structure de *Borrelia burgdorferi* s.l (N. Tonetti).

Dans les tiques à jeun, les spirochètes sont normalement uniquement présents dans l'intestin, bien qu'entre 5 à 35% des tiques de l'espèce *I. ricinus* soient infectées de manière systémique, ce qui signifie que des spirochètes sont isolés depuis d'autres organes que l'intestin, tels que le synganglion, les glandes salivaires ou les muscles (Lebet et Gern, 1994; Leuba-Garcia *et al.*, 1994). Mais lorsque la tique se nourrit, les spirochètes commencent leur invasion via l'hémolymphe et certains migrent dans les acinii II et III des glandes salivaires pour être alors injectés dans l'hôte avec la salive (Dunham-Ems *et al.*, 2009).

1.3.1 Répartition de *Borrelia burgdorferi* s.l

La répartition du complexe *B burgdorferi* s.l englobe le monde entier d'Est en Ouest, tout en étant cantonnée du Nord au Sud entre 60° et 30° de latitude environ (Younsi *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 2003; Sarih *et al.*, 2003; Masuzawa, 2004; Younsi *et al.*, 2005; Kurtenbach *et al.*, 2006; Baranton et De Martino, 2009; Cotte *et al.*, 2010; Ogden *et al.*, 2011; Stanek et Reiter, 2011) (fig. 1). Il existe 7 espèces de borrelies en Amérique du Nord, qui sont *B. americana*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi* ss, *B. californiensis*, *B. carolinensis* et *B. kurtenbachii*. Elles sont essentiellement présentes sur la côte ouest et la côte est des Etats-Unis (tableau 1), avec une faible présence au sud du Canada (Ogden *et al.*, 2008a; Ogden *et al.*, 2011).

Dix espèces sont rencontrées en Europe, soit *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi* ss, *B. carolinensis*, *B. finlandensis*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* et *B. valaisiana*, ce qui comprend toutes les espèces pathogènes pour l'Homme. Elles peuvent toutes infecter la tique *I. ricinus*, qui est l'espèce de tique la plus rencontrée sur le continent (Gern et Humair, 2002)(chapitre 1.4.1). Les espèces *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. valaisiana* étendent leur distribution jusqu'en Asie, mais dans le vecteur *I. persulcatus*, où elles partagent leur habitat avec les espèces présentes en orient uniquement, qui sont *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* et *B. yangtze*.

L'agent de la maladie de Lyme n'est toutefois pas seulement présent dans l'hémisphère Nord. La présence de *B. garinii* a été démontrée chez *I. uriae* provenant d'oiseaux migrateurs marins autant dans l'hémisphère Sud que dans l'hémisphère Nord (Olsen *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2006). En plus du cycle terrestre classique, impliquant principalement les vecteurs *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus* et *I. persulcatus* ainsi que des micromammifères comme principaux réservoirs, il existe un cycle "marin", maintenu par *I. uriae* et des oiseaux pélagiques, tels que les puffins (*Fratercula artica*) ou les pingouins torda (*Alca torda*) (Gylfe *et al.*, 1999). Ces oiseaux migrateurs transportent ainsi des spirochètes lors de leurs migrations, ce qui a permis à Olsen et collaborateurs (1999) et Smith et collaborateurs (2006) de détecter *B. garinii* autant en Suède que sur la côte Nord du Canada ou encore en Nouvelle Zélande.

1.3.2 Organisation génétique de *B. burgdorferi* sl

L'organisation génétique de *B. burgdorferi* sl est unique aux spirochètes (Caimano, 2006; Casjens *et al.*, 2012). Elle est composée d'un chromosome d'environ 910 Kb, accompagné de multiples plasmides linéaires (lp) et circulaires (cp) de taille pouvant aller de 5 kb à 60 kb environ (tableau 2). Le chromosome contient environ 850 gènes, dont les fonctions sont majoritairement liées aux mécanismes fondamentaux de l'organisme; les processus génétiques, le métabolisme énergétique, le transport transmembranaire... (Bergström *et al.*, 2002). Les plasmides contiennent eux de nombreux gènes impliqués dans l'adaptation aux variations de milieux dans lesquels évolue le pathogène, dans l'hôte ou dans le vecteur. Certains de ces gènes, qui codent pour des protéines de surface, ou Osps, sont aussi impliqués dans la pathogénicité (chapitre 1.6.1).

Vingt-deux souches de *B. burgdorferi* sl ont été entièrement séquencées jusqu'à présent, comprenant les espèces *B. afzelii* (Glöckner *et al.*, 2006; Casjens *et al.*, 2011b), *B. bavariensis* (Glöckner *et al.*, 2004; Glöckner *et al.*, 2006), *B. burgdorferi* ss (Fraser *et al.*, 1997; Casjens *et al.*, 2000; Schutzer *et al.*, 2011), *B. finlandensis* (Casjens *et al.*, 2011a), *B. garinii*, *B. spielmanii* et *B. valaisiana* (Fraser-Liggett *et al.*, J. Craig Venter Institute, unpublished) (tableau 2).

Tableau 2 : Composition plasmidique des génomes séquencés de *B. burgdorferi* sl.

Espèce	Souche	Nombre de plasmides	Composition
<i>B. afzelii</i>	PKo ^{1,2}	15	lp25, lp28, lp32, lp34, lp60-1, 2 cp27, 8x cp30
	ACA-1 ²	14	lp17; lp28-1, 2, 3, 4, 7; lp32-10; lp38; lp54 cp26, cp32-1, 3, 4, 5
<i>B. bavariensis</i>	<i>B. garinii</i> PBj ^{1,3}	11	lp21-1, 2, lp22, lp24, lp28, lp50, lp54; lp59 cp28, cp29, cp31
<i>B. burgdorferi</i> ss	64b ⁴	18	lp17, lp28-1, 2, 3, 4, 5, lp36, lp38, lp54 cp26, cp32-1, 3-8, 4, 5, 6, 7, 9, 11,
	B31 ⁵	21	lp5, lp17, lp21, lp25, lp28-1, 2, 3, 4, lp36, lp38, lp54, lp56 cp9, cp26, cp32-1, 3, 4, 6, 7, 8, 9
	ZS7 ⁴	14	lp17, lp25, lp28-1, 2, 3, 4, lp36, lp54 cp26, cp32-1, 3, 4, 9, 12
	BOL26 ⁴	13	lp17, lp28-1, 3, 4, lp36, lp54 cp26, cp32-4, 5, 9, 10, 11-1; 12
	156a ⁴	20	lp17; lp21; lp25; lp28-1, 3, 4, 5, 6; lp36; lp38; lp54 cp26, cp32-1, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12
	CA-11.2A ⁴	12	lp17, lp28-3, lp36-28-4, lp38, lp54, lp56 cp26, cp32-1, 3, 5, 10, 13
	72a ⁴	13	lp17; lp28-4; lp36; lp38; lp54 cp26; cp32-1, 2-7, 3, 5, 7, 10, 13
	29805 ⁴	15	lp17, lp25, lp28-2, 3, 4, 6, lp36, lp38, lp54 cp26, cp32-4, 5, 7, 9, 12
	JD1 ⁴	20	lp17; lp25; lp28-1, 3, 4, 5, 6, 7; lp36; lp38; lp54 cp26; cp32-1+5, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12
	94a ⁴	14	lp17; lp28-3, 4, 8; lp36; lp54; lp56 cp9; cp26; cp32-5, 6, 7, 10, 11
	118a ⁴	19	lp17, lp25, lp28-3, 4, 5, 6, lp32-3, lp36, lp38, lp54 cp9, cp26, cp32-4, 5, 6, 7-9, 8, 10, 13
	WI91-23 ⁴	21	lp5, lp17, lp25, lp28-1, 3, 4, 6, lp36, lp38, lp54, lp56 cp9-1, 9-3; cp26, cp32-1, 4, 5, 6, 7, 10, 11
	N40 ⁴	17	lp28-1, 2, 4, 5, lp25, lp36, lp38, lp54 cp9, cp18, cp26, cp32-4, 5, 7, 9, 10, 12
	297 ⁴	20	lp17, lp28-1, 3, 4, 5, 6, lp36, lp38, lp54 cp26, cp32, -1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12
	<i>B. garinii</i>	Far04 ²	7
PBr ²		11	lp17; lp25; lp28-1, 3, 4, 7; lp36; lp54 cp26; cp32-5, 10
<i>B. valaisiana</i>	VS116 ²	11	lp17; lp25; lp28-3, 8; lp36; lp54 cp9; cp26; cp32-2-7, 5, 10
<i>B. finlandensis</i>	SV1 ⁶	10	lp17; lp28-2, 4; lp32-6; lp54 cp26; cp32-3, 4, 7, 12
<i>B. spielmanii</i>	A14S ²	8	lp17; lp28-3, 4, 8; lp36; lp38; lp54 cp26

Distribution des OspA à F. OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF.

1= Glöckner *et al.*, 2006; 2= Casjens *et al.*, 2011b; Fraser-Liggett *et al.*, J. Craig Venter Institute, unpublished; 3= Glöckner *et al.*, 2004; 4= Schutzer *et al.*, 2011; 5= Fraser *et al.*, 1997; Casjens *et al.*, 2000; 6= Casjens *et al.*, 2011a.

Introduction

Les plasmides sont généralement présents en copie unique et chacun est nommé selon sa taille et sa structure (Hinnebusch et Barbour, 1992). Les plasmides circulaires sont ainsi nommés cp et les plasmides linéaires lp. Cp26 – ou cp27 chez *B. afzelii* Pko, qui en est l'homologue – est donc un plasmide circulaire d'environ 26 kb qui contient entre autre le gène codant pour la protéine de surface C, écrit *ospC* pour le gène et OspC pour la protéine. Lorsque plusieurs plasmides homologues sont présents, ils sont discriminés par un chiffre. Ainsi, au moins 12 plasmides circulaires (cp) d'environ 32kb et huit plasmides linéaires (lp) d'environ 28Kb sont connus (cp32-1 à 12 et lp28-1 à 8) (Casjens *et al.*, 1997; Caimano *et al.*, 2000). Leur nombre varie d'un organisme à l'autre et peut aller jusqu'à 21 lp et cp confondus par individu, ce qui est le cas de la souche B31 de *B. burgdorferi* ss (tableau 2)(Barbour, 1988b; Xu et Johnson, 1995; Fraser *et al.*, 1997). Lors de cultures *in vitro* successives, certains de ces plasmides peuvent être éliminés. Tous ne sont donc pas indispensables pour la survie en culture, mais si certains peuvent faire défaut sans préjudice vital, tels que le cp9 ou les lp21, lp28-2, lp28-4 et lp56, la perte d'un ou plusieurs des plasmides cp26, cp32, ou lp21, lp25, lp28-1, ou encore lp54 peut toutefois amener à une baisse ou une perte totale du pouvoir infectieux (Xu *et al.*, 1996; Purser et Norris, 2000; Byram *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005).

1.3.2.1 Transferts génétiques

Bien que les mécanismes de transferts génétiques horizontaux sont encore en grande partie inconnus, ces échanges existent chez *B. burgdorferi* sl (Livey *et al.*, 1995; Marti Ras *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999a; Lin *et al.*, 2002; Stevenson et Miller, 2003) et semblent être fréquents pour certains loci (Qiu *et al.*, 2004). Ces études se sont surtout concentrées sur le gène *ospC*, qui présente un fort polymorphisme, ainsi que sur la famille des plasmides circulaires cp32, présents en plusieurs exemplaires chez les souches de borrelies séquencées (tableau 2). Wang et collaborateurs (1999) ont démontré que ces transferts existent aussi bien au niveau intra-spécifique qu'entre espèces du complexe. Ainsi, la souche m7 de *B. valaisiana* arbore le même gène *ospC* que la souche ACA1 de *B. afzelii*. Qiu et collaborateurs (2004) ont, quant à eux, étendu l'observation de transferts génétiques horizontaux à tout le génome de *B. burgdorferi* ss et ont mis en évidence le transfert de plasmides entiers.

Plusieurs hypothèses sur les mécanismes impliqués ont été proposées, dont le transfert par le biais de bactériophages (Eggers *et al.*, 2001). Récemment, une étude de Kudryashev et collaborateurs (2011) a démontré que *B. burgdorferi* ss était capable de fusionner sa membrane externe avec un autre individu, et dans certains cas même de fusionner la membrane cytoplasmique (Kudryashev *et al.*, 2011). Ces fusions pourraient permettre l'échange de plasmides entiers entre individus, mais aussi entre espèces, puisque des infections mixtes sont rencontrées aussi bien dans les tiques (Leuba-Garcia *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2011) que dans les hôtes (Humair et Gern, 1997; Postic *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2011). Des infections mixtes sont aussi retrouvées chez l'Homme (Demaerschallck *et al.*, 1995; Seinost *et al.*, 1999b). Elles ne présentent, par contre, pas d'intérêt dans ce contexte, puisque il s'agit d'un hôte accidentel.

1.3.2.2 Lipoprotéines de surface (Osps)

A la différence des bactéries gram-négatif, *B. burgdorferi* sl présente de nombreuses Osps à sa surface (Caimano, 2006)(fig. 6). Ces protéines sont lipo-ancrées à la membrane externe et exprimées différenciellement en fonction du cycle de vie du parasite, lui permettant de s'adapter aux milieux rencontrés durant sa vie. Sur une centaine de lipoprotéines hypothétiques décrites après séquençage du génome de *B. burgdorferi* ss (Fraser *et al.*, 1997), six Osps se voient porter une attention particulière, de par leur nature antigénique, leur expression différenciée ou en tant que facteur de pathogénicité. Il s'agit d'OspA, OspB, OspC, OspD, OspE et OspF (Haake, 2000) (tableau 2). Les gènes *ospA* et *ospB* sont situés sur un plasmide linéaire de 54kb environ (lp54) et sont essentiellement exprimés dans l'intestin de la tique. Les protéines qu'ils encodent (OspA et OspB) permettent la colonisation de l'intestin du vecteur et sont essentielles à la survie des spirochètes (De Silva *et al.*, 1997; Pal *et al.*, 2000; Fikrig *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2007; Neelakanta *et al.*, 2007). Leur expression diminue généralement après le début du repas sanguin, sans doute pour permettre l'invasion systémique de la tique, puis remonte sur la fin du repas sanguin pour les spirochètes toujours présents dans l'intestin (Schwan et Piesman, 2000; Ohnishi *et al.*, 2001). Toutefois, certains spirochètes continueront d'exprimer OspA tout au long du repas sanguin (Ohnishi *et al.*, 2001). *ospD* est situé sur le plasmide lp38 et est aussi

principalement exprimé dans le vecteur. Il ne semble toutefois pas être nécessaire pour la survie des spirochètes, puisque des mutants n'exprimant pas OspD restent tout de même infectieux autant pour l'hôte que pour le vecteur (Li *et al.*, 2007). *ospE* et *ospF* sont situés sur les plasmides de la famille des cp32 et sont les fondateurs du groupe des Erps, pour OspE-F related proteins. Les protéines encodées par ces gènes sont surtout exprimées pendant le repas sanguin et lors du passage des spirochètes dans l'hôte (Hefty *et al.*, 2001). Certaines sont impliquées dans l'évasion du système immunitaire en inactivant le système complément de l'hôte (Hellwage *et al.*, 2001). Finalement, *ospC*, sur lequel porte cette étude, est impliqué dans la dissémination des spirochètes chez l'hôte (Lagal *et al.*, 2006; Seemanapalli *et al.*, 2010) mais aussi chez la tique (Fingerle *et al.*, 2002; Goettner *et al.*, 2006; Fingerle *et al.*, 2007). Nous reviendrons sur ce gène au chapitre 1.6.

1.4 Le vecteur

Toutes les espèces de borrélioses présentées jusqu'ici circulent donc dans l'environnement grâce aux tiques du genre *Ixodes*. De la classe des *Arachnida*, de l'ordre des *Ixodida* et de la famille des *Ixodidae*, au moins 18 espèces de tiques sont capables d'acquérir et/ou de transmettre *B. burgdorferi* s.l (tableau 1), mais toutes ne contribuent pas de manière égale à la maintenance de l'agent pathogène dans la nature. Ainsi, les principaux vecteurs sont *I. pacificus*, à l'ouest des Etats-Unis, *I. scapularis* à l'est, *I. ricinus* en Europe et *I. persulcatus* en Eurasie (fig. 1), de par leur compétence vectorielle élevée, leur importance médicale (l'Homme est majoritairement parasité par ces espèces) et de par leur dominance sur les autres espèces dans le paysage de la borréliose de Lyme. La présence de spirochètes a aussi été détectée chez d'autres espèces de tiques, ainsi que chez certains insectes hématophages, tels que des moustiques ou des tabanidés (Eisen et Lane, 2002), mais aucune capacité vectorielle ne leur est imputée.

Ces vecteurs se développent en passant par quatre stades; l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte. Le passage entre chaque stade, de œuf à larve mis à part, nécessite un repas sanguin unique, qui constitue la phase de transmission des pathogènes. Les larves se nourrissent en deux à quatre jours environ, les nymphes en quatre à six jours et les femelles en sept à 10 jours (Gray, 2001).

Ce repas s'effectue en deux étapes. La phase d'engorgement lente, puis la phase rapide. Durant la première phase, qui représente plus des deux tiers du temps passé sur l'hôte, peu de sang est aspiré. Chez *I. ricinus*, la tique entreprend des changements physiologiques importants au niveau de l'intestin (Jacot, 2003) et des glandes salivaires (Leboulle *et al.*, 2002). L'intestin devient fonctionnel (Dunham-Ems *et al.*, 2009), une membrane péritrophique se forme (Zhu, 1991) et l'activité hémolytique débute (Franta *et al.*, 2010), pendant que les acini II et III des glandes salivaires se développent (Sauer *et al.*, 1995). Ces changements préparent la tique à la phase rapide, qui débute 24 à 48 heures avant la fin de repas sanguin. Elle constitue cependant l'essentiel de l'apport sanguin. La tique ingurgite une quantité de sang supérieure au volume du corps, en concentrant le repas sanguin et en sécrétant le surplus via les glandes salivaires. Arrivée à réplétion, la tique se détache et tombe au sol pour muer, un mois plus tard environ. La tique injecte de la salive tout au long du repas sanguin (Francischetti *et al.*, 2009). Cette salive possède de nombreuses propriétés facilitant le repas sanguin, comme des substances immunomodulatrices pour contrer la réponse immunitaire face au gorgement ainsi que des anticoagulants, dont certaines sont aussi mises à profit par les borrélioses, facilitant ainsi l'infection (Horka *et al.*, 2009).

A la différence des metastratiata qui s'accouplent généralement sur l'hôte, les mâles produisant du sperme après un repas sanguin seulement, les prostratiata, qui ne contiennent que le genre *Ixodes*, s'accouplent lors de leur rencontre, sur l'hôte ou au sol (Oliver *et al.*, 1974). Les mâles ne sont donc pas obligés de se nourrir pour féconder les femelles, mais peuvent toutefois prendre des repas sanguins frugaux. La femelle doit par contre prendre un repas sanguin conséquent pour la production d'œufs.

La recherche d'hôtes est passive. Ainsi, à l'exception des espèces endophiles, telles que *I. hexagonus* ou *I. uriae*, les individus grimpent sur la végétation et attendent le passage d'un animal pour le parasiter. Cette attente est toutefois ponctuée de phases de réhydratation. Les tiques redescendent au sol pour capter l'humidité ambiante grâce à des sels hygroscopiques sécrétés sur les pièces buccales par les acini I (Sauer *et al.*, 1995). Comme toutes les espèces du genre, *Ixodes* sp. complète un cycle triphasique. Tous les stades se laissent tomber de leurs hôtes pour muer au sol, ou pour pondre dans le cas des femelles, après chaque repas sanguin. Les individus mués recommencent ensuite la quête du prochain repas.

Introduction

Chaque stade possède son propre comportement lors de la recherche d'hôtes (Gigon, 1985). Les larves quêtent très proches du sol, les nymphes sur l'herbe et les petits buissons jusqu'à 30 centimètres environ et les adultes jusqu'à un mètre. Ces hauteurs sont directement liées à la résistance à la dessiccation de chaque stade et influencent ainsi aussi la distribution des trois stades sur leur gamme d'hôte. Les micromammifères rencontrent plus facilement les larves que les autres stades (Nilsson et Lundqvist, 1978). Les hôtes plus grands, tels que les hérissons, les lagomorphes, les écureuils ou les oiseaux sont exposés aux larves et aux nymphes, tandis que les grands mammifères sont fréquemment infestés par les trois stades (Morán Cadenas *et al.*, 2007a; Burri *et al.*, 2011), tel que le chevreuil (Vor *et al.*, 2010).

1.4.1 *Ixodes ricinus*

I. ricinus, la tique du mouton, est donc le principal vecteur de la maladie de Lyme en Europe (Gern et Humair, 2002). Elle est aussi la tique la plus fréquemment rencontrée du sud de la Finlande à Chypre, en passant du Portugal à l'Ukraine. Elle évolue dans les forêts de feuillus des régions climatiques tempérées présentant une forte humidité relative (80% et plus) (Gigon, 1985). Un sous-bois présentant un bon couvert végétal constitue l'habitat idéal (fig. 7). *I. ricinus* est généraliste, sa gamme d'hôtes comprenant plus de 300 espèces (Anderson, 1991), principalement des micromammifères et des petits oiseaux pour les larves; des hérissons, des écureuils, des lagomorphes, des lézards et des oiseaux pour les nymphes et des grands mammifères tels que les ongulés pour les adultes



Fig. 7 : Bois de l'Hôpital.
(O. Rais)

(Aeschlimann, 1972; Matuschka *et al.*, 1991). Le cycle complet dure généralement trois ans, à raison d'une mue, donc d'un repas sanguin par an (Randolph, 2004). L'activité d'*I. ricinus* est fortement dépendante de la météorologie; température, humidité et lumière principalement (Jouda *et al.*, 2004b; Jouda *et al.*, 2004a; Randolph, 2004; Morán Cadenas *et al.*, 2007b; Gern *et al.*, 2008). Elle débute généralement au printemps, dès que les températures dépassent sept degrés pour les nymphes et les adultes et plus de 10

degrés pour les larves, pour autant que l'humidité relative soit assez importante (Perret *et al.*, 2000). Elle se termine de la même manière au début de l'hiver, avec la chute des températures et la diminution de la période diurne. A ce moment, les tiques rentrent en diapause et se protègent du gel en s'enfouissant sous le couvert végétal (Gigon, 1985). *I. ricinus* est donc active du printemps à l'hiver, alternant entre les phases d'hydratation au sol, de quête sur la végétation et de repas sanguin sur un hôte. Lors de cette période, les activités d'hydratation et de quête des tiques sont directement influencées par le déficit de saturation de l'air. Plus il fait chaud et sec, plus les tiques doivent se réhydrater et moins elles restent en quête (Perret *et al.*, 2000). Cette influence du déficit de saturation sur le comportement d'*I. ricinus* dessine une courbe d'activité saisonnière sinusoïdale au fil des ans. Globalement, une forte densité de tiques est en quête au printemps, puis, alors que les températures estivales agissent sur le déficit saturation, une nette baisse d'activité est observée (Gern et Humair, 2002). Ce pic d'activité au printemps est parfois suivi par un autre pic en automne, au retour de températures et de taux d'humidité plus cléments (Gern et Humair, 2002). Il en résulte une courbe d'activité saisonnière unimodale lorsque seul le pic d'activité de printemps est observé, et bimodale lorsque il y a un deuxième pic en automne. L'infestation des hôtes ne correspond par contre pas entièrement à cette activité saisonnière, puisque les rongeurs semblent être infestés tout au long de la période d'activité, du mois de mars au mois de novembre, même lorsque les tiques ne sont pas en quête (Burri *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2012). Sur un site particulier (Kiesen, Berne), des tiques infestant des rongeurs ont été trouvées tout au long de l'hiver, alors qu'aucune tique n'était en quête (Burri *et al.*, 2011).

1.4.1.1 Infection d'*Ixodes* sp. par *B. burgdorferi* sl

Les relations entre les vecteurs et *B. burgdorferi* sl ont été et sont intensivement étudiées. Il est par contre délicat d'obtenir une image claire de toutes ces interactions, étudiées avec plusieurs espèces de vecteurs et de borrelies. Aux Etats-Unis, la principale espèce de spirochète touchant l'Homme est *B. burgdorferi* ss, transmise par *I. scapularis* et *I. pacificus*, tandis qu'en Europe, il s'agit de *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, mais aussi *B. burgdorferi* ss, toutes transmises par *I. ricinus* (tableau 1). Il sera donc question

Introduction

ici d'esquisser l'infection d'*Ixodes* sp. par *B. burgdorferi* sl en se basant sur la littérature concernant ces différents couples, avec une référence spéciale à *I. ricinus* et *B. afzelii*, les espèces concernées dans cette recherche.

La première exposition des tiques aux spirochètes a généralement lieu lors du premier repas sanguin des tiques, donc lors de l'engorgement des larves. Toutefois, une transmission transovarienne peut parfois être observée. Ainsi, des larves d'*I. ricinus* à jeun sont parfois infectées dans la nature par *B. afzelii* et *B. garinii* (Rijpkema et Bruinink, 1996; Bellet-Edimo *et al.*, 2005) et la même situation a été observée chez *I. scapularis* avec *B. burgdorferi* ss (Piesman *et al.*, 1986). La fréquence de ce type de transmission est toutefois très faible, l'étude de Bellet-Edimo et collaborateurs (2005) ayant observé une transmission transovarienne de *B. burgdorferi* sl par *I. ricinus* dans seulement 0.7% (3/447) des cas. Par contre, lorsqu'elle a lieu, son efficacité est élevée, puisque de 44% à 100% des larves étaient infectées, toujours selon la même étude (Bellet-Edimo *et al.*, 2005). Les larves à jeun sont donc majoritairement saines dans la nature. Fixées sur un hôte infecté, les larves vont ingurgiter des spirochètes, qui vont se loger dans l'intestin et se fixer à l'épithélium. Chez *I. scapularis*, il a été démontré que cette fixation est possible grâce entre autre à la protéine OspA, qui se lie au récepteur de la tique TROSPA, pour Tick Receptor OspA (Pal *et al.*, 2004a). La même interaction OspA-TROSPA n'a pas été démontrée chez *I. ricinus*. Cependant, ce gène TROSPA y est aussi présent, laissant à penser que la même interaction a lieu. Dans l'intestin, les spirochètes vont se multiplier pendant les jours suivant le repas sanguin (Gern *et al.*, 1990; Piesman *et al.*, 1990; Zhu, 1998b). Leur nombre chute ensuite lors de la mue, mais certains y survivent, ce qui permettra une transmission transstadiale (Zhu, 1998a). Il est intéressant de noter que ces spirochètes ne sont à ce moment pas infectieux pour l'hôte (Piesman, 1993; Crippa, 2003). Chez *I. ricinus*, l'injection de broyat de nymphes à jeun infectées ne provoque pas d'infection chez la souris, alors que des borrelies de culture sont infectieuses (Crippa, 2003). Les auteurs ont montré qu'il est nécessaire de nourrir les tiques pendant 24 heures ou de mettre en culture des tiques infectées pendant 24 heures au moins pour que les spirochètes deviennent infectieux, ce qui semble déclencher l'infectivité. Le même phénomène a aussi été observé chez *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss. (Piesman, 1993).

Pendant le repas sanguin suivant, les spirochètes des nymphes infectées entreprennent une multiplication dans l'intestin (Gern *et al.*, 1990; Piesman *et al.*, 1990;

De Silva et Fikrig, 1995; Gern *et al.*, 1996; Dunham-Ems *et al.*, 2009). Cette multiplication ne semble toutefois pas être constante tout au long du repas sanguin. Il semblerait qu'il y ait une diminution du nombre de spirochètes au début du repas sanguin, au point même de tomber au-dessous du seuil de détection par PCR, avant de remonter vers la fin du repas (Piesman *et al.*, 1991; Gern *et al.*, 1996; Zhu, 1998b). Certains spirochètes pourraient être perdus lors de l'excrétion, puisque des borrelies sont retrouvées dans les fèces de nymphes en gorgement (Gern *et al.*, 1996; Patton *et al.*, 2011b), ou être éliminés par le système complément de l'hôte arrivé dans l'intestin de la tique par exemple (Kurtenbach *et al.*, 2002). Les individus restants se mettent en mouvement et débute l'invasion de la tique en traversant l'intestin. Il y a à ce moment un changement dans l'expression de leurs protéines de surface, permettant de s'adapter aux nouvelles conditions et de se préparer à l'infection de l'hôte. OspA est généralement réprimée, permettant aux spirochètes de se détacher des épithéliums, tandis qu'OspC est fortement exprimée (Fingerle *et al.*, 1995; Fingerle *et al.*, 2002). Les spirochètes envahissent la nymphe et un certain nombre d'entre eux atteignent les glandes salivaires. Leur présence n'y est généralement pas détectée avant 24 heures de repas sanguin pour *I. ricinus* (Gern *et al.*, 1996; Crippa *et al.*, 2002), tandis qu'il faut près de 48 heures de repas chez *I. scapularis* pour que *B. burgdorferi* ss les atteigne (Piesman *et al.*, 1987; Ribeiro *et al.*, 1987). La transmission de la maladie de Lyme ne peut donc s'effectuer qu'après ce temps de migration. Toutefois, des infections à *B. afzelii* ont été observées en laboratoire après seulement 17 heures de repas sanguin (Kahl *et al.*, 1998) et dès 24 heures pour *B. burgdorferi* ss avec *I. scapularis* (Piesman *et al.*, 1987), indiquant soit que la migration peut être plus rapide dans certains cas, soit que les tiques utilisées étaient déjà infectées de manière systémique, ce qui pourrait accélérer le temps avant transmission, des spirochètes pouvant déjà se trouver dans les glandes salivaires.

Bien que capables de s'attacher à tous les acini, il semblerait que *B. burgdorferi* ss ne pénètrent généralement que les acini II et III (Dunham-Ems *et al.*, 2009). Seulement, des spirochètes peuvent être observés dans les acini I d'*I. ricinus* à jeun, ainsi que lors du gorgement (Gern *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1992a; Zhu *et al.*, 1992b; Gern *et al.*, 1996). Par contre, la majorité des infections sont tout de même localisées dans les acini II et III. Il se pourrait que l'invasion des glandes salivaires soit dépendante de l'espèce de tique ou de spirochète, ou alors que les observations faites chez *I. ricinus* soient liées à un

Introduction

comportement de refuge lorsque les acini II et III s'atrophient lors de la mue. Ces observations pourraient aussi simplement être expliquées par l'anatomie de la tique. Les acini I sont situés dans la partie antérieure des glandes et ne sont pas en contact direct avec l'intestin. Les acini II et III, par contre, y sont très souvent accolés, surtout lors du repas sanguin, puisque, et les acini et l'intestin, prennent du volume. Les spirochètes rencontreraient donc plus facilement ces deux derniers types.

Une fois dans les glandes salivaires, les spirochètes influencent l'expression de la protéine salivaire SALP15 d'*I. scapularis* (Ramamoorthi *et al.*, 2005) ou SALP15 Iric-1 chez *I. ricinus* (Hovius *et al.*, 2007; Hovius *et al.*, 2008), qui a un effet immunosuppresseur (Anguita *et al.*, 2002; Hovius *et al.*, 2007; Marchal *et al.*, 2011), et se l'accaparent grâce à OspC (Ramamoorthi *et al.*, 2005; Hovius *et al.*, 2007; Hovius *et al.*, 2008; Schuijt *et al.*, 2008) avant d'être transportés dans l'hôte avec la salive (Ribeiro *et al.*, 1987; Gern *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1990; De Silva et Fikrig, 1995). Dans l'hôte, cette même OspC lie le plasminogène (Lagal *et al.*, 2006), afin de faciliter sa migration dans les tissus, tandis que des Erps sont exprimées, afin de contrer le système complément de l'hôte (Stevenson *et al.*, 2002). Les spirochètes commencent alors l'invasion de l'hôte et répriment l'expression d'*ospC* pour éviter la réponse immunitaire dirigée à son encontre, tandis que d'autres sont ré-ingurgités par les nymphes. Ce mécanisme se répètera avec la femelle (fig. 8).

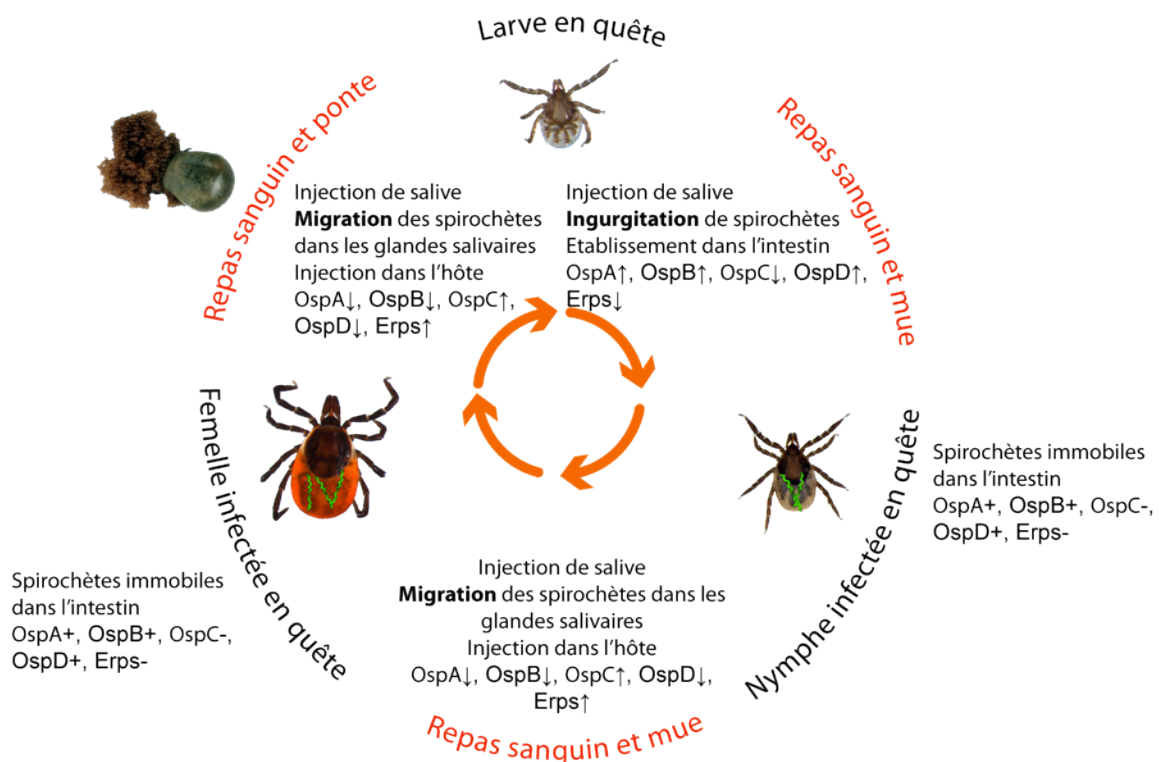


Fig. 8 : Cycle d'*Ixodes* sp. et de *B. burgdorferi* sl (N. Tonetti).

D'autres voies d'infections viennent encore se greffer à cette description. Il y a la transmission sexuelle, du mâle à la femelle, lors de la copulation (Alekseev *et al.*, 1999). Cette dernière a été démontrée chez *I. persulcatus* et *B. garinii*, mais ne semble pas avoir lieu avec *B. afzelii*. Finalement, il y a la transmission par co-feeding, ou de tique à tique (Gern et Rais, 1996). Lorsque plusieurs individus se nourrissent en même temps et proches les uns des autres, les spirochètes peuvent passer d'un individu infecté à un individu sain, sans pour autant que l'hôte soit infecté ou le devienne. Dans ce type de transmission, qui contribue à la prévalence de tiques infectées dans la nature (Randolph *et al.*, 1996), l'hôte n'est qu'un support pour les tiques. Il permet aux larves généralement non infectées de s'infecter, même lorsque l'hôte ne l'est pas. La principale composante importante pour la maladie de Lyme est la spatialité. Il faut que larves et nymphes se nourrissent proche les unes des autres pour qu'il y ait transmission (Gern et Rais, 1996; Randolph *et al.*, 1996). Toutefois, la temporalité est aussi importante, puisque les nymphes et les larves doivent se nourrir sur le même hôte dans un laps de temps court. Ainsi, ce type de transmission ne peut avoir lieu que lorsque les conditions climatiques induisent des pics d'activités des larves et des nymphes proches dans le temps. Cette transmission par co-feeding est aussi valable entre nymphes et avec des adultes.

Bien que le stade présentant la plus grande prévalence d'infection soit le stade adulte, puisque la transmission transtadiale a un effet cumulatif, les nymphes constituent le stade le plus important dans la transmission de la maladie à l'Homme (Piesman et Gern, 2004). En effet, les nymphes sont beaucoup plus fréquentes que les adultes dans la nature et peuvent se dissimuler sur le corps plus facilement que les adultes, et ainsi avoir le temps d'injecter des spirochètes.

1.5 L'hôte

Plus de 300 espèces de vertébrés peuvent donc nourrir *I. ricinus* et ainsi contribuer au maintien du parasite (Anderson, 1991). Cette tique a dès lors de fortes chances de compléter son cycle, ses repas sanguins pouvant s'effectuer autant sur des mammifères que des oiseaux ou des reptiles. Le choix de l'hôte est fonction de la hauteur de quête de chaque stade et de la préférence pour une espèce donnée (chapitre 1.4).

Introduction

Bien que le choix de candidats pour un repas soit immense, et qu'*I. ricinus* puisse infester une grande variété d'hôtes, tous ne contribuent pas directement au cycle de *Borrelia* sp. Certains hôtes sont réfractaires aux spirochètes (Kurtenbach *et al.*, 2002; Kurtenbach *et al.*, 2006). Ils ne participent donc pas directement au maintien des spirochètes dans la population de tiques, mais sont indirectement liés au cycle de la maladie de Lyme, puisqu'ils permettent au vecteur de se nourrir. Toutefois, certains de ces hôtes peuvent servir de support pour une transmission par co-feeding et ainsi participer tout de même à l'infection des tiques, ce qui est le cas du mouton (Ogden *et al.*, 1997). Finalement, certains ongulés et certains lézards peuvent même avoir une influence négative sur la prévalence d'infection des tiques, puisque leur système immunitaire est capable d'éradiquer les spirochètes se trouvant dans une tique en cours de repas sanguin (Gern et Humair, 2002; Kurtenbach *et al.*, 2006). Ces animaux sont nommés hôtes zooprophyllactiques (Gern et Humair, 2002). Les hôtes dits réservoirs, qui peuvent maintenir l'agent pathogène, donc qui sont susceptibles d'être infectés et qui sont ensuite infectieux pour les tiques au cours de leur vie, sont les animaux importants dans le cycle de vie des spirochètes (Gern *et al.*, 1998a).

1.5.1 Réservoirs de *Borrelia* sp.

D'une manière générale, les principaux hôtes réservoirs de *Borrelia* sp. en Europe sont les rongeurs, tels que les campagnols, mulots, rats, écureuils, loirs et lérots; les petits insectivores comme les musaraignes et les hérissons; les lagomorphes ainsi que les oiseaux, tels que nombre de passereaux ou les faisans (Gern *et al.*, 1998b). Les oiseaux de mer sont aussi impliqués dans le maintien de *Borrelia* sp., mais surtout par l'intermédiaire de la tique *I. uriae* (Olsen *et al.*, 1995). Tous ces hôtes réservoirs ne contribuent cependant pas de la même manière à la dynamique de transmission de *Borrelia* sp. Une protection spécifique contre les tiques et/ou les spirochètes propre est observée, ce qui modifie la compétence de réservoir (Humair *et al.*, 1999). Ainsi par exemple, les campagnols sont plus fréquemment infectés par *B. afzelii* que les mulots, ils démontrent une infectivité pour les tiques plus élevée que les mulots, mais génèrent au final moins de tiques infectées, car le taux de succès de mue est plus faible que chez les mulots (Humair *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2012).

Cette compétence de réservoir dépend aussi fortement de l'espèce de pathogène. Le système immunitaire des hôtes, autant le système immunitaire inné que le système acquis, exerce une pression sur les spirochètes, qui possèdent des stratégies pour le contourner. Le système complément est le premier acteur de cette réponse. Il est évité par les borréliés grâce aux protéines CRASP (Complement Regulator-Acquiring Surface Protein), de la famille des Erps. En fixant entre autre le facteur H, ces protéines empêchent la formation du complexe protéique responsable de la destruction de l'organisme étranger (Hellwage *et al.*, 2001; Kraiczy *et al.*, 2001; Herzberger *et al.*, 2007). Par la suite, la réponse immunitaire acquise réagit aussi et cible les protéines de surface exposées par les borréliés, dont OspC, qui est fortement antigénique. Les borréliés contournent la réponse immunitaire par une répression de l'expression d'OspC, comme décrit au chapitre 1.6.2.

Il apparaît aussi que certaines génoespèces sont plus à même de combattre les défenses de certains hôtes que d'autres (Kurtenbach *et al.*, 1998). Alors que *B. burgdorferi* ss semble capable de déjouer autant les défenses immunitaires des oiseaux que des mammifères, *B. garinii* et *B. valaisiana* évitent facilement la réponse immunitaire des oiseaux, alors que cette dernière est très efficace contre *B. afzelii*. Il en découle que la majorité des tiques infectées récoltées sur des oiseaux sont porteuses de *B. garinii* et *B. valaisiana*. A l'inverse, *B. afzelii* infecte aisément les rongeurs, mais pas *B. garinii*. Les oiseaux contribuent donc surtout au maintien de *B. garinii*, tandis que les rongeurs et les insectivores participent majoritairement à la circulation de *B. afzelii*. La clef pour cette sélection serait justement le système complément, qui constitue la première ligne de défense des hôtes (Kurtenbach *et al.*, 2002).

1.6 Le gène *ospC*

Le gène *ospC*, ou BBB19 sur le génome, est contenu dans le plasmide circulaire cp26, ou des homologues cp27 pour *B. afzelii* pKo et cp28 pour *B. bavariensis* PBi. Ses 640 paires de bases, environ, codent pour la protéine OspC, qui est une lipoprotéine d'environ 220 acides aminés, pesant 22kDa (Eicken *et al.*, 2001; Kumaran *et al.*, 2001). Chaque dimère est composé de 5 hélices α et de 2 feuillets β (fig. 9). OspC possède 1 région semi-variable et 2 régions variables qui correspondent à l'épitope de la protéine

Introduction

(annexe 9.1) (Livey *et al.*, 1995), ce qui le rend fortement polymorphique—les homologies de séquences allant de 100% à seulement 55% (Fukunaga et Hamase, 1995; Jauris-Heipke *et al.*, 1995; Marti Ras *et al.*, 1997). La protéine OspC a un fort pouvoir antigénique et a été extensivement étudiée comme candidate potentielle pour le développement d'un vaccin (Preac-Mursic *et al.*, 1992; Gilmore *et al.*, 1996; Wilske *et al.*, 1996). Seulement, l'immunisation de souris avec OspC ne les protège que pour l'allèle incriminé (Probert *et al.*, 1997; Earnhart et Marconi, 2007). Il n'y a pas d'immunité croisée pour les différents allèles, et elle disparaît après un certain temps (Gilmore *et al.*, 2003).

Elle forme, avec la protéine OspA, un cas d'école d'expression différenciée. Dans l'intestin d'une tique à jeun, la population de spirochètes exprime majoritairement OspA. Cette protéine a la faculté de se lier avec un récepteur de l'épithélium intestinal,

TROSPA, pour Tick Receptor of OspA (Pal *et al.*, 2004a), ce qui permet aux spirochètes la colonisation de l'intestin. Dans cette situation, le gène *ospC* est généralement silencieux (Barbour *et al.*, 1983; Fingerle *et al.*, 1995; Schwan *et al.*, 1995). Son expression est par contre élevée chez les borrélioses retrouvées dans l'hémolymphe et dans les glandes salivaires (Fingerle *et al.*, 1995). *ospC* n'est en fait exprimé généralement qu'après le début du repas sanguin, suite aux changements qui interviennent dans l'intestin, tels que les variations en nutriments, les changements de température ou de pH (Cluss et Boothby, 1990; Carroll *et al.*, 1999), alors que le gène *ospA* est réprimé par ces mêmes signaux (Fingerle *et al.*, 1995; Schwan et Piesman, 2000; Ohnishi *et al.*, 2001). Il est par ailleurs possible d'induire l'expression d'*ospC* en culture, en augmentant la température du milieu à 37°C (Ojaimi *et al.*, 2003). L'expression du gène *ospC* perdure dans les glandes salivaires, ainsi que lors des premiers jours chez l'hôte (Leuba-Garcia *et al.*, 1998), avant d'être réprimée pour éviter la réponse immunitaire dirigée à son encontre (Liang *et al.*, 2002; Crother *et al.*, 2004). Ces observations concernent une population de spirochètes, donc une moyenne d'expression. Individuellement, certains spirochètes n'expriment pas la protéine

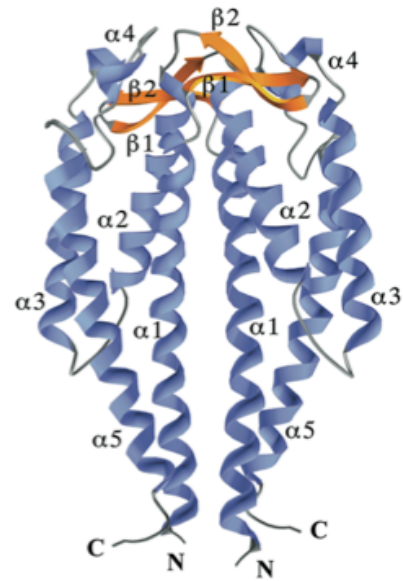


Fig. 9 : Représentation 3D de la protéine de surface C de *B. burgdorferi* ss. souche N40 (Eicken *et al.*, 2001)

peuvent tout de même se trouver dans les glandes salivaires et à l'inverse, des spirochètes exprimant *ospC* sont retrouvés dans l'intestin (Ohnishi *et al.*, 2001).

1.6.1 Fonction d'OspC

De par cette expression différenciée, la nature antigénique de la protéine OspC et sa grande variabilité, il a été supposé qu'elle pouvait être un facteur influençant la colonisation de la tique et de l'hôte (Schwan, 2003). De nombreuses études se sont penchées sur son action sur le cycle de vie du parasite et ont démontré qu'OspC est nécessaire pour l'infection de l'hôte (Grimm *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2004b; Tilly *et al.*, 2006). Elle n'est par contre pas impliquée lors du passage de l'hôte à la tique, puisque comme il a été décrit au chapitre précédant, le système immunitaire de l'hôte réagit rapidement à son contact. La protéine n'est donc pas exprimée lors d'infections systémiques et n'est par conséquent pas présente lorsqu'une tique ingurgite des spirochètes (Schwan et Piesman, 2000). Ces mêmes études ont aussi montré qu'elle est requise par *B. afzelii* pour envahir *I. ricinus* (Fingerle *et al.*, 2002; Goettner *et al.*, 2006; Fingerle *et al.*, 2007). Cette dernière relation est cependant moins claire chez *B. burgdorferi* ss et *I. scapularis*. Alors que certains soulèvent la nécessité de la présence d'OspC pour envahir les glandes salivaires (Gilmore et Piesman, 2000; Pal *et al.*, 2004b), l'équipe de P. Rosa (Grimm *et al.*, 2004; Tilly *et al.*, 2006) conclut qu'OspC n'est pas nécessaire pour la migration dans la tique, puisque les souches transformées n'exprimant pas la protéine migrent dans les glandes salivaires dès 48 heures de repas sanguin. Plusieurs explications sur cette contradiction ont été proposées, dont les différences dans la méthodologie, entre les souches utilisées et les transformations génétiques effectuées, mais la controverse n'est aujourd'hui toujours pas résolue (Radolf et Caimano, 2008).

Récemment, de nouveaux résultats ont fait apparaître une approche différente du problème (Radolf et Caimano, 2008; Xu *et al.*, 2008a; Tilly *et al.*, 2009). Au moment de l'infection d'un hôte par une tique ou par injection sous-cutanée, les mutants n'exprimant pas OspC sont très vite éliminés, tandis qu'ils sont capables d'infection et d'invasion lorsqu'ils sont transplantés d'une souris infectée à une souris saine par transplantation de tissus infectés (Tilly *et al.*, 2009). Comme les spirochètes n'expriment

Introduction

plus OspC lorsqu'ils sont établis dans l'hôte, la protéine aurait donc une fonction de protection contre la première réponse immunitaire acquise, ce qui la rend indispensable pour l'infection de l'hôte, mais pas pour le long terme. Sa répression, lorsque le système immunitaire inné exerce une pression à son encontre, amène aussi un fort changement antigénique des spirochètes, permettant l'évasion du système immunitaire. Toutefois, cette fonction peut artificiellement être remplacée par d'autres Osps, telles que OspA ou OspE ou encore VlsE chez des mutants n'exprimant pas OspC, mais surexprimant l'une de ces trois autres protéines de surface (Xu *et al.*, 2008a; Xu *et al.*, 2008b). Dans ces études, des mutants n'exprimant pas OspC sont rapidement éliminés de l'hôte. Par contre lorsque ces mêmes mutants surexpriment d'autres protéines de surface (OspA, OspE ou VlsE), l'infectivité est restaurée. Ces auteurs expliquent que comme OspC est une protéine fortement exprimée lors du passage du vecteur à l'hôte, son absence pourrait conduire à une instabilité de la membrane externe. Elle aurait donc ainsi un rôle de maintien de l'intégrité de la membrane externe, permettant de résister aux attaques de l'hôte, plutôt qu'une action réellement indispensable, tout en créant une diversion de la réponse immunitaire. Ces études ont aussi confirmé un deuxième rôle à cette protéine, celui de facteur de dissémination chez l'hôte (Xu *et al.*, 2008a; Seemanapalli *et al.*, 2010). Alors que les mutants développés par Xu et collaborateurs (2008) n'exprimant pas OspC mais surexprimant d'autres Osps sont à nouveau capables d'infection sur le long terme, ils ne se disséminent pas aussi vite que les mutants dont l'expression d'OspC est restaurée. Les mutants développés par Seemanapalli et collaborateurs (2010) expriment eux une protéine tronquée, qui ne change ni le nombre de spirochètes retrouvés dans les tissus, ni la ID50, la dose provoquant 50% d'infection. Par contre, cette protéine tronquée affecte fortement la dissémination. Les souches exprimant une OspC tronquée envahissent les sites distants (cœur et articulations tibio-tarsales) beaucoup plus tardivement que la souche exprimant la protéine entière.

Dès lors, quelles sont les fonctions d'OspC? Depuis l'élucidation de sa structure, il a été émis qu'elle pouvait être une protéine de liaison, de par sa ressemblance avec le récepteur à l'aspartate de *Salmonella typhimurium* (Eicken *et al.*, 2001; Kumaran *et al.*, 2001). Cette supposition a été confirmée par plusieurs études, qui ont démontré l'affinité d'OspC pour le plasminogène et pour une protéine immunomodulatrice de la salive de tiques, SALP15 chez *I. scapularis* et son homologue SALP15 Iric-1 chez *I. ricinus*

(Ramamoorthi *et al.*, 2005; Lagal *et al.*, 2006; Hovius *et al.*, 2008). Ces deux ligands, accaparés par les spirochètes, pourraient les aider à coloniser les tissus de l'hôte, puisque Salp15 leur permet d'éviter la réponse immunitaire de l'hôte (Schuijt *et al.*, 2008) et parce que le plasminogène, une fois activé en plasmine, permet d'envahir les tissus en agissant sur la fibrinolyse (Coleman *et al.*, 1997). Il a aussi été établi qu'OspC joue le rôle d'adhésine, en permettant la fixation des borrelies aux glandes salivaires, ce qui conforte l'idée de facteur facilitant aussi l'invasion de la tique (Pal *et al.*, 2004b). Même si la nécessité absolue d'OspC pour la migration des spirochètes dans la tique n'est pas démontrée, elle semble tout de même fortement l'influencer.

En résumé de ce chapitre, OspC possède deux caractéristiques chez l'hôte vertébré. Grâce à ses capacités de liaisons au plasminogène, OspC permet aux spirochètes de se disséminer dans l'hôte (Lagal *et al.*, 2006; Seemanapalli *et al.*, 2010), et en se liant à la protéine salivaire SALP15, elle confère aux spirochètes une capacité protectrice face au système immunitaire inné de l'hôte (Hovius *et al.*, 2008; Schuijt *et al.*, 2008). Chez la tique, son rôle d'adhésine permet la reconnaissance des glandes salivaires (Pal *et al.*, 2004b; Dunham-Ems *et al.*, 2009). Son action sur la migration depuis l'intestin jusqu'aux glandes salivaires est par contre toujours controversée, mais semble tout de même être un facteur important pour le passage de la tique à l'hôte.

1.6.2 *ospC* et invasivité

La grande diversité génétique du gène *ospC* a permis de classer les différents allèles *ospC* en groupes. Ainsi, 22 groupes *ospC*, nommés de A à V, ont été définis chez *B. burgdorferi* ss (Seinost *et al.*, 1999a; Wang *et al.*, 1999b; Baranton *et al.*, 2001) selon le postulat suivant : Au sein d'un groupe, la différence génétique entre allèles doit être de moins de 2% et pour être exclu d'un groupe, un allèle doit présenter plus de 8% de différences (Wang *et al.*, 1999b). A l'instar de *B. burgdorferi* ss, 14 groupes *ospC* ont été définis chez *B. afzelii*, de A1 à A14, et 22 chez *B. garinii*, de G1 à G22 (Baranton *et al.*, 2001) (fig. 10).

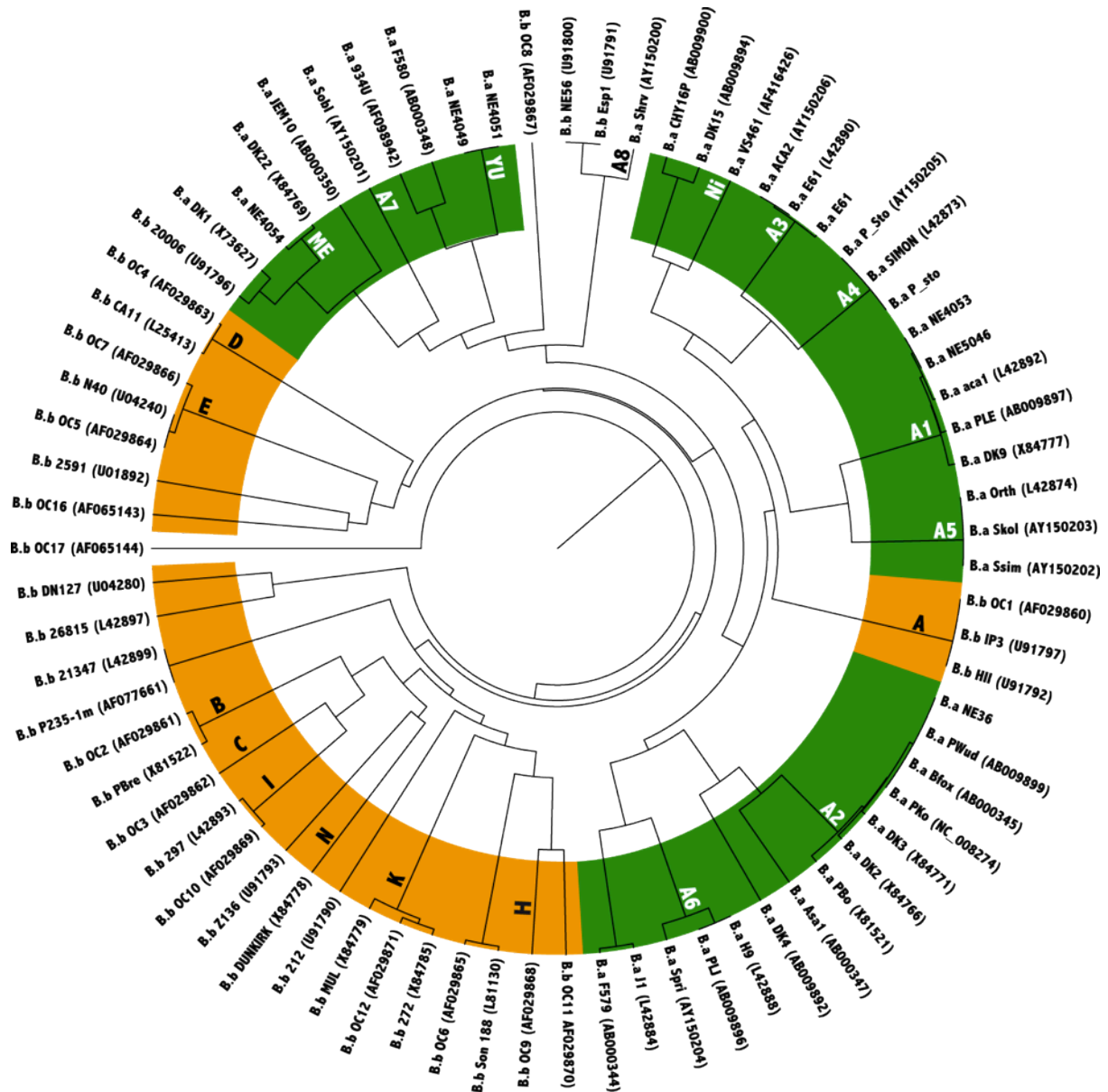


Fig. 10 : Dendrogramme (UPGMA) des groupes *ospC* invasifs chez *B. burgdorferi* ss et chez *B. afzelii* ainsi que le groupe non invasif (Ni) VS461. Sont annotés les groupes invasifs chez *B. burgdorferi* ss (A, B, C, D, E, H, I, K, N, en orange) ainsi que chez *B. afzelii* (A1-A8, en vert) (N. Tonetti).

Ces groupes ont aussi été confirmés par sérologie. Les anticorps dirigés contre un certain groupe se lient à toutes les protéines codées par les allèles du même ensemble, mais n'ont pas d'action sur les autres (Barthold, 1999).

Une étonnante corrélation est ressortie de ce classement d'allèles en groupes *ospC*. Les souches de patients présentant des infections systémiques, isolées depuis le liquide céphalo-rachidien et le sang, sont toutes regroupées dans certains groupes seulement (Seinost *et al.*, 1999a). Les isolats inclus dans ces groupes sont dès lors

considérés comme étant invasifs, tandis que les souches isolées lors d'infections localisées se regroupent en des ensembles dits non-invasifs. Finalement, les souches isolées depuis les tiques et ne correspondant à aucun des groupes invasifs ou non-invasifs forment des groupes dont le caractère est inconnu. Ainsi, seuls les isolats contenus dans les groupes A, B, C, D, E, H, I, K et N sont invasifs chez *B. burgdorferi* ss (Seinost *et al.*, 1999a; Earnhart *et al.*, 2005; Dykhuizen *et al.*, 2008). Chez *B. afzelii*, seuls les groupes A1 à A8 contiennent des isolats invasifs (Baranton *et al.*, 2001; Lagal *et al.*, 2002; Lagal *et al.*, 2003). Cette corrélation doit toutefois être pondérée. Lors des études de Seinost et collaborateurs (1999) et de Baranton et collaborateurs (2001), seuls les groupes A, B, I et K chez *B. burgdorferi* ss ainsi que A1 et A2 chez *B. afzelii* contenaient des isolats invasifs. Depuis, des isolats appartenant à des groupes alors considérés comme étant non-invasifs ont été isolés depuis des sites distants. Le manque d'informations sur les génotypes rarement rencontrés chez l'Homme implique que cette catégorisation liant allèles et infections systémiques doit être assouplie. Certains génotypes seraient simplement plus à même de se disséminer que d'autres (Alghaferi *et al.*, 2005; Dykhuizen *et al.*, 2008; Wormser *et al.*, 2008). Cette modération est confirmée par Strle *et al.* (2011). Ces auteurs ont observé de fortes différences dans l'invasivité et dans la réponse inflammatoire provoquée par différents groupes *ospC* invasifs de *B. burgdorferi* ss. Ainsi, les groupes invasifs A et I sont les plus virulents, tandis que les groupes D, E, K et N sont associés avec une plus faible réponse inflammatoire et un comportement moins virulent, tout en étant capables de dissémination (Strle *et al.*, 2011).

Pour résumer ce chapitre, seuls certains génotypes semblent donc capables de créer des infections systémiques chez l'Homme (Seinost *et al.*, 1999a). Ils peuvent être regroupés en fonction de la diversité génétique d'*ospC* (Seinost *et al.*, 1999a). *OspC* est exprimée lors de l'invasion systémique de la tique et lors du passage chez l'hôte (Fingerle *et al.*, 2002; Grimm *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2004b; Goettner *et al.*, 2006; Tilly *et al.*, 2006; Fingerle *et al.*, 2007). Elle a une fonction d'adhésion aux glandes salivaires et est impliquée dans la migration des spirochètes des intestins jusqu'à ces dernières (Pal *et al.*, 2004b). Elle est indispensable structurellement pour l'infection de l'hôte (Radolf et Caimano, 2008; Xu *et al.*, 2008a; Tilly *et al.*, 2009). Elle participe à l'évasion de la réponse immunitaire acquise de l'hôte et favorise la dissémination des spirochètes dans les

tissus, entre autre grâce à sa capacité de liaison avec le plasminogène et SALP15 (Lagal *et al.*, 2006; Hovius *et al.*, 2008; Schuijt *et al.*, 2008; Seemanapalli *et al.*, 2010). Finalement, les protéines des groupes invasifs ont un potentiel électrostatique de surface fortement négatif, tandis qu'il l'est beaucoup moins pour les groupes *ospC* non-invasifs, ce qui peut affecter les interactions avec ses ligands et ainsi expliquer en partie les différents pouvoirs invasifs observés (Eicken *et al.*, 2001).

Le gène *ospC* est de ce fait un facteur influençant la dynamique globale de transmission des spirochètes.

1.7 Distribution des groupes *ospC* dans la nature

En raison de l'implication potentielle des groupes *ospC* sur la santé humaine, quelques études se sont intéressées à leur distribution dans la nature. Il apparaît que le nombre de groupes présents dans les tiques en quête est généralement plus élevé que chez les principaux hôtes réservoirs (Brisson et Dykhuizen, 2004; Pérez *et al.*, 2011). Il y aurait donc d'autres espèces d'hôtes que celles étudiées qui contribuent au maintien de ces groupes *ospC* qui n'infectent pas les principaux réservoirs connus. De plus, chez *B. burgdorferi* ss, chaque espèce d'hôte semble maintenir sa propre fraction de groupes *ospC* présents dans l'environnement (Brisson et Dykhuizen, 2004; Brisson et Dykhuizen, 2006). Finalement, la diversité locale des groupes *ospC* serait généralement égale à la diversité globale (Wang *et al.*, 1999b; Bunikis *et al.*, 2004). La grande diversité du gène *ospC* ne serait donc pas liée à un phénomène spatial, mais à un mécanisme local permettant le maintien de tous ces génotypes au sein d'un même système. Cependant, Pérez et collaborateurs (2011) ont récemment observé des différences significatives dans la distribution des groupes *ospC* entre deux terrains d'études, tous deux situés en Suisse. Ces différences ne seraient par contre pas forcément liées à une composante géographique, mais au fait qu'une transmission par co-feeding était beaucoup plus fréquente dans un terrain que dans l'autre. Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que la transmission par co-feeding pourrait être un facteur influençant aussi la distribution des groupes *ospC* au niveau local.

Alors qu'il apparaît que certains génotypes sont plus virulents que d'autres, une telle hétérogénéité locale ne peut être maintenue que grâce à une pression de sélection

balançante, appliquée par le système immunitaire. Deux théories évolutionnistes semblent être à même d'expliquer cette grande diversité. Il y a la sélection de niche et la sélection négative dépendant de la fréquence (Brisson et Dykhuizen, 2006). Pour la première, chaque espèce d'hôte maintiendrait une fraction des groupes *ospC* seulement, sélectionnés par le système complément et par le système immunitaire adaptatif. La diversité du gène *ospC* serait dans ce cas intimement liée à la diversité des hôtes. Pour la théorie dépendante de la fréquence, un groupe *ospC* rare posséderait un avantage sur un génotype fréquent. Il aurait donc tendance à devenir fréquent et deviendrait alors désavantagé. Cette sélection-ci serait principalement liée au système immunitaire acquis, une infection par un certain groupe *ospC* induisant une protection contre les infections ultérieures avec le même groupe (Bockenstedt *et al.*, 1997; Barthold, 1999). Dès lors, un groupe *ospC* fréquent immuniserait la plupart des hôtes l'entourant et ainsi deviendrait moins compétitif face aux autres groupes *ospC*. Ces deux théories ne sont pas exclusives et pourraient toutes deux participer à la diversité des groupes *ospC* observée dans la nature.

1.8 Problématique

Comme nous l'avons vu, la maladie de Lyme se décline en plusieurs symptômes, certains pouvant amener à de graves troubles de santé lors d'infections disséminées. Cette capacité des borrelies d'envahir les tissus de l'Homme ne semble pas tant dépendante de l'espèce, mais plutôt du génotype, puisque des souches invasives sont rencontrées au moins dans les trois principales espèces l'infectant (*B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* et *B. garinii*). Toutes les souches n'ont donc pas l'apanage de provoquer des infections systémiques, mais seules celles arborant certains allèles *ospC*, qui est un facteur influençant le développement de la bactérie dans ce cycle complexe, incorporant tiques et vertébrés.

En résumé, le gène *ospC* influence la dynamique de transmission des spirochètes lors de leur transmission de la tique à l'hôte, en agissant sur la migration des spirochètes jusqu'aux glandes salivaires, condition *sine qua non* pour le passage dans la peau. Il est ensuite impliqué dans l'évasion des défenses développées par l'hôte, premièrement parce qu'il permet aux spirochètes d'intégrer des substances immunomodulatrices

Introduction

produites par le vecteur dans la salive grâce à *OspC*, et ensuite en réprimant cette protéine afin de se dérober face aux défenses acquises de son hôte. Avant de disparaître, elle participe justement à la dissémination dans les tissus, en se liant au plasminogène de l'hôte. Bien que d'autres gènes participent aussi à ces mécanismes, *ospC* est particulièrement intéressant de par sa grande hétérogénéité. Ses allèles sont distribués irrégulièrement dans l'environnement, entre les tiques et les hôtes. Une organisation complexe est continuellement effectuée, sous le joug de la diversité des hôtes et de leur système immunitaire, qui ne peut lutter que contre certains allèles, mais qui apprend au fur et à mesure des infections. Ces facteurs participent à une sélection balancée maintenant cette grande diversité allélique (Brisson et Dykhuizen, 2004; Brisson et Dykhuizen, 2006), qui semble aussi être influencée localement par la transmission par co-feeding (Pérez *et al.*, 2011). Ces trois études se sont penchées sur cette problématique dans le but de pouvoir prédire l'évolution de ces allèles et ainsi mieux évaluer les risques et lutter contre la maladie. Bien que des avancées considérables aient été faites, les effets de ce gène sur la dynamique globale des spirochètes restent obscurs. Il est donc important de connaître son influence sur les différentes voies de transmission des spirochètes afin d'affiner les prédictions. Bien que favorisant la dissémination et participant à l'évasion des défenses des hôtes, ses effets sur le passage du vecteur à l'hôte et sur la migration dans les glandes salivaires ne sont pas entièrement connus.

Si seuls certains génotypes sont capables de créer ces infections sévères, et que *ospC* en est en partie responsable, qu'en est-il de son action sur la dynamique globale de transmission tique-hôte-tique?

L'objectif de cette étude est donc de définir si l'appartenance d'un isolat à un groupe *ospC* influence sa dynamique de transmission et donc la distribution de ces différents génotypes dans la nature.

2 Matériel et méthodes

L'évaluation de la dynamique de transmission de *B. afzelii* en fonction des groupes *ospC* se base sur la prévalence d'infection des hôtes, leur infectivité ainsi que sur le temps de latence avant transmission. Un système biologique, ou système expérimental permettant aux borrelies la réalisation d'un cycle complet est donc nécessaire pour évaluer ces capacités et a été mis en place entre le pathogène *B. afzelii* (souchier de l'Université de Neuchâtel et de l'Institut Pasteur, chapitre 2.1), le vecteur *Ixodes ricinus* (élevage de l'Université de Neuchâtel, chapitre 2.2) et la souris (souche Balb/c immunocompétente, élevage de l'Université de Neuchâtel, chapitre 2.3).

2.1 *Borrelia afzelii*

Toutes les manipulations effectuées avec, et sur l'agent pathogène, ont été réalisées en accord avec l'ordonnance sur l'utilisation des organismes en milieu confiné (OUC) ainsi qu'avec la loi fédérale sur l'application du génie génétique au domaine non humain (LGG) sous l'autorisation, et ses notifications, No. A000621.

2.1.1 Provenance des isolats et culture de spirochètes

Dix-sept isolats de *B. afzelii* ont été utilisés lors de cette recherche (tableau 3). Parmi eux, en gras dans le tableau 3, neuf ont été insérés dans le système biologique, classés dans les groupes invasifs A1, A2, A3, A4 et A5 conformément au postulat de Wang et collaborateurs (1999), ainsi que dans les groupes ME et YU, ainsi nommés par Pérez *et al.* (2011), leurs séquences *ospC* les excluant des groupes connus jusqu'ici (chapitre 2.6.1).

Matériel et méthodes

Tableau 3 : Isolats utilisés lors de cette recherche.
Origine et provenance.

Isolats	Origine	Provenance
NE4053	Tique de xénodiagnose (Mg, B)	Université de Neuchâtel
NE4997	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
NE5022	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
NE5046	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
NE36	Biopsie (Mg, G)	Université de Neuchâtel
E61	Peau (EM, A)	Institut Pasteur, Paris
P/sto	Peau (ACA, Ae)	Institut Pasteur, Paris
Simon	Peau (EM, A)	Institut Pasteur, Paris
NE4045	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
NE4046	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
NE4047	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
NE5023	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
NE4052	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
NE4054	Tique	Université de Neuchâtel
NE4049	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
NE4051	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
NE4532	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel

A= Autriche; **ACA**= Acrodermatite chronique atrophiante; **Ae**= Allemagne;

As= *Apodemus sylvaticus*; **B**= Bois de l'Hôpital (Neuchâtel, Suisse);

EM= érythème migrant; **Mg**= *Myodes glareolus*; **G**= Glütschbachtal (Thoune, Berne, Suisse);

Tique= *I. ricinus*.

Ces isolats, mais dans une plus large mesure toutes les cultures de spirochètes effectuées, à partir d'une culture, de tiques, de biopsies ou de nécropsies, sont cultivés à 34°C. Les prélèvements depuis les souris sont plongés dans 4ml de milieu de culture BSK-H, modifié d'après Sinsky et Piesman (1989), tandis que les tiques sont placées dans 1ml de milieu seulement. La présence de spirochètes en culture est évaluée par microscopie à fond noir (Wild MD GA-10822) après cinq à sept jours de croissance, et jusqu'à un mois pour les biopsies et les nécropsies.

A une concentration approximative de 1 à 5x10⁷ spirochètes par millilitres estimée de visu au microscope à fond noir, les cultures sont soit repiquées à raison de 0.3ml de culture positive dans 4ml de milieu frais, soit conservées telles quelles à 4°C pour une courte durée, ou encore placées à -80°C en aliquote de 1ml pour une conservation plus longue.

Finalement, lors de la transformation de *B. afzelii* (2.1.5.2), la concentration cellulaire est déterminée par comptage des spirochètes à l'aide d'une cellule de Helber sous un microscope à contraste de phase.

2.1.2 Isolement et détection de spirochètes depuis l'hôte

L'isolement de spirochètes depuis les souris est effectué par mise en culture de biopsies d'oreilles et dans certains cas de nécropsies des articulations tibio-tarsales, du cœur et de la vessie (Sinsky et Piesman, 1989). Les biopsies consistent en 2mm² de tissu de l'oreille, préalablement désinfectée avec de l'éthanol 70%, et prélevé à l'aide de ciseaux de précision (Vannas 7.5cm - 3" droits, Medicon eG, Tuttlingen, Allemagne) après anesthésie de la souris (chapitre 2.3.2). Pour les nécropsies, l'ensemble des articulations tibio-tarsales, dégagées de la peau et des muscles, la vessie, ainsi que l'apex du cœur sont prélevés après euthanasie de l'animal. Les tissus récoltés sont brièvement immergés dans de l'éthanol 70% après dissection et sont immédiatement placés en culture (chapitre 2.1.2). La détection de spirochètes à partir des cultures de biopsies et de nécropsies s'effectue par observation directe d'une goutte de milieu de culture au microscope à fond noir, pendant un mois après le début de la culture.

2.1.3 Isolement et détection de spirochètes depuis le vecteur

L'isolement de spirochètes depuis les tiques est réalisé trois semaines après la mue des tiques arrivées à réplétion, et directement après le détachement de l'hôte lorsque celles-ci ont été retirées en cours de repas sanguin (chapitre 2.5.2). Pour éviter les contaminations du milieu de culture, les instruments sont désinfectés à l'éthanol 70% entre chaque tique avant leur dissection. Les tiques sont baignées dans de l'éthanol 70% pendant cinq minutes, puis laissées sécher sur un papier buvard. L'alloscutum est ensuite découpé à l'aide de ciseaux de précision de manière à exposer le contenu intestinal au milieu extérieur. Les tiques sont ensuite mises en culture dans cet état (chapitre 2.1.1) et sont laissées 10 jours à 34°C.

La détection des borrelies dans le vecteur s'effectue ensuite par PCR et RLB après une extraction d'ADN par thermolysat pour les isollements depuis les tiques (Jouda *et al.*, 2004). L'ADN a également été extrait directement à partir des tiques 1 mois après leur mue. Dans ce cas, l'extraction est faite à l'hydroxyde d'ammonium bouillant (Kirstein *et al.*, 1997). Les tiques sont plongées dans 100µl de NH₄OH dans un tube de 1.5ml et mis à 100°C pendant 15 minutes. Une autre session de 15 minutes suit la première avec cette

Matériel et méthodes

fois les tubes ouverts, afin de laisser le NH_4OH s'évaporer et réduire le produit à environ 30-40 μl .

Dans les deux cas, une amplification d'ADN de 400 paires de bases environ de la région intergénique située entre les gènes *rrfA* (5s rDNA) et *rrlB* (23s rDNA) a été effectuée selon Postic *et al.* (1994) et Alekseev *et al.* (2001). Finalement, l'identification des borrelies est réalisée grâce à une RLB, modifiée d'après Rijpkema *et al.*, (1995) et Schouls *et al.* (1999).

Une real-time PCR quantitative (qPCR) a aussi été effectuée sur certains échantillons selon Hermann et Gern (2010). Brièvement, une courbe standard a été créée par dilution d'une culture de spirochètes (10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 et 10^6 individus), après comptage de ces derniers grâce à une cellule de Helber. Le nombre de spirochètes par échantillon a ensuite été déterminé en fonction du nombre de cycles nécessaires au dépassement du seuil de détection, rapporté à la courbe standard.

2.2 Le vecteur

Toutes les manipulations effectuées avec les tiques ont été réalisées conformément à l'ordonnance sur l'utilisation des organismes en milieu confiné (OUC) sous l'autorisation No. A000621.

2.2.1 Elevage d'*Ixodes ricinus*

Le cycle d'*I. ricinus* est effectué en laboratoire avec des souris Swiss et des lapins NZW (New Zealand white, Crl:KBL). Des tiques adultes sont placées sur les oreilles de lapins pour leur repas sanguin. Après gorgement, elles sont conservées à température ambiante dans des tubes en verre de 2cm de diamètre et 4cm



Fig. 11 : Maintien des tiques en laboratoire. (N. Tonetti)

de hauteur contenant un papier buvard et fermés par un bouchon en plastique troué. Ces tubes sont entreposés dans des bacs en plastique fermés contenant de l'eau (fig. 11). Les larves ainsi obtenues après la ponte sont placées sur des souris swiss. Les larves gorgées sont récupérées dans les bacs d'eau (fig. 13) et placées dans des tubes en verre de 1.25cm de diamètre et

4cm de hauteur aux mêmes conditions que les adultes. Après la mue, les nymphes sont placées sur les oreilles de lapins et conservées dans les mêmes conditions que les larves. Les mâles sont séparés des femelles après la mue, puis replacés ensemble quelques jours avant le dernier repas sanguin.

2.2.2 Infection des tiques par capillaires

Pour obtenir des tiques infectées par un isolat connu de *B. afzelii*, une des méthodes a consisté à les infecter par capillaire. Les nymphes sont placées sur le dos sur une bande collante de manière à pouvoir appliquer un capillaire (GB120-TF 10, Science products GMBH, Hofheim, Allemagne) étiré grâce à un "electrode puller" (SRI Scientific & Research Instruments LTD, Endebridge, UK) sur leur rostre (fig. 12). Ces capillaires sont remplis avec du milieu de culture contenant un isolat connu de *B. afzelii*. Une fois le rostre introduit dans le capillaire, la nymphe est laissée entre 30 et 60 minutes sous une ampoule à incandescence pour simuler la chaleur de l'hôte. La tique est maintenue dans un bac humide. Une nymphe est considérée comme infectée à l'apparition d'une goutte fécale. Les nymphes infectées ainsi obtenues sont ensuite rincées à l'eau puis laissées au repos pendant 24 heures avant infestation d'une souris. Ces tiques infectées servent ensuite à infester une souris pour l'infecter (chapitre 2.3.3).



Fig. 12 : Nutrition par capillaires.
Femelles *I. ricinus*. (O. Rais)

2.3 L'hôte

Toutes les manipulations effectuées avec les animaux ont été réalisées en accord avec la loi fédérale sur la protection des animaux (LPA) et l'ordonnance sur la protection des animaux (OPAn), sous les autorisations No. 1/2006 et 2/2009, après une formation à l'expérimentation animale reconnue par l'Association Suisse des Vétérinaires cantonaux (ASV).

2.3.1 Entretien des animaux

Toutes les souris utilisées lors de ces expériences sont des Balb/c mâles immunocompétentes provenant de l'élevage de l'Université de Neuchâtel, âgées de 12 semaines environ au début de l'expérimentation. Chaque animal est gardé dans une cage individuelle de 267x207x140mm (type II) dès le début des expériences, avec une surveillance journalière pendant la semaine. Une inspection plus approfondie est faite lors de chaque changement de cage. Pendant les infestations (chapitre 2.3.3), les animaux sont transférés dans des cages de 100x200x130mm (type I), placées dans des bacs d'eau, ce qui attire les tiques arrivées à réplétion (fig. 13). A la fin des expériences, les animaux sont euthanasiés au gaz carbonique.



Fig. 13 : Récupération des tiques après infestation (N. Tonetti).

2.3.2 Anesthésie

Les souris sont anesthésiées avant chaque infestation par des tiques et avant chaque prélèvement d'une biopsie. Toutes les souris sont anesthésiées par une injection intra péritonéale d'un mélange de xylazine (Xylasol®, Dr E. Graeub AG, Berne, Suisse) et de kétamine (Narketan®, Vétoquinol AG, Berne, Suisse), à raison de 10 mg/kg de Xylasol® et 100 mg/kg de Narketan® (Buitrago *et al.*, 2008; Gaertner *et al.*, 2008), soit environ 30-

40µl de mélange par souris (1.5µl/gr). L'anesthésie dure environ 45 minutes. La profondeur de la narcose est évaluée en vérifiant l'absence de réflexe au test de retrait de la patte.

2.3.3 Infestation

Une souris saine est anesthésiée, puis son dos rasé pour y coller une capsule en plastique de 1.5cm de diamètre et 1cm de hauteur à l'aide d'un mélange de colophane et de cire d'abeille (4:1). Ces capsules possèdent une ouverture sur le dessus obstruée par de la bande adhésive après y avoir placé des nymphes (fig. 14). Des larves sont rajoutées deux jours après fixation des nymphes (j.2), permettant de simuler les conditions nécessaires au co-feeding. Dès que les larves sont fixées, la bande adhésive est retirée, permettant aux tiques repues de s'en échapper.

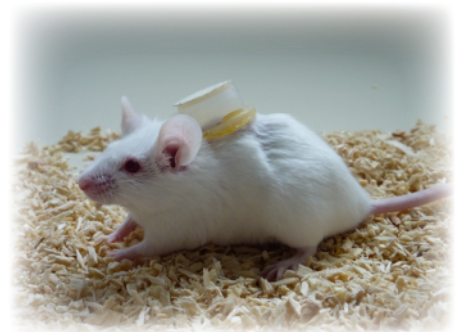


Fig. 14 : Balb/c mâle avec capsule en plastique collée sur le dos (N. Tonetti).

2.4 Dynamique de transmission par infection artificielle

2.4.1 Infection des souris par *B. afzelii*

Pour obtenir des souris infectées, les souris reçoivent soit une injection sous-cutanée de 0.2ml de milieu de culture contenant un isolat connu de *B. afzelii* à une concentration de $1-5 \times 10^7$ (Gern *et al.*, 1993) ou sont infestées avec des nymphes infectées par capillaires, ou encore par des nymphes infectées provenant de xénodiagnoses (chapitre 2.4.2, annexe 9.2).

2.4.2 Xénodiagnose

Pour vérifier l'infection des souris et leur capacité à transmettre l'infection aux tiques, une xénodiagnose a été effectuée 30 jours (j.30) après chaque infestation ou chaque injection sous-cutanée de spirochètes. Une centaine de larves non infectées provenant de l'élevage de l'institut est placée entre les oreilles de la souris sous anesthésie (annexe 9.2).

2.5 Dynamique de transmission par infection naturelle

Dans ce système biologique, toutes les infections de souris ont été effectuées grâce à des infestations avec des nymphes infectées lors d'un repas sanguin infectieux. Chaque tique ayant été analysée individuellement, des taux d'infection ont été obtenus pour chaque lot de tiques. Ces taux ont permis d'évaluer le nombre de nymphes nécessaires pour exposer les souris à environ trois nymphes infectées, chaque nombre ayant été arrondi à l'entier supérieur. Ainsi, cinq nymphes d'un même lot étaient placées sur une souris si 4.3 nymphes étaient nécessaires pour avoir une moyenne de trois tiques infectées, représentant un taux d'infection de 69.2%. Cette procédure a été utilisée pour toutes les infections effectuées par infestation avec des nymphes, que ces nymphes aient été infectées par capillaires ou lors d'un repas sanguin infectieux. Il sera seulement précisé par la suite dans ce manuscrit que les souris ont été infestées par trois nymphes infectées.

2.5.1 Prévalence d'infection, infectivité et co-feeding

Quatre souris saines par isolats ont été infestées, à raison donc de trois nymphes infectées par souris. Deux jours après cette infestation, les larves de co-feeding étaient ajoutées. Puis, un mois plus tard (j.30), une biopsie d'oreille et une xénodiagnose ont été effectuées (fig. 15, annexe 9.2). Les biopsies ont été contrôlées et une deuxième biopsie a été pratiquée 14 jours suivant la première si négative. Les taux d'infection des tiques ont été évalués en analysant treize tiques, de xénodiagnose ou de co-feeding, pour chaque souris.

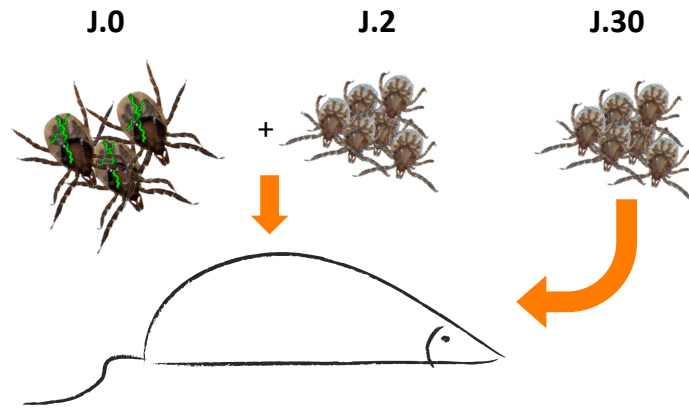


Fig. 15 : Illustration du système expérimental.

J.0 : Infestation avec trois nymphes infectées.

J.2 : Ajout de larves (simulation des conditions nécessaires au co-feeding)

J.30 : Infestation avec une centaine de larves.

(N. Tonetti).

Les taux d'infection ainsi obtenus ont permis d'évaluer pour chaque isolat la prévalence d'infection des hôtes, soit le nombre de souris infectée par un isolat. Pour les infections naturelles, le terme prévalence d'infection impliquera ici une notion dynamique d'efficacité de transmission de la tique à l'hôte. Ces taux ont aussi permis d'évaluer ensuite l'infectivité des hôtes infectés, soit la capacité d'un isolat de passer de l'hôte à la tique. Ici, ce terme englobera aussi une notion dynamique d'efficacité de transmission de l'hôte à la tique. Finalement, les taux d'infection des tiques de co-feeding ont permis d'estimer l'efficacité de transmission par co-feeding.

2.5.2 Temps de latence avant transmission de la tique à l'hôte et de l'hôte à la tique

La durée minimum d'attachement des tiques aux hôtes pour la transmission des différents isolats aux hôtes est évaluée comme suit : Trois nymphes infectées sont placées sur des souris saines constituant un groupe de cinq souris et deux groupes de quatre souris. Le premier groupe, de cinq souris, est infesté pendant 12 heures. Le

Matériel et méthodes

deuxième et le troisième, constitués de quatre souris par groupe, sont infestés pendant respectivement 24 et 32 heures. Ces nymphes sont retirées et directement mises en culture après l'interruption du repas sanguin (chapitre 2.1.3). L'infection des souris est déterminée un mois après l'infestation par biopsie et xénodiagnose.

Pour la durée minimum d'attachement de tiques saines pour s'infecter, les souris infectées lors des expériences précédentes sont infestées par des nymphes saines. Dix nymphes sont retirées pour chaque durée de repas sanguin, soit après 24, 32 et 48 heures d'attachement. Les tiques sont ensuite retirées et directement mises en culture (chapitre 2.1.3).

2.6 *ospC*

2.6.1 Détermination du groupe *ospC*

L'appartenance des isolats de *B. afzelii* aux groupes *ospC* est déterminée sur la base des homologies entre séquences du gène, soit grâce aux propriétés de conformation de l'ADN simple brin, grâce à la technique de la SSCP, pour "Single Strand Conformation Polymorphism" (chapitre 2.6.1.1), soit par séquençage partiel du gène (chapitre 2.6.1.2).

2.6.1.1 "Single Strand Conformation Polymorphism"

Chaque brin d'ADN, une fois séparé de son brin complémentaire, a tendance à s'apparier sur lui-même en fonction des complémentarités présentes au sein de sa séquence. Il en résulte une structure physique propre à chaque séquence, ou à des groupes de séquences très proches. La SSCP utilise ces propriétés de conformation de l'ADN simple brin afin de discriminer des séquences par migration sur gel d'acrylamide. Chaque ADN simple brin migrera donc de manière unique, permettant de différencier ou de regrouper des séquences en fonction des profils obtenus après électrophorèse et coloration à l'argent (fig. 16).

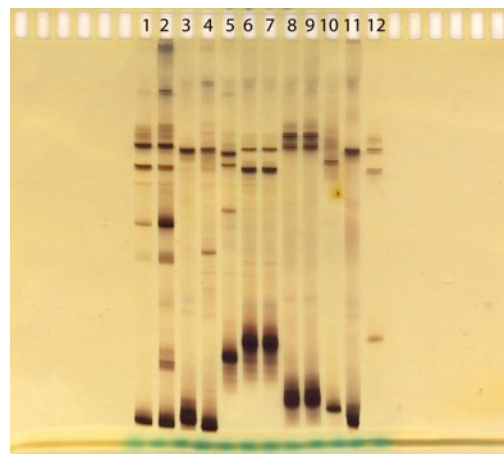


Fig. 16 : Profils SSCP des isolats utilisés pour cette recherche.

1=ME (NE4054); 2=ME (NE4054); 3=A4 (P/sto); 4=A3 (E61); 5=A5 (NE4046); 6=A1 (NE4053); 7=A1 (NE5046); 8=A2 (NE36); 9=A2 (NE36); 10=YU (NE4051); 11=A4 (Simon); 12=A1 (NE4997).

La SSCP est dans tous les cas effectuée à partir de cultures de spirochètes. Concrètement, après une extraction d'ADN par thermolysat, une amplification par PCR de 270 bases environ d'une partie variable du gène *ospC* est effectuée (Pérez *et al.*, 2011). Brièvement, l'ADN ainsi amplifié est soumis à une électrophorèse à froid sur un gel d'acrylamide 12.5% (GeneGel Excel 12.5/24 kit, GE Healthcare Europe GmbH, Otelfingen, Suisse) en utilisant l'unité d'électrophorèse GenePhor (Pharmacia biotech).

Matériel et méthodes

Les profils de migration ainsi obtenus sont ensuite révélés par coloration à l'argent selon les indications du fabricant (PlusOne™ DNA silver staining kit, GE Healthcare Europe GmbH, Otelfingen, Suisse).

2.6.1.2 Séquençage du gène *ospC*

Afin d'affiner les résultats obtenus par SSCP et pour comparer les variations génétiques existantes entre les isolats et les séquences déjà connues de la littérature, un séquençage partiel du gène *ospC* est effectué, comprenant les 270 bases amplifiées pour la SSCP.

Sur les 640 bases que contient le gène *ospC*, les 540 dernières bases sont amplifiées par PCR grâce aux amorces *OspC* 20m (5'- AAT AAT TCA GGG AAA GGT GG - 3') et *OspC* 210 (5'- AGG TTT TTT TGG ACT TTC TGC -3'), modifiées d'après Earnhart *et al.* (2005), selon les conditions suivantes (tableau 4, tableau 5) :

Tableau 4 : Mélange pour une réaction PCR de 50µl, d'après Earnhart *et al.* (2005).

Mix pour une réaction (50µl)	Volumes (µl)
H ₂ O	31.45
Tampon (10X)	5
dNTPs (10µM)	1
<i>OspC</i> 20m (10µM)	1
<i>OspC</i> 210 (10µM)	1
MgCl ₂ (25mM)	0.25
Taq (5U/µl)	0.3
ADN	10

Tableau 5 : Conditions nécessaires pour l'amplification du gène *ospC*.

Conditions	Temp. (°C)	Temps (sec)	
Dénaturation initiale	94	180	
Dénaturation	94	15	35 cycles
Hybridation	55	30	
Elongation	72	60	
Elongation finale	72	420	

Le gène *ospC* de l'isolat NE4046 n'ayant pas été amplifié par la PCR ci-dessus, une autre PCR est effectuée grâce aux amorces *OspC* for (5'-ATG AAA AAG AAT ACA TTA AGT GCG-3') et *OspC* rev (5'-TTA AGG TTT TTT TGG ACT TTC TGC-3') (Schulte-Spechtel *et al.*, 2006), selon les conditions suivantes (tableau 6, tableau 7) :

Tableau 6 : Mélange pour une réaction PCR de 50µl.

Mix pour une réaction (50µl)	Volumes (µl)
H ₂ O	31.45
Tampon (10X)	5
dNTPs (10µM)	1
<i>OspC</i> for (10µM)	1
<i>OspC</i> rev (10µM)	1
MgCL ₂ (25mM)	0.25
Taq (5U/µl)	0.3
ADN	10

Tableau 7 : Conditions nécessaires pour l'amplification du gène *ospC*.

Conditions	Temp. (°C)	Temps (sec)
Dénaturation initiale	94	180
Dénaturation	94	15
Hybridation	51	30
Elongation	72	60
Elongation finale	72	420

35 cycles

L'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% à une tension constante de 100V.

L'ADN ainsi amplifié est purifié à l'aide d'un kit commercial (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) selon les indications du fabricant et envoyé ensuite chez une entreprise de séquençage (Microsynth AG, Balgach, Suisse). Les séquences obtenues sont analysées et corrigées grâce aux programmes 4peaks, CLC sequence viewer et CLC Main workbench, puis publiées sur Genbank (chapitre 3.2).

2.7 Microscopie confocale

2.7.1 Transformation de *B. afzelii* pour l'expression de "GFP"

Afin de pouvoir observer les spirochètes *in vivo* dans les tiques en microscopie confocale, une transformation de différents isolats de *B. afzelii* a été effectuée. L'observation *in vivo* de la localisation des spirochètes dans la tique en fonction des différents isolats, mais aussi en fonction de différents traitements, comme un début de repas sanguin ou une augmentation de la température ambiante constitue une autre approche de cette recherche. Dès lors, la technique la plus adaptée pour ce genre d'observation semblait être la microscopie confocale. Certains isolats ont donc été transformés afin qu'ils expriment la protéine fluorescente GFP.

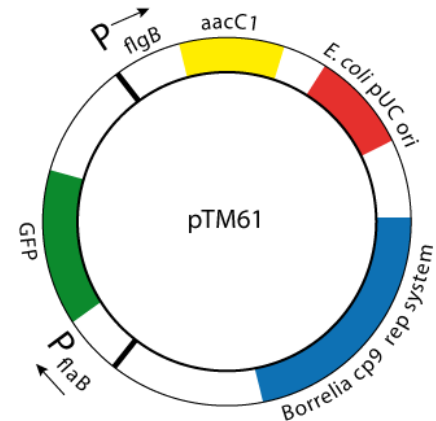


Fig. 17 : Plasmide pTM61.
D'après Moriarty *et al.* (2008)

2.7.1.1 Plasmide utilisé, production et purification du plasmide

Le plasmide choisi pour cette transformation est pTM61 (Moriarty *et al.*, 2008), construit et cordialement fourni par T. Moriarty (Laboratoire du Dr Chaconas, département de biochimie et de biologie moléculaire, Health science center, Université de Calgary). Ce plasmide, de 7kb environ, contient l'origine de réplication pour *Echerichia coli* pUC ori, l'origine de réplication du plasmide circulaire cp9 de *B. burgdorferi* ss, le gène codant pour la GFP, sous l'égide du promoteur flaB ainsi que la cassette aacC1, conférant aux organismes transformés une résistance à la gentamicine (fig. 17).

La production de ce plasmide est effectuée par culture de la souche DH5 α d'*E. coli* (Invitrogen AG, Basel, Suisse) après insertion du plasmide selon les instructions du fabricant. Brièvement, pTM61 est inséré dans DH5 α à la suite d'un choc de température, en exposant une culture contenant le plasmide à un choc de température de 4 à 42°C pendant 40 secondes avant de la refroidir à nouveau à 4°C. La culture est ensuite étalée sur un milieu LB agar (Miller lysogeny broth solide) contenant 25 μ g/ml de gentamicine (LuBioScience GmbH, Lucerne, Suisse). Pour vérifier la présence du plasmide, les colonies ayant poussé sur le milieu sont soumises à une amplification de la cassette de résistance à la gentamicine (aacC1) grâce aux amorces B348 (5' CGC AGC AGC AAC GAT GTT AC 3') et B349 (5' CTT GCA CGT AGA TCA CAT AAG C 3') (Tourand *et al.*, 2006), amplifiant 430 bases selon les conditions suivantes (tableau 8, tableau 9) :

Tableau 8 : Mélange nécessaire pour une réaction PCR de 25 μ l sur la cassette aacC1.

Mix pour une réaction (25μl)	Volumes (μl)
H ₂ O	18.875
Tampon (10X)	2.5
dNTPs (10 μ M)	0.5
B348 (10 μ M)	0.5
B349 (10 μ M)	0.5
MgCl ₂ (25mM)	1
Taq (5U/ μ l)	0.125
ADN (pointe de cure-dent)	1

Tableau 9 : Conditions nécessaire pour l'amplification d'une partie de la cassette aacC1.

Conditions	Temp. (°C)	Temps (sec)
Dénaturation initiale	94	180
Dénaturation	94	20
Hybridation	55	30
Elongation	72	30
Elongation finale	72	600

35 cycles

Les colonies contenant la cassette aacC1 servent ensuite à inoculer 5 ml de milieu LB contenant 10 μ g/ml de gentamicine pour la production du plasmide ainsi que pour une conservation à -80°C.

La purification du plasmide est réalisée grâce au kit commercial GenElute™ HP Plasmid midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Saint-Gall, Suisse) selon le protocole du fabricant. La quantité obtenue est évaluée par spectrophotométrie à 260 nm (nanodrop ND-1000, Witec, Luzern, Suisse).

A partir de cette purification, une digestion enzymatique avec Hind III (10U/μl, Promega AG, Dubendorf, Suisse) permet de vérifier que l'insert est toujours présent selon les conditions suivantes : H₂O, 9.5μl; tampon E (10X), 2μl; BSA, 2μl; Hind III (10U/μl), 0.5μl; plasmide purifié, 1μg. Le plasmide pTM61 contient deux sites de restriction pour Hind III, le premier se situant à 4057-4062 bases et le deuxième à 5253-5258 bases. L'enzyme coupe le plasmide vers le milieu et juste après l'insert, donnant deux fragments, l'un de 1196 bases et l'autre de 5887 bases si l'insert est toujours présent. Ils sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (chapitre 2.6.1.2).

2.7.1.2 Transformation de *B. afzelii*

L'insertion du plasmide pTM61 dans *B. afzelii* s'opère par électroporation, d'après Samuels *et al.* (1995) et Moriarty *et al.* (2008). Les isolats sont mis en culture dans 50ml de BSK-H et placés à 34°C jusqu'à l'obtention de 1 à 5x10⁷ spirochètes par millilitre, quantité déterminée par comptage avec une cellule de Helber et suffisante pour deux transformations. La culture est rendue compétente et concentrée par centrifugation et suspension successives dans du dPBS²⁺ et de l'EPS en restant continuellement à 4°C. Il en résulte deux aliquotes de 50μl chacune pour une culture de 50ml qui peuvent être conservées à -80°C.

Pour la transformation, chaque partie aliquote est gardée 15 minutes dans de la glace en présence de 50μg de plasmide. Le tout est ensuite transféré dans une cuvette d'électroporation préalablement refroidie (2mm electroporation cuvette, Eurogentec, Seraing, Belgique) et inséré dans l'électroporateur (Biorad Micropulser™ 411BR) pour une électroporation à 2.5kV, 25μF et 200Ω. Un millilitre de BSK-H à 34°C est directement ajouté dans la cuvette après électroporation et aussitôt prélevé pour être transféré dans 9 ml de BSK-H. Les cultures sont laissées 24 heures à 34°C puis les éventuels spirochètes transformés sont sélectionnés en ajoutant 100μg de gentamicine par millilitre de culture

(gentamicine sulfate, Lubioscience, Lucerne, Suisse). Finalement, la vérification de la transformation s'effectue par observation de la fluorescence au microscope confocal.

2.7.1.3 Examen des cultures de Borréliés transformées

Les spirochètes transformés sont observés avec un microscope confocal (Leica DM6000) et les images sont traitées avec le logiciel "Leica application suite" (LAS) ainsi que "ImageJ". Les observations sont effectuées avec des objectifs 60X et 100X à immersion à eau.

2.7.1.4 Dissection des tiques et examen *in vivo* des borréliés transformées

Pour les observations *in vivo* des borréliés transformés dans des nymphes infectées par capillaire (chapitre 2.2.2), les nymphes sont préalablement disséquées 24 heures après l'infection. La dissection se fait sous une loupe binoculaire avec une lame de rasoir fixée à un porte-lame de Troutman et des ciseaux de précision Vannas. Les tiques sont fixées sur du ruban adhésif double face transparent, appliqué sur une lame de microscopie. Les pattes sont recouvertes d'une autre bande de ruban adhésif de chaque côté pour assurer le maintien lors de la dissection. Une goutte de milieu 199 (m 199 medium, Hanks' salts, Sigma-Aldrich, Saint-Gall, Suisse) est placée sur la partie postérieure de la tique, lieu où débute l'ouverture de l'abdomen. L'alloscutum et le scutum sont entièrement retirés et la tique est immergée dans du milieu 199. La tique est ensuite placée ainsi sous le microscope pour l'observation.

2.8 Outils statistiques

Les données ont été analysées en utilisant un test de comparaison post hoc avec une matrice de contraste de Tukey, appliqué à un modèle linéaire généralisé (GLM) avec une loi binomiale. Deux modèles ont été créés. Le premier modèle contenait les différents groupes *ospC* comme variable explicative, et le second les différents isolats. Après comparaison de ces deux modèles dans un GLM, une analyse des variances

Matériel et méthodes

(ANOVA) a été appliquée afin de déterminer la variable expliquant au mieux les différences observées. Les différences significatives calculées grâce à ce test de comparaison post hoc ont été représentés dans les graphiques du chapitre résultats (chapitre 0) par des lettres de l'alphabet et indiquées dans les légendes de la manière suivante : a, b, c,...= Différences significatives (GLM, $P < 0.05$).

Lorsque les données n'ont pas permis d'utiliser un GLM, elles ont été analysées en utilisant le test exact de Fisher. Pour les résultats analysés par ce test, les différences significatives ont été représentées sur les graphiques par des chiffres et dans les légendes de la manière suivante : 1,2,...= Différences significatives ($P < 0.05$)

Pour les régressions linéaires, un test de Bravais Pearson a été appliqué aux données. Tous les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel R statistics, version 2.13.0 (R for Mac OS X GUI 1.40-devel Leopard build 64-bit). Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme étant significative.

3 Résultats

Cette recherche est composée de plusieurs expériences visant à mieux comprendre le rôle d'*ospC* dans la transmission de *B. afzelii* par *I. ricinus*. L'influence de l'appartenance d'un isolat à un groupe *ospC* sur la dynamique de transmission de *B. afzelii* a été estimée après infection expérimentale ainsi qu'après infection naturelle des souris (chapitre 3.2). Les effets potentiels de ce gène sur la migration des spirochètes de l'intestin aux glandes salivaires ont aussi été évalués grâce à une expérience sur le temps de repas sanguin nécessaire aux tiques pour transmettre des spirochètes aux souris (chapitre 3.3). Le temps nécessaire aux spirochètes pour passer d'une souris infectée aux nymphes a aussi été examiné (chapitre 3.4). Finalement, nous avons utilisé la microscopie confocale pour une observation *in vivo* de spirochètes dans les tiques (chapitre 3.7.3). Les résultats présentés ci-dessous sont détaillés dans les annexes 9.3 et 9.4.

3.1 Détermination du groupe *ospC* des isolats utilisés

Dix-sept isolats ont été utilisés pour ce travail et ont été classés en fonction du gène *ospC* (tableau 10), soit après SSCP, soit après séquençage partiel du gène (fig. 18) et comparaison avec les profils existants. Seuls les isolats sélectionnés pour l'évaluation de la dynamique de transmission lors d'infection naturelle (chapitre 3.2.3) ont été séquencés, à l'exception de NE4532, les appartenances des isolats à d'autres groupes *ospC* ayant été déterminées par SSCP.

Résultats

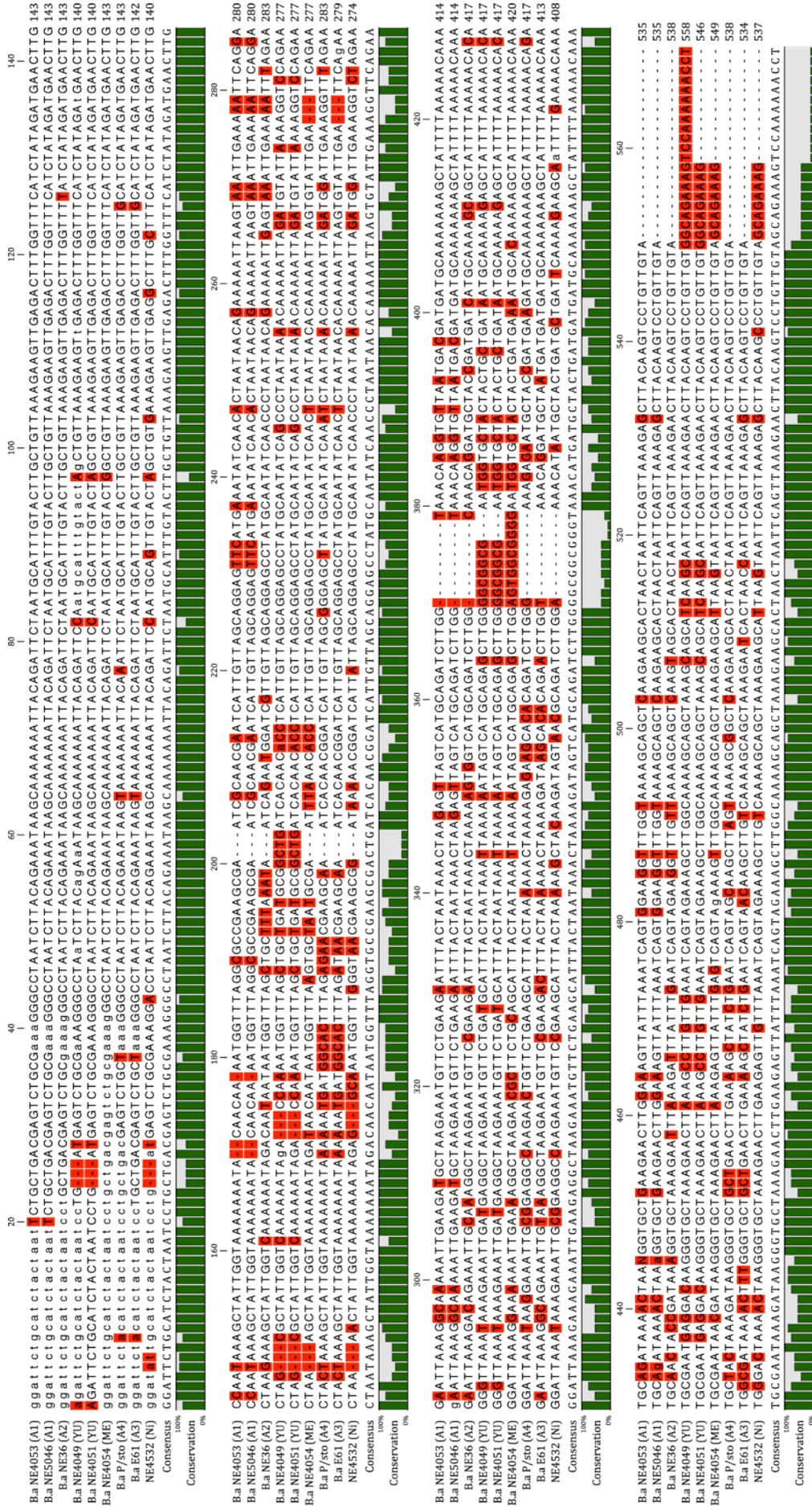


Fig. 18 : Séquençage partiel du gène *ospC* des différents isolats utilisés. En rouge, les régions non conservées. En minuscule, les nucléotides corrigés.

Tableau 10 : Isolats de *B. afzelii* utilisés lors de cette recherche.
Origine, provenance et appartenance aux groupes *ospC*.

Groupe <i>ospC</i>	Isolat	Origine	Provenance
A1	NE4053	Tique de xénodiagnose (Mg, B)	Université de Neuchâtel
	NE4997	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
	NE5022	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
	NE5046	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
A2	NE36	Biopsie d'oreille (Mg, G)	Université de Neuchâtel
A3	E61	Peau (EM, A)	Institut Pasteur, Paris
A4	P/sto	Peau (ACA, Ae)	Institut Pasteur, Paris
	Simon	Peau (EM, A)	Institut Pasteur, Paris
A5	NE4045	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
	NE4046	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
	NE4047	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
	NE5023	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel
ME	NE4052	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
	NE4054	Tique	Université de Neuchâtel
YU	NE4049	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
	NE4051	Tique sur rongeur (As, B)	Université de Neuchâtel
Ni	NE4532	Tique libre (B)	Université de Neuchâtel

A= Autriche; **ACA**= Acrodermatite chronique atrophiante **Ae**= Allemagne;

As= *Apodemus sylvaticus*; **B**= Bois de l'Hôpital (Neuchâtel, Suisse); **EM**= érythème migrant;

Mg= *Myodes glareolus*; **Ni**= non invasif; **G**= Glütschbachtal (Thoune, Berne, Suisse);

Tique= *I. ricinus*.

La détermination des groupes *ospC* a été effectuée par Pérez *et al.* (2011) pour les isolats NE4045, NE4046, NE4047, NE4049, NE4051, NE4052, NE4053 et NE4054, ainsi que par Lagal *et al.* (2003) pour les isolats E61, P/sto et Simon, grâce à la technique de la SSCP. Ces résultats ont été confirmés dans ce travail pour NE4053, NE5046, E61, P/sto, Simon, NE4046, NE4049, NE4051 par SSCP ainsi que par séquençage (GenBank accession numbers JX103488-JX103493), NE4046 mis à part, pour lequel aucune séquence n'a pu être amplifiée. Finalement, l'appartenance des isolats NE4997, NE5022, NE36, NE5023 et NE4532 aux groupes *ospC* a été définie lors de cette recherche, toujours par SSCP ainsi que par séquençage pour les isolats NE36 et NE4532 (fig. 18, fig. 19).

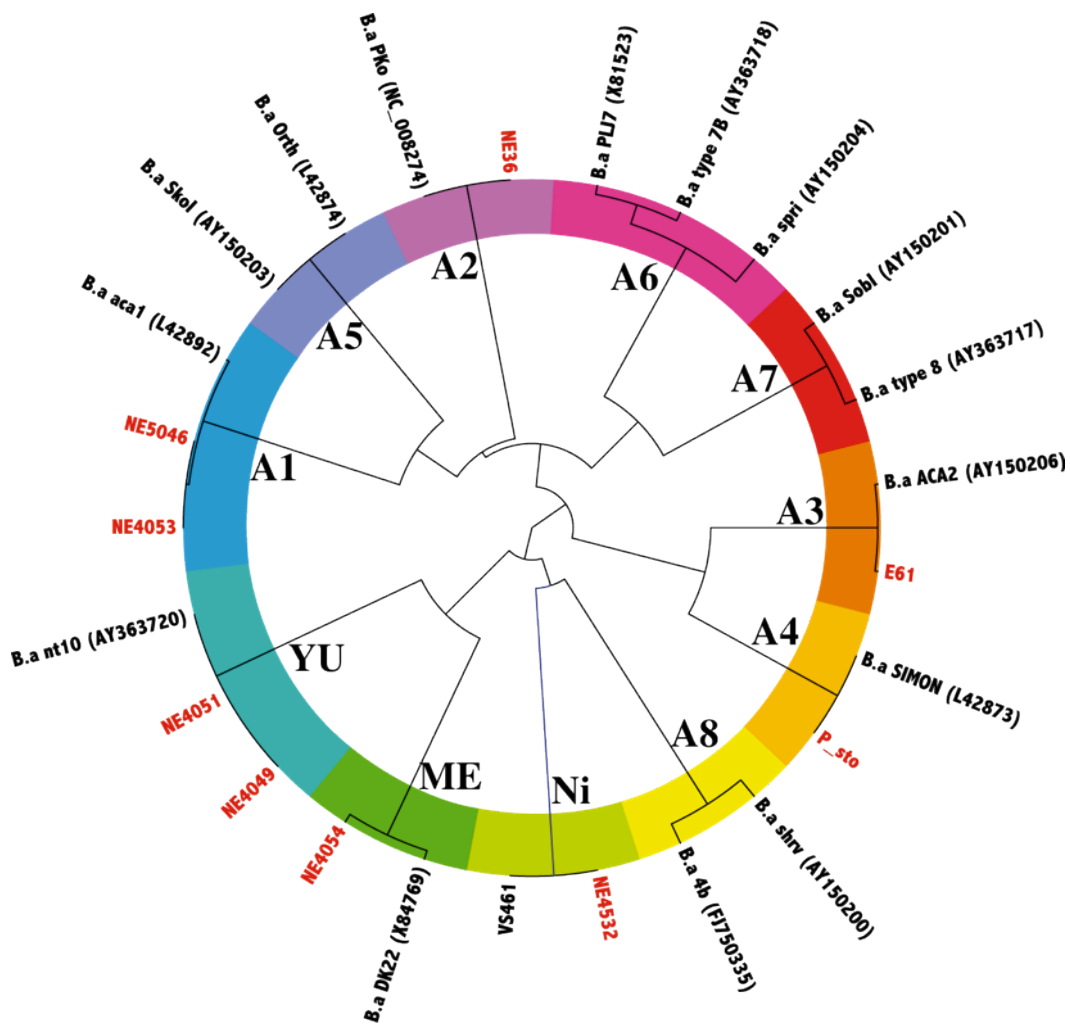


Fig. 19 : Dendrogramme des isolats des groupes *ospC* (UPGMA). Représentation des huit groupes *ospC* invasifs chez *B. afzelii* et du groupe non invasif (Ni). En rouge, les isolats séquencés durant cette étude (N. Tonetti).

3.2 Influence des groupes *ospC* sur la dynamique de transmission de *B. afzelii* par *I. ricinus*

L'influence de l'appartenance d'un isolat à un certain groupe *ospC* sur la dynamique de transmission de *B. afzelii* a été évaluée dans un premier temps lors d'infections expérimentales (chapitre 3.2.1). Des souris ont été infectées, soit par une injection sous-cutanée de milieu de culture contenant des spirochètes (chapitre 3.2.1.1), soit par des nymphes infectées par la technique des capillaires (chapitre 3.2.1.2). Puis, ces souris ont été infestées par des larves saines afin d'évaluer leurs infectivités respectives. La dynamique de transmission de *B. afzelii* lors d'infections naturelles

(chapitre 3.2.3), toujours en fonction de l'influence de l'appartenance d'un isolat à un certain groupe *ospC*, a ensuite été évaluée de la tique à l'hôte (prévalence d'infection des souris, chapitre 3.2.3.1), de l'hôte à la tique (infectivité des souris pour les tiques, chapitre 3.2.3.2) et de tique à tique lors du co-feeding (transmission par co-feeding, chapitre 0) grâce à des nymphes infectées lors d'un repas sanguin sur des souris infectées.

3.2.1 Dynamique de transmission de *B. afzelii* lors d'infections expérimentales

3.2.1.1 *Prévalence d'infection et infectivité des souris après une injection sous-cutanée de culture de borrelies*

L'infection systémique des souris a été évaluée par biopsie d'oreille et xénodiagnose après une injection sous-cutanée de culture de différents isolats (n=12 : NE4997, NE5022, NE5046, NE4053, NE36, E61, P/sto, Simon, NE4046, NE4047, NE5023 et NE4054). Ces isolats ont été injectés à des souris saines via 0.2ml de milieu de culture BSK-H contenant environ 10^7 spirochètes par millilitre. L'infectivité des souris à, quant à elle, été estimée par des infestations avec des larves saines le jour de l'injection (larves j.0), ainsi que 30 jours après l'injection (larves j.30). L'infectivité des souris pour les larves j.0 présentés dans le tableau 11 a été obtenue en rapportant le nombre de tiques infectées sur les tiques provenant de toutes les souris; toutes venant de recevoir une inoculation de spirochètes au moment de l'infestation. Par contre, l'infectivité des souris pour les larves j.30 n'a été estimée que pour les souris infectées de manière systémique, ce qui a été évalué par biopsie et/ou xénodiagnose.

Au jour 0, 42.9% (12/28) des individus ont transmis des spirochètes aux larves, à un taux d'infection moyen de 6% (22/364)(tableau 11, annexe 9.4 pour le détail). Bien que déposées le jour de l'infection sous-cutanée, des larves ont donc pu acquérir des spirochètes, mais à des taux d'infection faibles. Sur ces 12 souris infectieuses pour les larves j.0, neuf d'entre elles (75%) étaient encore infectieuses pour les larves j.30 (annexe 9.4).

Résultats

Au jour 30, 19 souris sur 28 (67.9%) ont donc déclaré une infection systémique après une injection sous-cutanée de culture de spirochètes (tableau 11). Les infections observées ont été détectées dans 89.5% (17/19) des cas par xénodiagnose et dans 73.7% (14/19) des cas par biopsie. Ces différences dans la détection de l'infection chez la souris ne sont pas significatives ($P=0.2$, one-tailed Fisher exact probability test), ce qui implique que la sensibilité de détection d'une infection systémique par biopsie ou par xénodiagnose est semblable. L'infectivité des souris au jour 0 a donc permis de déceler précocement une infection systémique dans 47.4% (9/19) des cas seulement.

Deux souris, infectées par les isolats NE5022 et NE4053 du groupe A1, n'ont pas été infectieuses pour les larves j.30 alors que des spirochètes étaient présents dans les cultures de biopsies d'oreille. A l'inverse, l'infection des souris par les isolats NE4046 ($n=2$) et NE4047 ($n=2$) n'a été détectée que par xénodiagnose, tandis que sur les deux souris inoculées avec NE4053 (A1), dont l'infection était détectée lors des xénodiagnoses, des spirochètes étaient présents dans une seule culture de biopsie d'oreille.

Tableau 11 : Prévalence d'infection des souris et infectivité des souris pour les tiques lors d'infection par injection sous-cutanée.

Isolats	Groupe <i>ospC</i>	Taux d'infection (%)			Biopsies	
		Souris ^Δ	Larves j.0	Larves j.30	1	2
NE4997		2/2	3/26 (11.5)	19/26 (73.1)*	+/+	ne/ne
NE5022	A1	1/2	1/26 (3.8)	0/13	+/-	ne/-
NE4053		2/4	1/52 (1.9)	3/26 (11.5)	-/-/-/-	+/-/-/-
NE5046		2/2	4/26 (15.4)	21/26 (80.8)*	-/-	+/+
NE36		A2	2/2	1/26 (3.8)	12/26 (46.2)*	+/+
E61	A3	2/2	0/26	5/26 (19.2)	+/+	ne/ne
P/sto	A4	2/2	6/26 (23.1)	15/26 (57.7)*	+/+	ne/ne
Simon		0/2	1/26 (3.8)	-	-/-	-/-
NE4046		2/2	1/26 (3.8)	21/26 (80.8)*	-/-	-/-
NE4047	A5	2/4	1/52 (1.9)	3/26 (11.5)	-/-/-/-	-/-/-/-
NE5023		0/2	0/26	-	-/-	-/-
NE4054	ME	2/2	3/26 (11.5)	19/26 (73.1)*	+/-	ne/+
Total		19/28 (67.9)	22/364 (6)	138/247 (55.9)	14/28 (50)	

Prévalence d'infection des souris et leur infectivité après injection sous-cutanée de milieu de culture. A chaque souris correspond un symbole + ou - pour les biopsies. **ne**= Non effectué; **Ni**= Non invasif. ^ΔObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose; *= Différences significatives entre les taux d'infection des larves j.0 et j.30 ($P<0.05$).

Toutes les souris ayant reçu en injection les isolats NE4997, NE5046, NE36, E61, P/sto, NE4046 et NE4054 ont développé une infection systémique, tandis que seules 50% des souris l'ont fait après injection des isolats NE5022 (1/2), NE4053 (2/4) et NE4047 (2/4) et qu'aucune infection systémique n'a été observée chez les souris exposées aux isolats Simon (n=2) et NE5023 (n=2).

Au jour 30, 67.9% (19/28) des souris présentaient une infection systémique et 89.5% (17/19) d'entre elles ont été infectieuses pour les tiques j.30, amenant à une infectivité moyenne de 55.9% (138/247). L'infectivité des souris au jour 30 était donc près de quatre fois plus élevée qu'au jour 0 (P<0.0001, one-tailed Fisher exact probability test). En ne tenant compte que des souris infectieuses pour les tiques et/ou infectées (biopsie positive), aucune corrélation n'a pu être observée entre les infectivités des souris pour les larves j.0 et j.30 (r=0.34; P=0.12)(fig. 20).

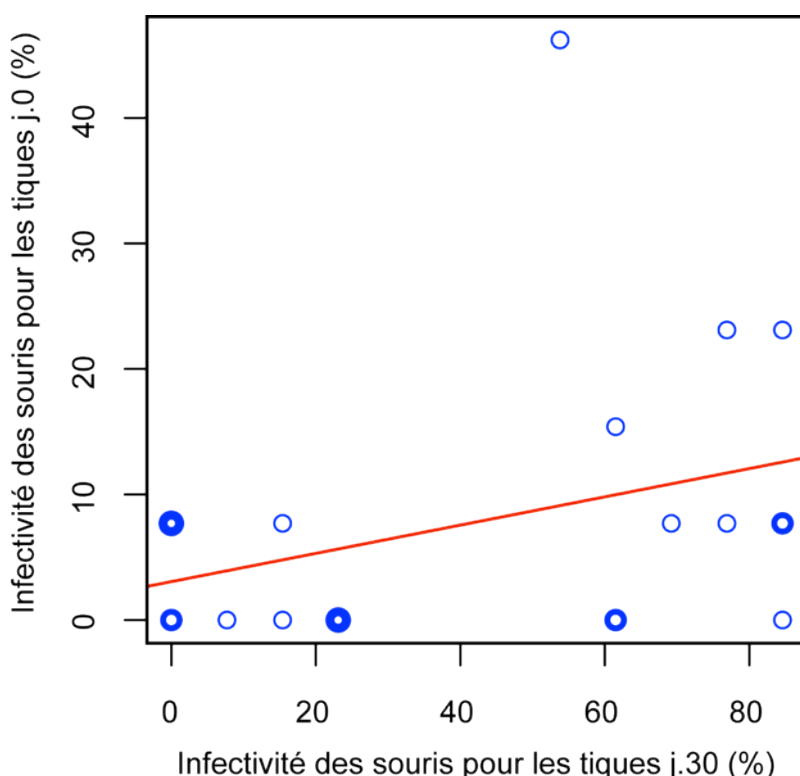


Fig. 20 : Relation entre les infectivités des souris infectieuses au jour 0 et/ou infectées (n=22) pour les larves j.0 et j.30.

Coefficient de corrélation de Pearson (r)=0.29; P=0.23; ○: n= 1; ◐: n= 2; ●: n= 3

Une faible infectivité des souris pour les tiques j.0 ne se traduit pas par une faible infectivité au jour 30, et inversement.

Résultats

En considérant l'infectivité des souris pour les tiques selon l'isolat, il apparaît qu'elle variait au jour 0 de 1.9% (1/52) pour les souris infectées par NE4053 à 23.1% (6/26) pour les souris infectées par P/sto. Elle était toujours plus faible que l'infectivité observée au jour 30, qui variait de 11.5 % (3/26) pour NE4053 et NE4047 à 80.8% (21/26) pour NE5046 et NE4046. Des différences significatives entre les infectivités des souris au jour 0 et au jour 30 ont été observées pour six des 13 isolats utilisés dans cette expérience (NE4997 ($P < 0.0001$), NE5046 ($P < 0.0001$), NE36 ($P = 0.004$), P/sto ($P = 0.01$), NE4046 ($P < 0.0001$) et NE4054 ($P < 0.0001$); one-tailed Fisher exact probability test; tableau 11).

En considérant maintenant l'infectivité des souris entre isolat, une différence significative a été observée au jour 0. En effet, l'isolat NE4047 (A5) était plus faiblement transmis par les souris aux tiques (1.9%, 1/52) que les isolats NE5046 (A1) et P/sto (A4), transmis par les souris à 15.4% (4/26, $P = 0.04$) et 23.1% (6/26, $P = 0.005$) des tiques, respectivement (one-tailed Fisher exact probability test) (fig. 21). Au jour 30 par contre, de fortes variations ont été observées autant entre groupes *ospC* qu'au sein des groupes A1, A4 et A5.

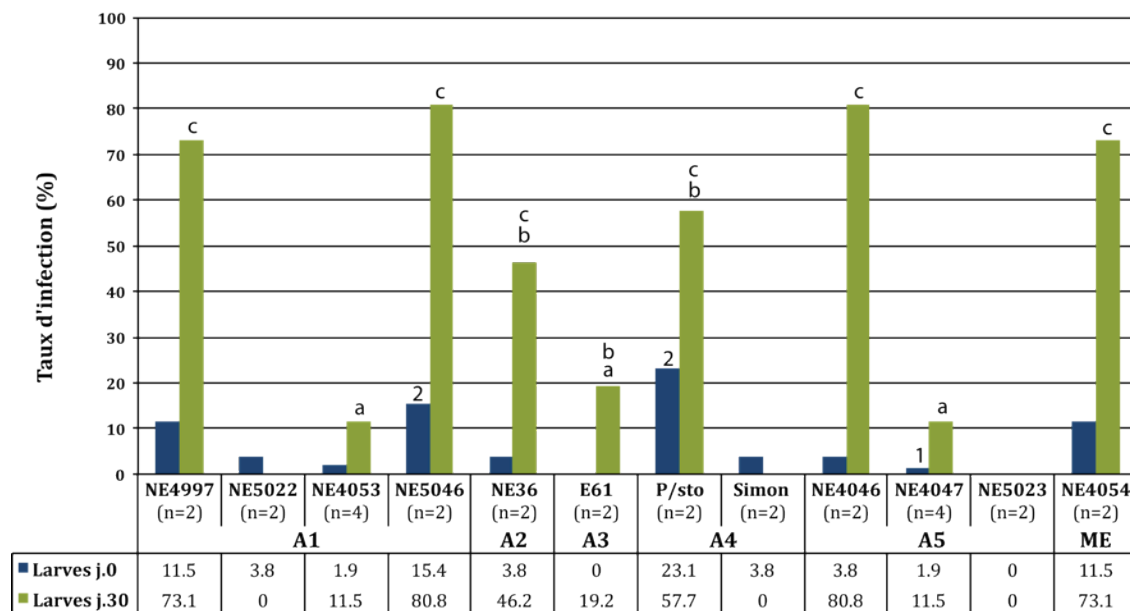


Fig. 21 : Infectivité des souris (%) pour les larves placées au jour 0 et au jour 30.

n= Nombre de souris par isolat. Pour chaque individu, 13 larves au j.0 et 13 larves au j.30 ont été analysées après leur mue. a, b, c= Différences significatives (GLM, $P < 0.05$); 1, 2= Différences significatives ($P < 0.05$).

Des infectivités élevées ont été observées chez les souris infectées par les isolats NE4997 (73.1%), NE5046 (80.8%), NE4046 (80.8%) et NE4054 (73.1%), tandis qu'elles étaient significativement plus faibles pour les souris infectées par NE4053 et NE4047 (11.5%) et qu'elles étaient intermédiaires chez les souris infectées par NE36 (46.2%), E61 (19.2%) et P/sto (57.7%).

Les taux d'infection des larves j.0 ont été comparés grâce à un test exact de Fisher et les différences significatives ont été représentées par les chiffres 1 et 2 (fig. 21). Les taux d'infection des larves j.30 ont quant à eux été analysés grâce à un test de comparaison post hoc avec une matrice de contraste de Tukey appliqué à un modèle linéaire généralisé (GLM) avec une loi binomiale. Les résultats des comparaisons sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Valeurs de P significatives après un test de comparaison post hoc.

Isolats	P
NE4046-E61	0.002
NE4054-E61	0.008
NE4997-E61	0.008
NE5046-E61	0.002
NE4047-NE4046	<0.001
NE4053-NE4046	<0.001
NE4054-NE4047	0.002
NE4997-NE4047	0.002
NE5046-NE4047	<0.001
P/sto-NE4047	0.04
NE4054-NE4053	0.002
NE4997-NE4053	0.002
NE5046-NE4053	<0.001
P/sto-NE4053	0.03

Les paramètres variables, les différents groupes *ospC* (modèle groupe *ospC*) et les isolats les représentant (modèle isolat), ont chacun été testés. Il s'est avéré que le modèle incluant les différents isolats explique au mieux les variations observées (tableau 13).

Résultats

Tableau 13 : Comparaison des variables explicatives dans un modèle linéaire généralisé appliqué à l'infectivité des souris après injection sous-cutanée.

Transmission	Type d'infection	Modèle	dr	dl	AIC
De l'hôte à la tique (infectivité des souris)	Injection sous- cutanée	Groupe <i>ospC</i>	317	239	331
		Isolat	256	236	276.3

Déviante résiduelle (**dr**), degrés de liberté (**dl**) et critère d'information d'Akaike (**AIC**) des modèles linéaires généralisés incluant soit le groupe *ospC* soit les différents isolats comme variable explicative.

Le critère d'information d'Akaike (AIC) est plus faible lorsque la variable explicative "isolat" est utilisée, indiquant que le modèle est meilleur qu'en utilisant la variable "groupe *ospC*". De plus, une analyse des variances (ANOVA) entre les modèles "groupe *ospC*" et "isolat" démontre que la variable "l'isolat" est celle qui explique au mieux les variations observées (tableau 14).

Tableau 14 : Analyse des variances des deux modèles linéaires généralisés appliqués à l'infectivité des souris après injection sous-cutanée.

Transmission	Type d'infection	Comparaison	Δdr	Δdl	P
De l'hôte à la tique (infectivité des souris)	Injection sous- cutanée	Isolat/ Groupe <i>ospC</i>	3	60.7	<0.0001

Différence de déviante résiduelle (**Δdr**), de degrés de liberté (**Δdl**) et valeur de P (**P**).

La prévalence d'infection de souris infectées par injection sous-cutanée des isolats NE4049 et NE4532 transformés (NE4049T et NE4532T) ainsi que leur infectivité a aussi été évaluée (tableau 15). Les deux souris ayant reçu une injection de culture contenant l'isolat NE4049T se sont infectées et ont été infectieuses pour les tiques placées 30 jours après l'injection, indiquant que cet isolat a conservé son pouvoir infectieux après la transformation. Aucune tique placée le jour de l'injection n'a par contre été infectée.

Tableau 15 : Prévalence d'infection des souris et infectivité des souris pour les tiques lors d'infection par injection sous-cutanée par les isolats transformés.

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Taux d'infection (%)			Biopsies	
		Souris^Δ	Larves		1	2
			j.0	j.30		
NE4049T	YU	2/2	0/26	5/26 (19.2)	-/-	-/-
NE4532T	Ni	0/2	0/26	0/26	-/-	-/-

^ΔObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose.

La souche NE4532T semble, quant à elle, avoir perdu son pouvoir infectieux après transformation, puisqu'aucune transmission n'a été détectée après infection expérimentale, alors que l'isolat non transformé était infectieux, comme il le sera montré au chapitre 3.2.2.

En résumé, les infections par injection sous-cutanée ont été efficaces pour obtenir des souris, ainsi que des tiques, infectées. Bien qu'une transmission de spirochètes aux larves j.0 ait été observée, l'infectivité des souris pour les tiques j.0 était bien plus faible que pour les larves j.30. Des différences significatives ont été observées dans l'infectivité des souris pour les tiques j.30, autant entre groupes *ospC*, qu'au sein des groupes A1, A4 et A5.

3.2.1.2 Prévalence d'infection et infectivité des souris lors d'infection par des nymphes infectées par capillaires

Dans cette expérience, des souris ont chacune été infestées par environ 10 nymphes infectées par capillaires avec les isolats NE4053 (A1), NE4047 (A5), NE4052 (ME) et NE4054 (ME). Deux jours après cette infestation, des larves ont été mises à nourrir proche de ces nymphes afin de recréer les conditions nécessaires à une transmission par co-feeding. Finalement, l'infection des souris et leur infectivité ont été évaluées par biopsies d'oreille et xénodiagnose 30 jours plus tard.

Aucune infection n'a été observée en infestant des souris (n=7) avec des nymphes infectées par capillaires (tableau 16). Une transmission par co-feeding n'a été observée que pour NE4052 (ME), où seule une tique sur 26 (3.8%) était infectée.

Résultats

Tableau 16 : Prévalence d'infection des souris et infectivité des souris pour les tiques lors d'infection par capillaires.

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Co-feeding	Prévalence d'infection des souris ^Δ	Biopsies		Infectivité des souris
				1	2	
NE4053	A1	0/26	0/2	-/-	-/-	0/26
NE4047	A5	0/26	0/2	-/-	-/-	0/26
NE4052	ME	1/26	0/2	-/-	ne/ne	0/26
NE4054		0/13	0/1	-	-	0/13
Totaux		1/91 (1.1)	0/7	0/7	0/5	0

Taux d'infection des tiques et des hôtes après infestation avec des nymphes infectées par la technique des capillaires. A chaque souris correspond un symbole + ou - pour les biopsies. **ne**= Non effectué; **Ni**= Non invasif. ^ΔObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose.

Six autres souris ont également été infestées par des nymphes infectées par capillaires, mais avec les isolats transformés NE4049T (n=4) et NE4532T (n=2), afin d'estimer la capacité de ces isolats transformés d'infecter des souris et leur infectivité pour les tiques.

Les résultats ont montré que 50% (2/4) des souris infestées par des nymphes infectées par capillaires avec l'isolat NE4049T étaient infectées (tableau 17). Ces souris ont transmis des spirochètes à 19.2% (5/26) des larves placées 30 jours après l'infestation des souris par les nymphes. Tout comme lors des infections par injection sous-cutanée, l'isolat NE4532T n'a par contre pas été infectieux pour les souris, ni pour les tiques.

Tableau 17 : Prévalence d'infection des souris et infectivité des souris pour les tiques lors d'infection par capillaires, pour les isolats transformés.

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Taux d'infection (%)			Biopsies	
		Souris ^Δ	Larves		1	2
			j.0	j.30		
NE4049T	YU	2/4	0/52	5/26 (19.2)	-/-/-/-	-/-/-/-
NE4532T	Ni	0/2	0/26	-	-/-	-/-

^ΔObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose.

Les infections par capillaires n'ont pas été en mesure d'infecter suffisamment de souris et de tiques. En fait, seules des souris infestées par des nymphes infectées par la souche transformée NE4049T (YU) se sont infectées par cette voie. Ces souris étaient par contre infectieuses pour les tiques j.30.

3.2.1.3 Comparaison des prévalences d'infection des souris et de leur infectivité entre les différentes méthodes d'infection expérimentales

Deux méthodes d'infection expérimentales ont été utilisées pour étudier l'infection des souris et leur infectivité pour les tiques : L'injection sous-cutanée de culture contenant des spirochètes et l'infection de souris par une infestation avec des nymphes infectées par capillaires. En ne tenant compte que des isolats utilisés avec les deux méthodes, les infections par injection sous-cutanée ont amené à des prévalences d'infection des souris de 50% (8/16) et ont permis d'infecter des souris avec tous les isolats à l'exception de NE4532T, alors que la prévalence d'infection des souris n'était que de 22.2% (2/9) lors d'infestation avec des nymphes infectées par capillaires, qui ont permis d'infecter des souris avec l'isolat NE4049T seulement (tableau 18). Ces différences ne sont toutefois pas significatives (P=0.18, one-tailed Fisher exact probability test).

Tableau 18 : Comparaison des méthodes d'infection pour les prévalences d'infection des souris et leur infectivité.

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Prévalence d'infection des souris ^Δ		Infectivité de souris (%)	
		Capillaires	Sous-cutanée	Capillaires	Sous-cutanée
NE4053	A1	0/2	2/4	-	3/26 (11.5)
NE4047	A5	0/2	2/4	-	3/26 (11.5)
NE4054	ME	0/1	2/2	-	19/26 (73.1)
NE4049T	YU	2/2	2/4	5/26 (19.2)	20/26 (76.9)*
NE4532T	Ni	0/2	0/2	-	-
Total		2/9 (22.2)	8/16 (50)	5/26 (19.2)	45/104 (43.3)*

^ΔObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose. *= Différences significatives (P<0.05).

Les souris infectées par injection sous-cutanée (n=8) ont infecté ensuite 43.3% (45/104) des larves mises à nourrir 30 jours après l'injection à des taux variant de 11.5% (3/26) pour les isolats NE4053 (A1) et NE4047 (A5) à 76.9% (20/26) pour l'isolat transformé NE4049T. Cet isolat transformé n'a par contre été transmis qu'à 19.2% (5/26) des larves j.30 infestant des souris infectées avec des nymphes infectées par capillaires (P<0.0001, one-tailed Fisher exact probability test).

3.2.2 Effets d'infestations répétées sur l'infectivité des souris

Dans la nature, les rongeurs sont continuellement infestés par des tiques, stimulant ainsi leur infectivité pour les tiques (Gern *et al.*, 1994). Afin de voir si un tel mécanisme pouvait aussi être induit par des infestations répétées dès le début de l'infection et ainsi obtenir plus de tiques infectées plus rapidement, des souris ont été infestées par des larves tous les six jours après une infection sous-cutanée et ce à trois reprises. Pour les trois isolats utilisés ici (NE4051, NE4053 et NE4532), chaque souris a démontré une augmentation de l'infectivité pour les tiques tout au long des infestations successives, à l'exception de la souris infectée par l'isolat NE4532, qui montre une baisse d'infectivité au jour 13 et une augmentation au jour 19, sans que ces variations soient significatives (fig. 22). Une augmentation significative de l'infectivité des souris a été observée pour les isolats NE4051 (YU) et NE4532 (Ni) ($P_{YU\ j.0-j.13}=0.008$, $P_{YU\ j.0-j.19}=0.002$, $P_{ME\ j.0-j.19}=0.006$, one-tailed Fisher exact probability test).

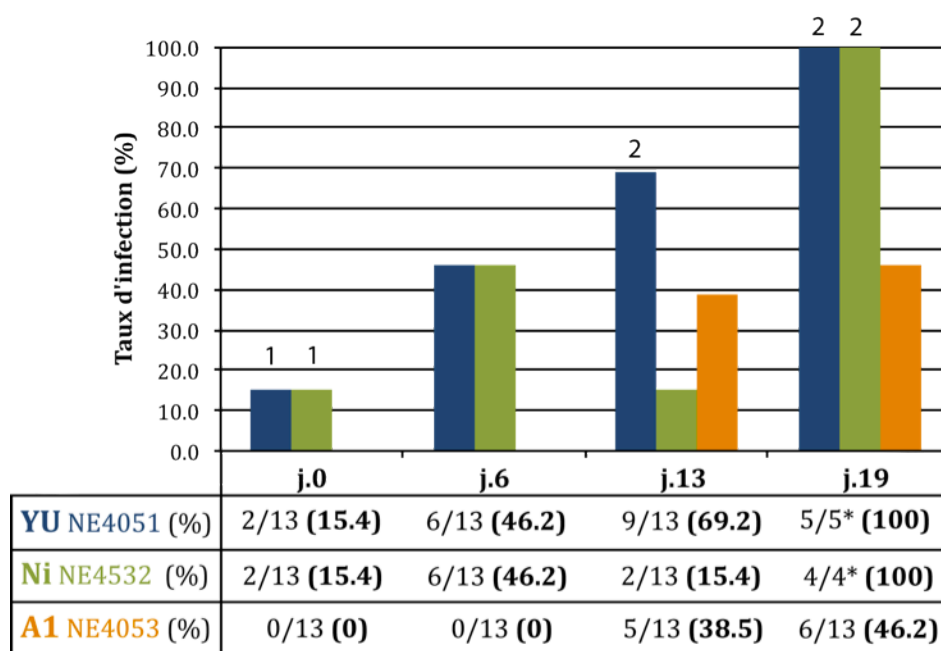


Fig. 22 : Infectivité des souris lors d'infestations répétées.
1, 2= Différences significatives ($P<0.05$); *= maximum de tiques récoltées après infestation.

Les souris inoculées avec les isolats NE4051 (YU) et NE4532 (Ni) étaient infectieuses dès l'injection sous-cutanée, avec une infectivité de 15.4% (2/13) tandis que la souris infectée par NE4053 (A1) n'a transmis des spirochètes aux tiques qu'à

partir du jour 13, à un taux de 38.5% (5/13). Au jour 19, l'infectivité des souris infectées par NE4053 (46.2%, 6/13) était plus élevée que celle obtenue au jour 30 lors de l'expérience précédente (11.5%, 3/26; $P=0.02$, one-tailed Fisher exact probability test; chapitre 3.2.1.3). Pour NE4051, l'infectivité observée ici au jour 19 (100%, 5/5) diffère de l'infectivité observée lors d'infection naturelle au jour 30 (66.7%, 68/104), comme il sera présenté plus loin (chapitre 3.2.3.2), sans que cette dernière différence soit toutefois significative ($P=0.13$, one-tailed Fisher exact probability test).

Cette expérience vient confirmer les observations de Gern *et al.* (1994), à savoir qu'une infestation répétée stimule l'infectivité des souris, et ce dès le début de l'infection des souris. Nous avons aussi observé que cette stimulation a été retrouvée pour les groupes *ospC* A1, YU et pour la souche non invasive VS461.

3.2.3 Dynamique de transmission de *B. afzelii* lors d'infections naturelles

Des nymphes infectées ont été obtenues grâce aux expériences précédentes. Analysées individuellement, ces tiques ont permis d'obtenir des lots de tiques infectées à des taux connus, permettant ainsi d'évaluer la dynamique de transmission des différents isolats lors d'infection naturelle, en infestant chaque souris avec trois nymphes infectées pour chacun des isolats. Dès lors, afin de ne pas avoir à placer plus de 13 tiques par souris, seuls des lots dont le taux d'infection atteignait au moins 23% (3/13) ont été utilisés pour infester des souris, sauf exception (annexe 9.3). La prévalence d'infection des hôtes, reflétant l'efficacité de transmission de la tique à l'hôte (3.2.3.1), leur infectivité respective, soit l'efficacité de transmission de l'hôte aux tiques (3.2.3.2) ainsi que l'efficacité de transmission par co-feeding (0) ont été évaluées pour différents isolats ($n=9$).

3.2.3.1 Prévalence d'infection des souris

Des tiques infectées par les isolats NE4053 et NE5046 (A1), NE36 (A2), E61 (A3), P/sto (A4), NE4046 (A5), NE4049 et NE4051 (YU) et NE4054 (ME) ont servi à infester des souris (n=56). La prévalence d'infection de ces souris a été évaluée par biopsie et xénodiagnose 30 jours après chaque infestation.

Globalement, une prévalence d'infection des souris de 67.9% (38/56) a été observée, définie par xénodiagnose et/ou biopsies d'oreilles. Les taux variaient entre 30% (3/10) d'hôtes infectés pour le groupe ME (NE4045) et 100% (9/9) pour le groupe YU (NE4049) (fig. 23). Des souris infectées ont été obtenues pour tous les groupes *ospC* à l'exception du groupe A5 (NE4046), bien que les nymphes utilisées étaient infectées à un taux de 84.6% (11/13).

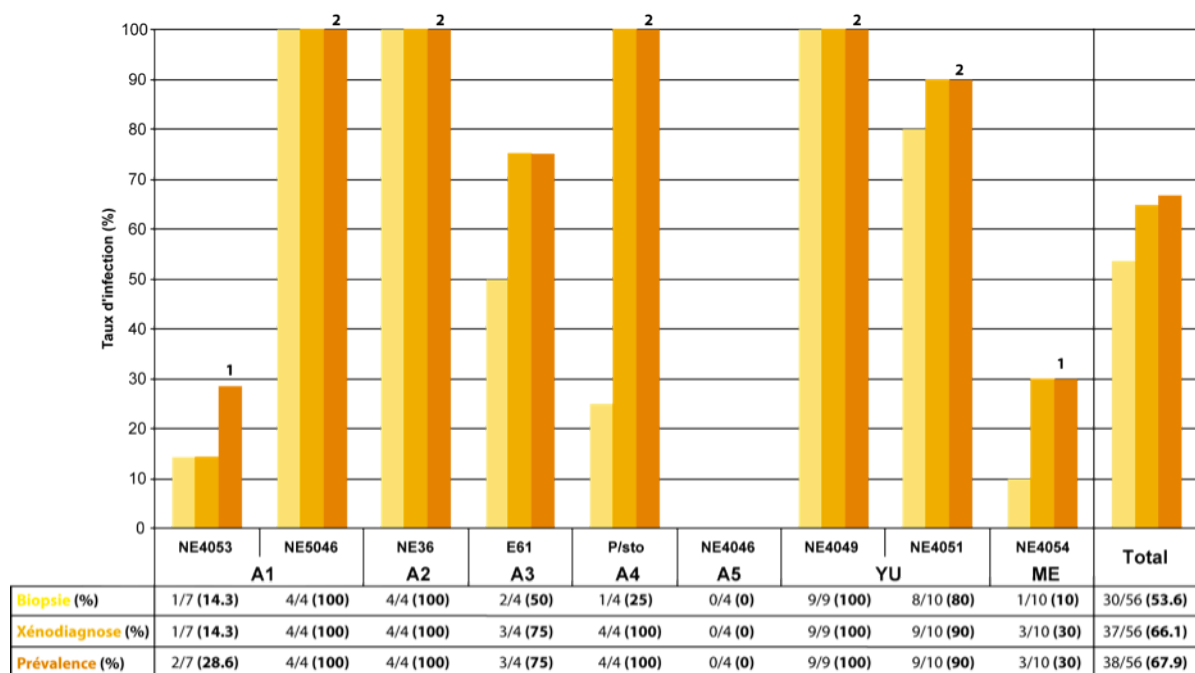


Fig. 23 : Prévalence d'infection des souris après infestation avec des nymphes infectées, selon l'isolat. Taux de détection par biopsies d'oreille, par xénodiagnose et total des deux techniques. 1, 2= Différences significatives (P<0.05).

En comparant les prévalences d'infection des souris obtenues au jour 30 soit par biopsie soit par xénodiagnose, on constate que 78.9% (30/38) des infections observées ont été détectées par biopsie, contre 97.4% (37/38) par xénodiagnose. L'évaluation de la prévalence d'infection des souris par xénodiagnose est significativement plus sensible que par biopsie (P=0.01, one-tailed Fisher exact probability test)(fig. 23). Huit souris,

infectées par les isolats NE4053 (n=1), E61 (n=1), P/sto (n=3), NE4051 (n=1) et NE4054 (n=2), ont transmis des spirochètes aux tiques bien que les cultures de biopsies étaient négatives, alors qu'une souris, infectée par NE4053, n'était pas infectieuse pour les tiques, bien que des spirochètes aient été isolés d'une biopsie d'oreille. Malgré un nombre de souris par isolat assez faible, des différences significatives ont été observées entre les faibles prévalences d'infection des hôtes infectés par les isolats NE4053 (A1) et NE4054 (ME), et les prévalences d'infection des souris infectées par les groupes *ospC* A1 (NE5046), A2 (NE36), A4 (P/sto) et YU (NE4049 et NE4051) ($P < 0.05$, one-tailed Fisher exact probability test) (fig. 23).

En résumé, des différences significatives dans les prévalences d'infection des souris infectées par voie naturelle ont été observées entre groupes *ospC* ainsi qu'au sein du groupe *ospC* A1. L'évaluation de la prévalence d'infection des souris par xénodiagnose est significativement plus sensible que par biopsies d'oreille, qui n'ont pas permis de déceler la totalité des infections systémiques observées lorsque les prévalences d'infection des souris étaient faibles (NE4053 (A1), E61 (A3) et NE4054 (ME)), le groupe *ospC* A4 mis à part.

3.2.3.2 Infectivité des souris pour les tiques

L'infectivité des souris pour les tiques, soit la capacité de transmission des spirochètes de l'hôte à la tique, a été évaluée en analysant individuellement 13 nymphes issues des xénodiagnoses des souris, pour chaque isolat. Les 38 souris infectées obtenues après infestation par des nymphes infectées (fig. 23) ont transmis des spirochètes à 62% (306/492) des tiques (fig. 24).

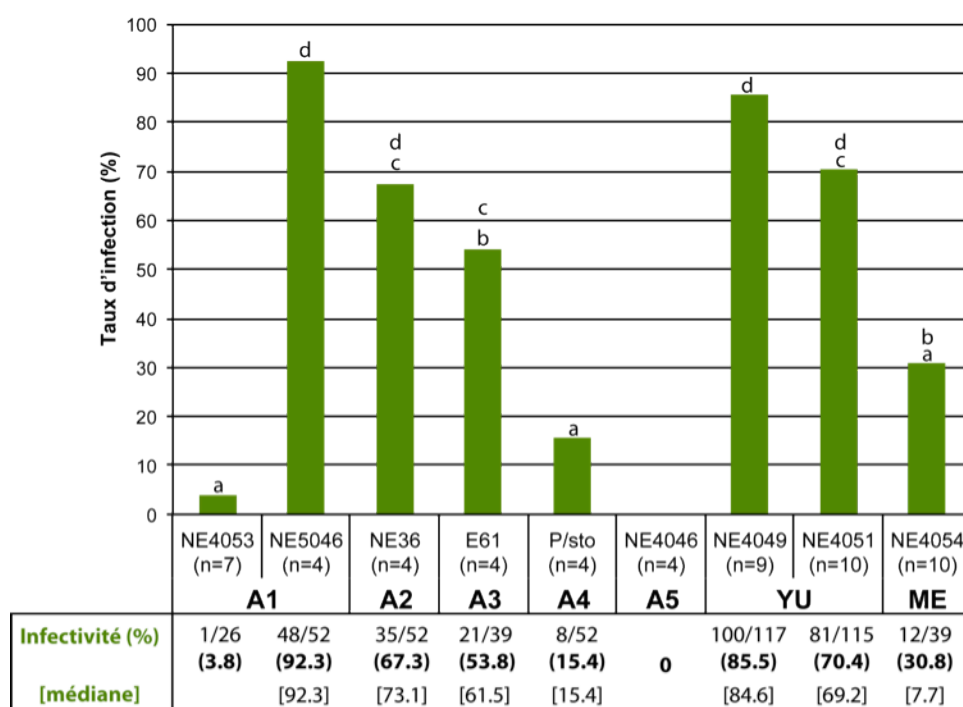


Fig. 24 : Infectivité des souris pour les tiques lors d'infection naturelle, selon l'isolat. **a, b, c, d**= Différences significatives (GLM, P<0.05).

Entre groupes *ospC*, les extrêmes ont été retrouvés entre les souris infectées par les groupes A1 (NE4053, n=7) et YU (NE4049, n=9), qui ont infecté 3.8% (1/26) et 85.5% (100/117) des tiques se nourrissant sur elles, respectivement. Entre isolat toutefois, les extrêmes ont été tout deux retrouvés dans le même groupe *ospC* A1, les souris infectées par l'isolat NE5046 (n=4) ayant infecté 92.3% (48/52) des tiques, contre 3.8% (1/26) pour les souris infectées par l'isolat NE4053 (n=7). Des différences dans l'infectivité des souris pour les tiques étaient significatives l'orsque l'écart était de plus de 23%, se traduisant par des infectivités faibles pour A4 et ME et des infectivités intermédiaires à élevées pour A2, A3 et YU (fig. 24, tableau 19). De plus, une différence

significative entre les infectivités des isolats appartenant au groupe *ospC* A1 a aussi été observée, mais pas au sein du groupe YU.

Tableau 19 : Valeurs de P significatives après un test de comparaison post hoc.

Isolats	P
NE4049-E61	0.002
NE4053-E61	0.03
NE5046-E61	0.003
P/sto-E61	0.004
NE4053-NE36	0.005
NE4054-NE36	0.02
P/sto-NE36	<0.001
NE4053-NE4049	<0.001
NE4054-NE4049	<0.001
P/sto-NE4049	<0.001
NE4053-NE4051	0.002
NE4054-NE4051	<0.001
P/sto-NE4051	<0.001
NE5046-NE4053	<0.001
NE5046-NE4054	<0.001
P/sto-NE5046	<0.001

Les variables "groupe *ospC*" et "isolat" ont été confrontées dans un GLM afin de pouvoir comparer ces résultats. La variable "isolat" permet d'expliquer au mieux les variations observées (tableau 20).

Tableau 20 : Comparaison des variables explicatives dans un modèle linéaire généralisé appliqué à l'infectivité des souris après infection naturelle.

Transmission	Type d'infection	Modèle	dr	dl	AIC
De l'hôte à la tique (infectivité des souris)	Infection naturelle	Groupe <i>ospC</i>	559.7	486	571.7
		Isolat	485.7	484	501.7

Déviance résiduelle (**dr**), degrés de liberté (**dl**) et critère d'information d'Akaike (**AIC**) des modèles linéaires généralisés incluant soit le groupe *ospC* soit les différents isolats comme variable explicative.

En effet, le critère d'information d'Akaike (AIC) est plus faible lorsque la variable explicative "isolat" est utilisée.

Résultats

L'analyse des variances (ANOVA) entre les modèles "groupes *ospC*" et "isolat" démontre aussi que la variable "isolat" est celle qui explique au mieux les variations observées dans l'infectivité des souris après une infection naturelle (tableau 21).

Tableau 21 : Analyse des variances des deux modèles linéaires généralisés appliqués à l'infectivité des souris après infection naturelle.

Transmission	Type d'infection	Comparaison	Δdr	Δdl	P
De l'hôte à la tique (infectivité des souris)	Infection naturelle	Isolat/ Groupe <i>ospC</i>	74	2	<0.0001

Différence de déviance résiduelle (Δdr), de degrés de liberté (Δdl) et valeur de P (**P**).

En résumé, la variabilité de l'infectivité des souris infectées par voie naturelle pour les tiques est liée à l'isolat plutôt qu'à un certain groupe *ospC*. Des différences significatives dans l'infectivité des souris ont donc été observées entre groupes *ospC* ainsi qu'au sein du groupe *ospC* A1. Les souris infectées par les isolats NE5046 (A1), NE36 (A2), NE4049 et NE4051 (YU) étaient fortement infectieuses pour les tiques, tandis qu'une infectivité faible a été observée chez les souris infectées par les isolats NE4053 (A1), P/sto (A4) et NE4054 (ME). Nous avons aussi observé que les infectivités faibles provenaient de souris infectées par les isolats faiblement détectés par biopsie.

3.2.3.3 Evolution de l'infectivité des souris infectées naturellement au cours du temps

Une partie de ces souris (n=15) infectées par différents isolats (n=9; NE5046, NE36, E61, P/sto, NE4049, NE4049T, NE4051, NE4054, NE4532) a été maintenue au laboratoire jusqu'à 14 mois après leur infestation par des nymphes infectées afin d'analyser l'évolution de leur infectivité pour les larves au cours du temps. Ces souris ont été infestées avec des larves à différentes périodes après leur infection, puis ces larves ont été analysées en tant que nymphes (n=13/souris) un mois après leur mue.

Bien qu'une réinfestation seulement a été effectuée pour la plupart des souris, toutes ont démontré une diminution de leur infectivité pour les tiques, la souris infectée par NE4532 mise à part (tableau 22). Une perte totale de l'infectivité a été observée dès quatre mois après la première infection pour la souris infectée par l'isolat NE4049T,

alors que celles infectées par son homologue non transformé (NE4049) étaient encore infectieuses 10 mois après leur infection. La souris infectée par P/sto (A4) n'était, quant à elle, plus infectieuse neuf mois après son infection. Pour NE4049 et NE4051, une diminution de l'infectivité des souris n'a été observée qu'à partir de 10 mois suivant l'infection alors qu'elle était stable encore 5 mois après l'infection.

Tableau 22 : Evolution de l'infectivité des souris pour les larves au cours du temps.

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Infectivité des souris au cours du temps, en mois (%)						
		1	4	5	9	10	12	14
NE5046 (n=1)	A1	13/13 (100)	ne	ne	4/13 (30.8)	ne	ne	ne
NE36 (n=1)	A2	10/13 (76.9)	ne	ne	ne	ne	ne	7/13 (53.8)
E61 (n=1)	A3	8/13 (61.5)	ne	ne	3/13 (23.1)	ne	ne	ne
P/sto (n=1)	A4	3/13 (23.1)	ne	ne	0/13	ne	ne	ne
NE4049 (n=4)		42/52 (80.8)	ne	44/52 (84.6)	ne	14/26 (53.8) ^Δ	ne	ne
NE4049T (n=1)	YU	12/13 (92.3)	0/13	ne	ne	ne	ne	ne
NE4051 (n=4)		36/50 (72)	ne	36/52 (69.2)	ne	14/39 (35.9) ^{ΔΔ}	ne	ne
NE4054 (n=1)	ME	10/13 (76.9)	ne	ne	ne	ne	3/13 (23.1)	ne
NE4532 (n=1)	Ni	2/13 (15.4)	2/13 (15.4)	ne	ne	ne	ne	ne

ne= Non effectué; ^Δn= 2; ^{ΔΔ}n= 3

3.2.3.4 Transmission par co-feeding

Alors que les souris étaient infestées par des nymphes infectées, des larves non infectées ont été ajoutées à proximité immédiate du site de fixation des nymphes pour simuler les conditions de co-feeding. Globalement, 26% (260/1001) des larves se sont infectées en se nourrissant en même temps que les nymphes infectées (co-feeding)(fig. 25). Toutefois, en ne tenant compte que des souris sur lesquelles une transmission par co-feeding a été observée (fréquence du phénomène), soit dans 46.4% (26/56) des cas, le taux d'infection des larves passe de 26% (260/1001) à 48.8% (260/533) (intensité du phénomène).

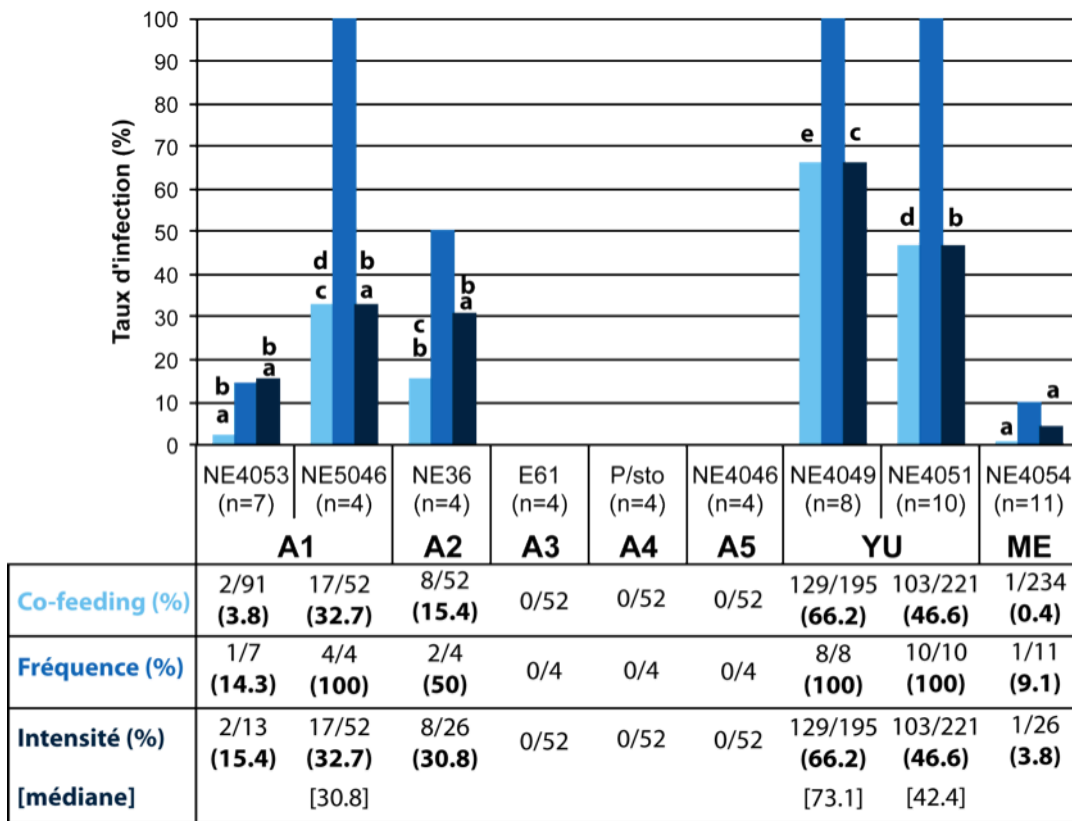


Fig. 25 : Efficacité de transmission de *B. afzelii* par co-feeding, selon l'isolat. Sont représentés le taux de transmission par isolat (co-feeding), le nombre de souris présentant du co-feeding (fréquence), ainsi que le taux de transmission, seulement lorsque une transmission était observée (intensité). a, b, c, d, e= Différences significatives du pourcentage d'infection des larves de co-feeding (GLM, P<0.05); a, b, c, d= Différences significatives de l'intensité du phénomène (GLM, P<0.05).

Les groupes A1, A2, YU et ME ont été transmis de tique à tique lors du co-feeding, alors que les groupes A3, A4 et A5 n'ont pas été transmis par cette voie.

Individuellement, une transmission par co-feeding a eu lieu sur toutes les souris infestées par des nymphes infectées par le groupe YU (NE4049 et NE4051) et un isolat du groupe A1 (NE5046), tandis qu'elle n'a eu lieu que sur 50% (2/4), 14.3% (1/7) et 9.1% (1/11) des souris infestées par des nymphes infectées par les groupes *ospC* A2 (NE36), A1 (NE4053) et ME (NE4054), respectivement.

En considérant l'ensemble des souris sur lesquelles larves et nymphes se sont nourries en co-feeding (n=56), les taux de transmission par co-feeding présentant des écarts de plus de 17.3% sont significatifs (fig. 25, tableau 23). Ainsi, des différences significatives ont été observées entre groupes *ospC* ainsi qu'au sein des groupes A1 et YU. Par contre, en ne tenant compte que des souris sur lesquelles une transmission par co-feeding a eu lieu (intensité du phénomène), seules les souris infestées par des nymphes infectées par NE4049 et NE4051 (YU) ont permis d'observer une intensité de transmission par co-feeding significativement différente des autres isolats. Les nymphes infectées par NE4049 (YU) ont transmis des spirochètes aux larves à un taux plus élevé (66.2%, 129/195) que celles infectées par tous les autres isolats, dont les taux de transmission aux larves variaient de 3.8% (1/26) à 46.6% (103/221). Finalement, une différence a aussi été observée entre l'isolat NE4051 (YU), dont les nymphes ont transmis des spirochètes à 36.6% (103/221) des larves, et l'isolat NE4054 (ME), dont les nymphes ont transmis des spirochètes à seulement 3.8% (1/26) des larves. Des différences significatives ont donc été observées entre groupes *ospC* ainsi qu'au sein d'un même groupe (A1 et YU).

Tableau 23 : Valeurs de P significatives après un test de comparaison post hoc (co-feeding et intensité du phénomène).

Isolats	P	
	Co-feeding	Intensité
NE4049-NE36	<0.001	0.01
NE4051-NE36	0.004	-
NE4054-NE36	0.005	-
NE4051-NE4049	<0.001	<0.001
NE4053-NE4049	<0.001	0.02
NE4054-NE4049	<0.001	0.002
NE5046-NE4049	<0.001	<0.001
NE4053-NE4051	<0.001	-
NE4054-NE4051	<0.001	0.03
NE5046-NE4053	0.02	-
NE5046-NE4054	<0.001	-

-= P>0.05

Résultats

Le modèle expliquant au mieux les variations observées au niveau du co-feeding est à nouveau celui intégrant la variable "isolat" et non "groupe *ospC*", autant au niveau du taux de transmission par co-feeding qu'au niveau de l'intensité du phénomène, le critère d'information d'Akaike étant systématiquement plus faible lorsque la variable "isolat" est utilisée qu'en utilisant la variable "groupe *ospC*" (tableau 24).

Tableau 24 : Comparaison des variables explicatives dans un modèle linéaire généralisé appliqué à la transmission par co-feeding.

Transmission	Type de transmission	Modèle	dr	dl	AIC
Par co-feeding	Intensité	Groupe <i>ospC</i>	671.8	517	679.8
		Isolat	650.6	515	662.6
	Co-feeding total	Groupe <i>ospC</i>	701.7	815	709.7
		Isolat	667	813	679

Déviante résiduelle (**dr**), degrés de liberté (**dl**) et critère d'information d'Akaike (**AIC**) des modèles linéaires généralisés incluant soit le groupe *ospC* soit les différents isolats comme variable explicative.

L'analyse des variances (ANOVA) entre les modèles "groupe *ospC*" et "isolat" démontre aussi que la variable "isolat" est celle qui explique au mieux les variations observées dans les taux de transmission par co-feeding (tableau 25).

Tableau 25 : Analyse des variances des deux modèles linéaires généralisés appliqués à la transmission par co-feeding.

Transmission	Type de transmission	Comparaison	Δdr	Δdl	P
Par co-feeding	Intensité	Isolat/ <i>Groupes</i>	21.2	2	<0.0001
	Co-feeding total	<i>ospC</i>	34.6	2	<0.0001

Différence de déviance résiduelle (**Δdr**), de degrés de liberté (**Δdl**) et valeur de P (**P**).

En résumé, les différences observées dans l'efficacité de transmission par co-feeding sont liées à l'isolat plutôt qu'à l'appartenance à un certain groupe *ospC*. Des différences significatives dans l'infectivité des souris ont donc été observées entre groupes *ospC* ainsi qu'au sein des groupes *ospC* A1 et YU. Des efficacités de transmission par co-feeding élevées ont été rencontrées pour les isolats NE5046 (A1), NE36 (A2), NE4049 et NE4051 (YU), tandis qu'elles étaient faibles pour les isolats NE4051 (A1) et NE4054 (ME). Les isolats fortement infectieux pour les souris amènent, comme nous l'avons vu, à des infectivités pour les tiques élevées, mais ils ne se transmettent pas forcément fortement par co-feeding, ce qui a été le cas pour les isolats E61 (A3) et P/sto (A4).

3.2.3.5 Relations entre les différentes voies de transmission de *B. afzelii* lors d'infection naturelle

En faisant la synthèse des prévalences d'infection des souris, de leur infectivité respective et de la capacité de transmission par co-feeding par isolat lors d'infections naturelles, certaines caractéristiques liant ces différentes voies de transmission ont été observées.

Les isolats NE5046 (A1), NE36 (A2), E61 (A3), NE4049 et NE4051 (YU) ont induit les plus fortes prévalences d'infection des souris, mais aussi les plus fortes infectivités des souris pour les tiques (fig. 26, tableau 26). Par contre, P/sto (A4) n'a été que faiblement transmis des souris aux tiques, et NE4053 (A1) et NE4054 (ME) n'ont infecté que peu de souris, qui n'ont à leur tour que peu transmis de spirochètes aux tiques. De la même manière, les taux de transmission par co-feeding les plus élevés ont été retrouvés avec les isolats les plus infectieux pour les tiques, à l'exception de E61 (A3) qui n'a pas été transmis par co-feeding. Ainsi, les transmissions par co-feeding les plus efficaces ont été observées pour les isolats NE5046 (A1), NE36 (A2), NE4049 et NE4051 (YU), tandis qu'elles étaient faibles pour NE4053 (A1) et NE4054 (ME) et qu'aucune transmission par co-feeding n'a été observée avec P/sto (A4), ni avec NE4046 (A5), qui n'était infectieux ni pour les souris ni pour les tiques.

Tableau 26 : Résultats détaillés de la dynamique de transmission de *B. afzelii* lors d'infection naturelle.

Groupe <i>ospC</i>	Isolat	Prévalence d'infection des souris		Infectivité des souris	Intensité du Co-feeding
		Biopsie	Xénodiagnose		
A1	NE4053	1/7 (14.3)	1/7 (14.3)	1/26 (3.8)	2/13 (15.4)
	NE5046	4/4 (100)	4/4 (100)	48/52 (92.3)	17/52 (32.7)
A2	NE36	4/4 (100)	4/4 (100)	35/52 (67.3)	8/26 (30.8)
A3	E61	2/4 (50)	3/4 (75)	21/39 (53.8)	-
A4	P/sto	1/4 (25)	4/4 (100)	8/52 (15.4)	-
A5	NE4046	0/4 (0)	0/4 (0)	-	-
YU	NE4049	9/9 (100)	9/9 (100)	100/117 (85.5)	129/195 (66.2)
	NE4051	8/10 (80)	9/10 (90)	81/115 (70.4)	103/221 (46.6)
ME	NE4054	1/10 (10)	3/10 (30)	12/39 (30.8)	1/26 (3.8)
Totaux		30/56 (53.6)	37/56 (66.1)	306/492 (62)	260/533 (48.8)
			38/56 (67.9)		

Résultats

Globalement, plus un isolat est transmis par co-feeding (fréquence du phénomène), plus la transmission est importante (intensité du phénomène) ($r=0.93$, $P=0.00035$) (fig. 27). Cette intensité de transmission par co-feeding est ensuite intimement liée à l'infectivité des souris pour les tiques. En effet, les isolats démontrant une forte intensité de transmission par co-feeding montrent aussi une forte infectivité des souris pour les tiques ($r=0.76$, $P=0.018$). Il y a toutefois une exception : les souris infectées par E61 (A3) ont transmis des spirochètes à plus de 50% des larves, alors qu'aucune transmission par co-feeding n'a été observée (tableau 26). Malgré cela, il en découle tout de même qu'une fréquence de co-feeding élevée présage une forte infectivité de la souris pour les tiques ($r=0.85$, $P=0.0036$). Finalement, les isolats qui ont amené aux prévalences d'infection des souris les plus élevées sont aussi les plus infectieux pour les tiques ($r=0.76$, $P=0.016$). A nouveau, une exception a été observée pour P/sto (A4), qui a infecté toutes les souris ($n=4$), alors qu'il n'a ensuite été transmis qu'à 15.4% (8/52) des tiques. Il est à noter que pour cet isolat, toutes les souris ont transmis des spirochètes aux larves, mais à des taux chaque fois très faibles (1/13, 2/13, 2/13, 3/13, annexe 9.3).

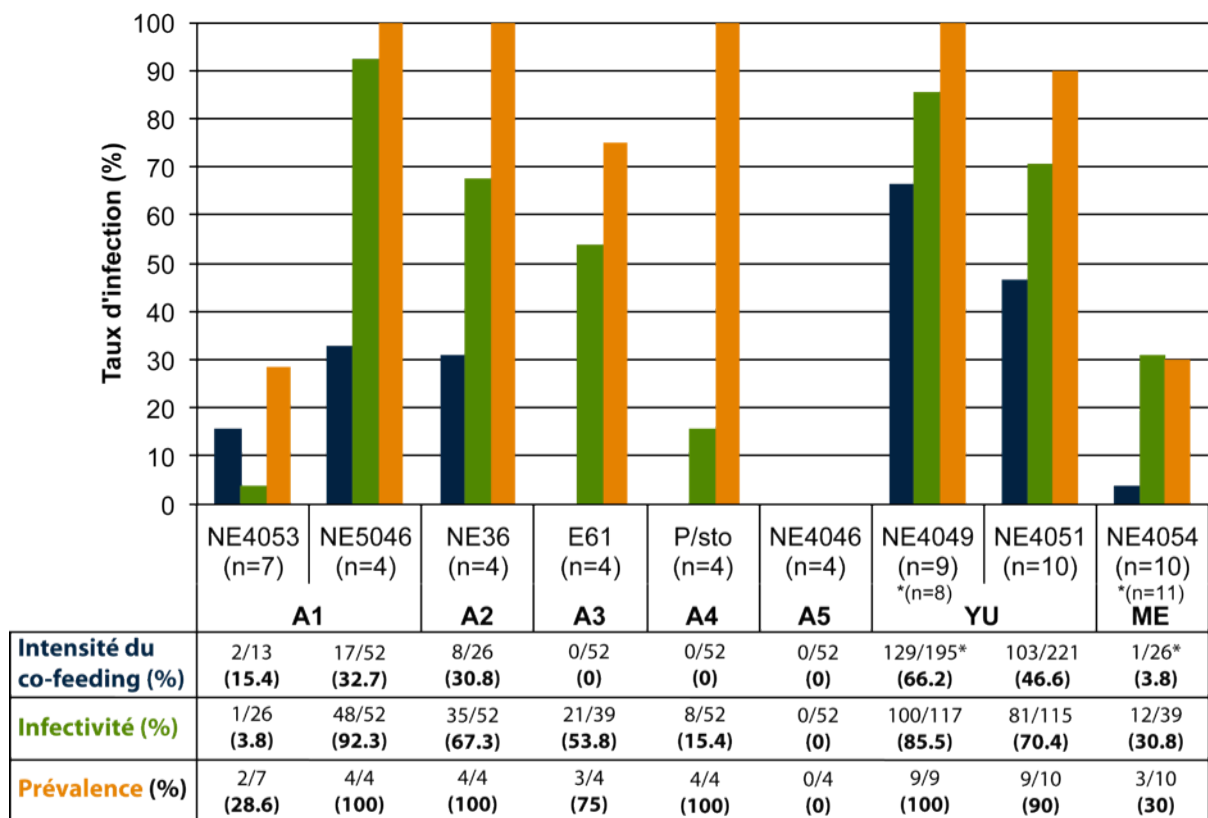


Fig. 26 : Dynamique de transmission de *B. afzelii* lors d'infection naturelle, selon l'isolat. Sont représentées l'intensité de transmission par co-feeding, l'infectivité des souris et la prévalence d'infection des souris.

Par contre, il n'existe pas de corrélation entre la fréquence ainsi que l'intensité de la transmission par co-feeding et la prévalence d'infection des souris. La capacité des isolats à infecter des souris est indépendante de la fréquence à laquelle une transmission par co-feeding est observée ainsi que de leur aptitude à passer d'une nymphe infectée aux larves (intensité).

Résultats

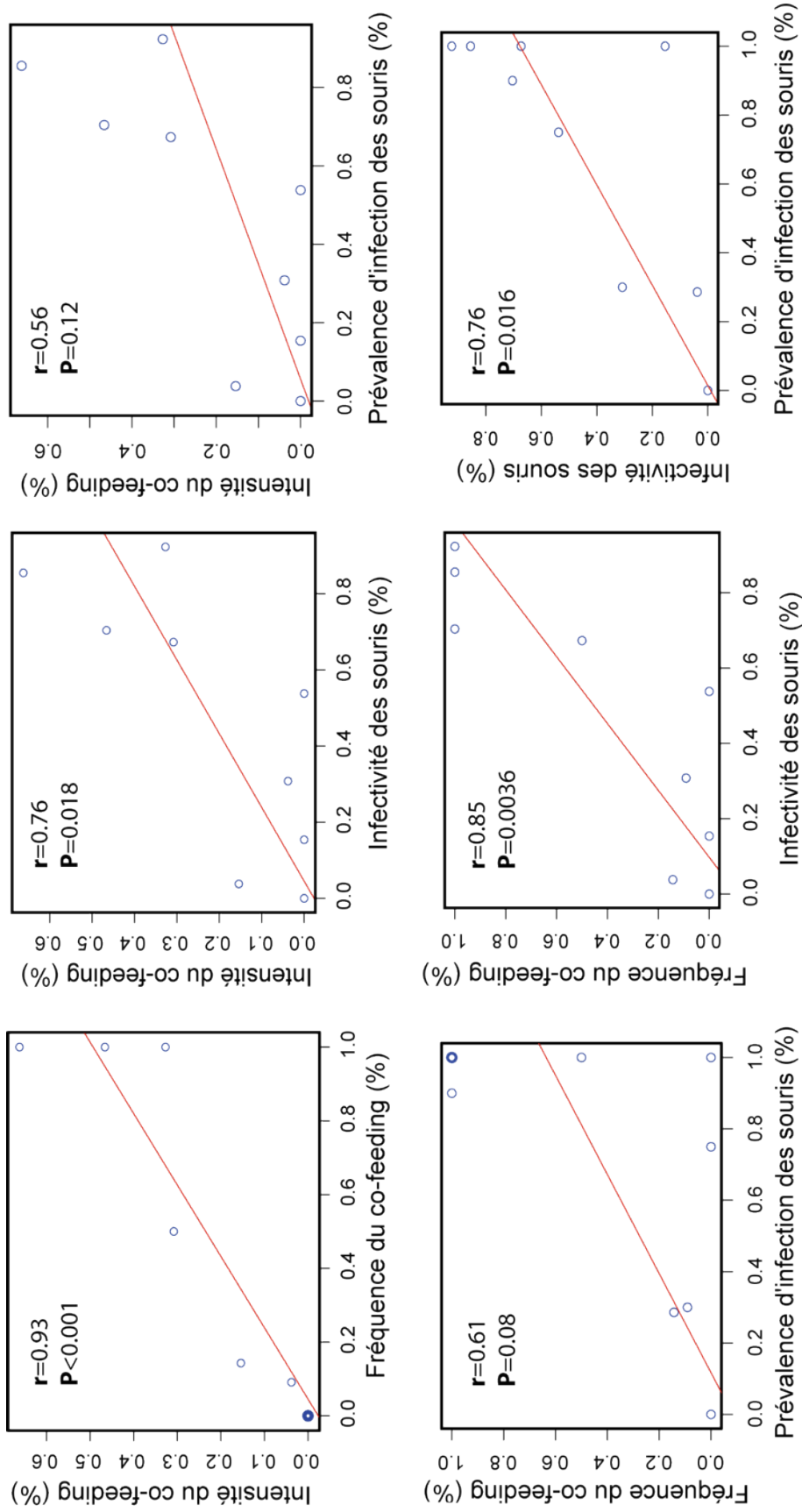


Fig. 27 : Corrélation entre les différentes voies de transmission lors d'infection naturelle.
r= Coefficient de corrélation de Pearson; **P**= p-value (P); **O**: n= 1; **●**: n= 2

Pour résumer, la capacité d'un isolat à infecter une tique corrèle autant avec la voie de transmission par co-feeding qu'avec l'infectivité des souris, tandis que sa capacité à infecter une souris n'est corrélée qu'à son infectivité (fig. 28). Un isolat fortement infectieux pour les souris est donc fortement infectieux pour les tiques, mais n'implique pas nécessairement une bonne transmission par co-feeding.

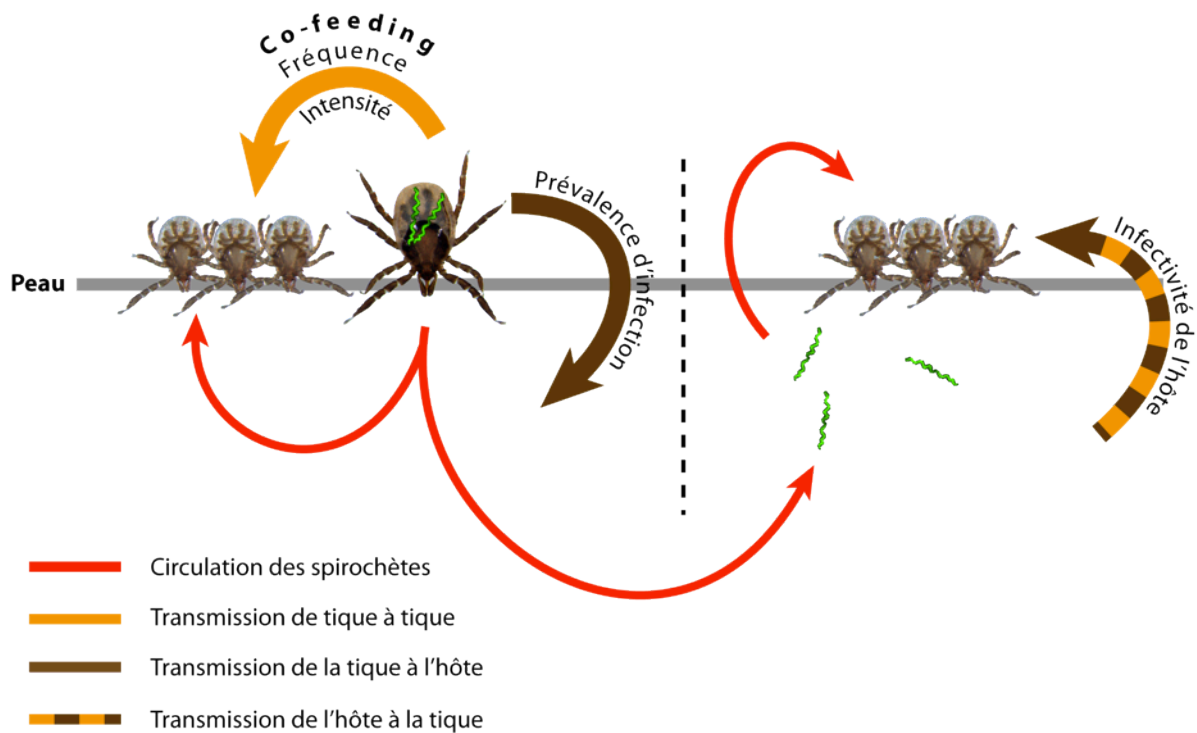


Fig. 28 : Représentation des corrélations entre les différentes voies de transmission. L'infectivité des souris est corrélée à l'intensité du co-feeding ainsi qu'à sa prévalence d'infection. La fréquence et l'intensité du co-feeding sont par contre indépendantes de la prévalence d'infection des souris (N. Tonetti).

3.2.4 Comparaison des prévalences d'infection des souris et de leur infectivité entre les infections par injection sous-cutanée et naturelles

Dans ce chapitre, les résultats obtenus lors d'infections naturelles et après injection sous-cutanée ont été comparés pour les souris infectées par ces deux méthodes d'infection (tableau 27).

La prévalence d'infection des souris après une injection sous-cutanée est de 87.5% (14/16), tandis qu'elle atteint seulement 54.1% (20/37) lors d'infestations par des nymphes infectées pour les groupes *ospC* A1 (NE4053 et NE5046), A2 (NE36), A3 (E61), A4 (P/sto), A5 (NE4046) et ME (NE4054)(tableau 27) ($P=0.02$, one-tailed Fisher exact probability test). L'infectivité globale des souris pour les tiques est par contre semblable entre les deux types d'infections (52.7% et 48.1%), mais diffère pour certains isolats. En effet, alors que des infectivités proches ont été trouvées pour les isolats NE4053, NE5046 et NE36 en comparant les deux méthodes d'infection, des différences significatives ont été observées pour les isolats E61, P/sto et NE4054 ($P=0.002$, 0.0002 et 0.0008, respectivement, one-tailed Fisher exact probability test). L'infectivité des souris infectées par voie naturelle par l'isolat E61 était plus élevée (53.8%, 21/39) qu'après leur infection par injection sous-cutanée (19.2%, 5/26, $P=0.002$, one-tailed Fisher exact probability test). L'inverse a par contre été observé avec les isolats P/sto et NE4054, les souris ayant transmis des spirochètes à 57.7% (15/26) et 73.1% (19/26) des tiques après injection sous-cutanée contre 15.4% (8/52) et 30.8% (12/39) lors d'infection naturelle, respectivement ($P=0.0002$. et 0.0008, respectivement, one-tailed Fisher exact probability test).

Tableau 27 : Comparaison des prévalences d'infection des souris et de leur infectivité entre les infections par injection sous-cutanée et naturelles.

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Prévalence d'infection des souris ^A		Infectivité des souris (%)	
		Sous-cutanée	Infestation	Sous-cutanée	Infestation
NE4053	A1	2/4	2/7	3/26 (11.5)	1/26 (3.8)
NE5046		2/2	4/4	21/26 (80.8)	48/52 (92.3)
NE36	A2	2/2	4/4	12/26 (46.2)	35/52 (67.3)
E61	A3	2/2	3/4	5/26 (19.2)	21/39 (53.8)*
P/sto	A4	2/2	4/4	15/26 (57.7)	8/52 (15.4)*
NE4046	A5	2/2	0/4	21/26 (80.8)	-
NE4054	ME	2/2	3/10	19/26 (73.1)	12/39 (30.8)*
Totaux		14/16 (87.5)	20/37 (54.1)*	96/182 (52.7)	125/260 (48.1)

^AObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose. *= Différences significatives (P<0.05).

3.3 Temps de latence avant transmission de spirochètes de la tique à l'hôte

Comme il a été mentionné dans l'introduction (1.4.1.1), les spirochètes ne sont pas transmis dès le début du repas sanguin. Ils ne migrent dans les glandes salivaires qu'après un certain temps, évalué à environ 24 heures pour *B. afzelii* chez *I. ricinus* (Gern *et al.*, 1996; Crippa *et al.*, 2002). Toutefois, il apparaît que cette règle n'est pas immuable. Certaines expériences ont montré une transmission dès 17 heures (Kahl *et al.*, 1998), tandis qu'il faut généralement plus de 32 heures de repas sanguin pour que *B. burgdorferi* ss soit transmis aux hôtes par *I. scapularis*, tout en observant des cas de transmission dès 24 heures (Piesman *et al.*, 1987; Ribeiro *et al.*, 1987) et *I. ricinus* (Crippa *et al.*, 2002). Dès lors, nous avons voulu voir si ce temps de latence avant transmission pouvait varier au niveau intraspécifique chez *B. afzelii* et être influencé par l'appartenance des isolats à un groupe *ospC* donné (A1, A2, A3, A4, YU).

Dans cette expérience, des souris ont chacune été infestées par trois nymphes infectées avec les isolats NE5046, NE36, E61, P/sto, NE4049 et NE4051, pour une durée de 12, 24 et 32 heures de repas sanguin (tableau 28). Une infestation pendant 48 heures a aussi été effectuée, mais pour les isolats NE4049 et NE4051 (YU) seulement. La prévalence d'infection des souris ainsi que leur infectivité a ensuite été déterminée 30 jours après l'infestation par biopsie d'oreille et xénodiagnose.

Résultats

Une infection systémique a été observée chez 1/5 souris infestées par des nymphes infectées par NE4051 (YU), ce dès 24 heures de repas sanguin (tableau 28). Les souris infestées pendant 32 et 48 heures étaient aussi infectées (n=3). Il a par contre fallu au moins 32 heures de repas sanguin pour que des nymphes infectées par NE4049 (YU) infectent des souris (n=2) de manière systémique. Toutes les souris (n=5) étaient par contre infectées après une infestation de 48 heures (tableau 28). Les souris infectées se sont avérées infectieuses pour les tiques et ont transmis des spirochètes aux larves à des taux variant de 84.6% (22/26) à 96.9% (63/65) pour NE4049 et de 53.8% (7/13) à 82.1% (32/39) pour NE4051 en fonction de la durée de repas sanguin infectieux, sans que ces différences soient significatives.

Tableau 28 : Prévalence d'infection des souris et leur infectivité en fonction de la durée du repas sanguin de nymphes infectées.

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Prévalence d'infection des souris ^Δ			
		Infectivité des souris (%)			
		12H	24H	32H	48H
NE5046	A1	0/5	0/4	0/4	ne
NE36	A2	0/5	0/4	0/4	ne
E61	A3	0/5	0/4	0/4	ne
P/sto	A4	0/4	0/4	0/4	ne
NE4049	YU	0/5	0/5	2/5 22/26 (84.6)	5/5 63/65 (96.9)
NE4051		0/5	1/5 7/13 (53.8)	3/5 32/39 (82.1)	3/5 30/39 (76.9)

^ΔObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose; **ne**= Non effectué.

Par contre, les souris infestées par des nymphes infectées par les isolats appartenant autres groupes *ospC* (A1, A2, A3 et A4) n'ont pas développé d'infection systémique, même après 32 heures de repas sanguin des nymphes, alors que ces isolats sont capables d'infecter des souris après repas sanguin complet, comme il a été vu précédemment (chapitre 3.2.3.1, fig. 23).

En résumé, des différences dans le temps de repas sanguin des nymphes nécessaire pour infecter une souris ont été observées entre isolats. Alors qu'un repas sanguin de 12 à 24 heures était suffisant pour observer une transmission de NE4051

(YU) de la tique à la souris, plus de 48 heures de repas sanguin semblent nécessaires pour que NE5046 (A1), NE36 (A2), E61 (A3) et P/sto (A4) soient transmis de la tique à la souris.

3.3.1 Taux d'infection des tiques infectantes au cours du repas sanguin

L'examen du taux d'infection des nymphes prélevées au cours du repas sanguin a révélé deux situations distinctes (fig. 29, fig. 30). Soit les taux d'infection des nymphes sont restés stables, soit ils ont varié. Les nymphes infectées par les groupes *ospC* A1, A2 et A3 ont montré un taux d'infection constant pendant le repas sanguin, sans démontrer de variations sur la durée, tandis que la situation était différente pour le groupe A4 (P/sto)(fig. 29). Ici une diminution significative systématique du nombre de nymphes infectées après repas sanguin partiel a été observée, comparé au taux d'infection des nymphes avant repas sanguin ($P_{0-12}=0.0005$ $P_{0-24}=0.04$, $P_{0-32}=0.006$, one-tailed Fisher exact probability test). Lors du repas sanguin, un doublement du nombre de nymphes infectées après 12 heures de repas sanguin (24%) et 24 heures de repas sanguin (47.4%), puis une diminution à 32 heures (35%) ont été constatés, sans que ces différences ne soient toutefois significatives.

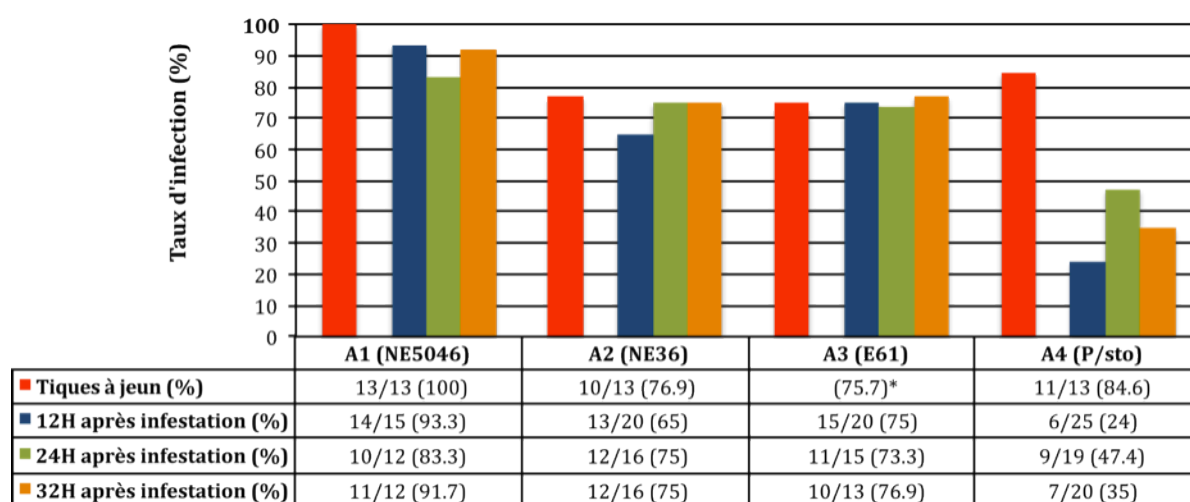


Fig. 29 : Taux d'infection des nymphes après gorgement partiel.

*Pool de 32 tiques à un taux d'infection de 84.6% (11/13) et 20 tiques à un taux d'infection de 61.5% (8/13)

Résultats

Il est à noter que les nymphes utilisées pour infecter des souris avec le groupe A4 (P/sto) étaient âgées de 10 mois, tandis que les nymphes utilisées pour les autres groupes avaient mué 8 mois, 7 mois et 3 mois auparavant pour A1 (NE5046), A2 (NE36) et A3 (E61), respectivement. Pour le groupe YU, une variation du taux d'infection des nymphes au cours du repas sanguin a également été retrouvée pour l'isolat NE4051, mais pas pour l'isolat NE4049 (fig. 30). Une diminution du taux d'infection des nymphes infectées par NE4051 après repas sanguin partiel a été observée pour des durées de repas de 12 heures ($P=0.0007$, one-tailed Fisher exact probability test) et 32 heures ($P=0.03$, one-tailed Fisher exact probability test). Ici, le lot de tiques infectées par NE4051 (YU) utilisé pour un repas sanguin de 12 heures était âgé d'environ 12 mois, tandis que les tiques utilisées pour une infestation de 32 heures avaient mué 4 mois auparavant seulement.

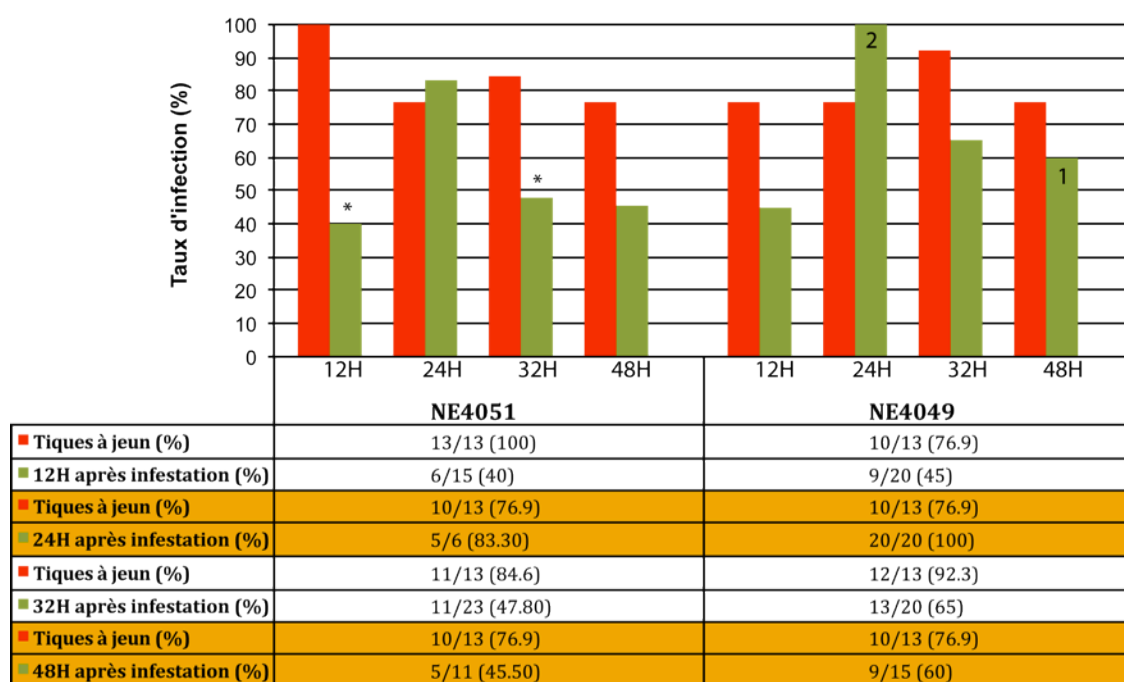


Fig. 30 : Taux d'infection des nymphes au cours du repas sanguin pour le groupe YU. En orange, les nymphes provenant du même lot. 1, 2= Différences significatives en fonction des différents temps de repas sanguin; *= Différences significatives entre les taux d'infection pré- et post-infestation ($P<0.05$, one-tailed Fisher exact probability test).

Pour ces isolats (NE4049 et NE4051), seules les expériences menées pendant 24 heures et 48 heures de repas sanguin ont été effectuées avec des nymphes provenant du même lot de tiques (en orange sur le graphique), ce qui rend les comparaisons avec les autres temps de repas sanguin délicates. Néanmoins, les taux d'infection des nymphes

ayant infesté des souris pendant 24 ou 48 heures de repas sanguin sont différents pour l'isolat NE4049 ($P < 0.03$, one-tailed Fisher exact probability test). Une augmentation non significative du nombre de nymphes infectées après 24 heures de repas sanguin a été observée, suivie par une diminution significative du nombre de nymphes infectées après 48 heures de repas sanguin.

3.3.2 Evolution de l'infection des nymphes au cours du temps

Cette diminution du nombre de nymphes infectées au cours du repas sanguin pouvant provenir d'une perte de l'infection chez les tiques à jeun au cours du temps, d'autant que ces baisses d'infection coïncident en partie avec des lots de nymphes âgées, la présence de spirochètes chez des nymphes provenant de mêmes lots ($n=6$) a été évaluée à différents temps après leur mue pour les isolats NE4049 et NE4051.

Les nymphes ont maintenu leur infection pendant six mois, voire 9 mois après la mue pour NE4049 et jusqu'à une année pour NE4051 (lot 2), quelque soit le lot (tableau 29). Une seule exception a été constatée pour le quatrième lot de nymphes infectées par NE4051 (YU), pour lequel une diminution du nombre de nymphes infectées de 92.3% (12/13) à 50% (5/10) a été observée après six mois ($P=0.03$, one-tailed Fisher exact probability test).

Tableau 29 : Infection des nymphes à jeun au cours du temps

Isolat	Lot de nymphes	Temps après la mue, en mois (%)			
		1	6	9	12
NE4051 (YU)	1	9/13 (69.2)	8/10 (80)	ne	ne
	2	9/13 (69.2)	ne	ne	8/10 (80)
	3	7/13 (53.8)	7/10 (70)	ne	ne
	4	12/13 (92.3)	5/10 (50)*	ne	ne
NE4049 (YU)	1	13/13 (100)	ne	9/10 (90)	ne
	2	12/13 (92.3)	ne	10/10 (100)	ne

ne= Non effectué; *= Différence significative ($P=0.03$, one-tailed Fisher exact probability test)

3.4 Temps de latence avant transmission de l'hôte à la tique

Voyant qu'un attachement des nymphes aux souris de 12 à 24 était nécessaire pour que des nymphes infectées par le groupe *ospC* YU (NE4049) transmettent des spirochètes aux souris et que plus de 32 heures semblaient nécessaires pour les autres groupes *ospC* (A1, A2, A3, A4), une expérience visant à évaluer le temps nécessaire aux spirochètes pour passer des souris aux tiques a été entreprise pour le groupe YU (NE4049 et NE4051), transmis rapidement de la tique à la souris, et le groupe A2 (NE36), transmis plus tardivement.

Dans un premier temps, des souris infectées de manière naturelle par les isolats NE4049 et NE4051 ont chacune été infestées par des nymphes saines, retirées par lot de 10 après 6, 12, 24, 32 et 48 heures de repas sanguin. Une transmission de spirochètes des souris infectées à 10% (2/20) des tiques a été observée entre six et 12 heures de repas sanguin pour l'isolat NE4049, tandis que plus de 12 heures de repas sanguin ont été nécessaires pour que les souris infectées par NE4051 infectent 3.3% (1/30) des tiques (tableau 30). L'infectivité des souris pour les tiques n'a ensuite pas varié de manière significative avec la durée de repas sanguin, atteignant 6.7% (2/30) pour NE4049 et 16.7% (5/30) pour NE4051 après 48 heures repas sanguin.

Tableau 30 : Temps de latence avant transmission de spirochètes de l'hôte infecté à la tique après extraction d'ADN au NH₄OH.

Isolat	Infectivité des souris en fonction du temps de repas sanguin des nymphes				
	6H	12H	24H	32H	48H
NE4049 (n=3)	0/20*	2/20 (10)*	0/20*	1/30 (3.3)	2/30 (6.7)
NE4051 (n=3)	0/30	0/30	1/30 (3.3)	6/30 (20)	5/30 (16.7)

ne= Non effectué; n= Nombre de souris par isolat; *n= 2.

Comparées aux infectivités des souris pour les larves observées lors d'un repas sanguin complet (chapitre 3.2.3.2), qui étaient de 85.5% (100/117) pour NE4049 et 70.4% (81/115) pour NE4051 (fig. 24), les infectivités obtenues ici sont faibles.

Voyant ces différences, cette expérience a été répétée avec les mêmes souris pour 24, 32 et 48 heures de repas sanguin, ainsi qu'avec quatre souris infectées par l'isolat

NE36 (A2) pour 6, 12, 24 et 32 heures de repas sanguin infectieux. Ici, les tiques ont été placées en culture après leur retrait, puis l'ADN extrait par thermolysat, alors que, rappelons-le, l'ADN des tiques de l'expérience précédente avait été extrait au NH₄OH. Comme contrôle, un lot de tiques nourries pendant 24 heures sur les souris infectées par NE4049 et NE4051 a été extrait au NH₄OH, comme dans l'expérience précédente. Les infectivités des souris pour les nymphes obtenues après thermolysat de culture étaient systématiquement plus élevées que celles observées après une extraction au NH₄OH dans l'expérience précédente, mais aussi pour le lot de tique contrôle (tableau 31). En effet, l'infectivité des souris variait de 50% (15/30) et 80% (24/30) après 24 heures de repas sanguin à 70% (21/30) et 93.3% (28/30) après 48 heures pour NE4049 et NE4051, respectivement, en extrayant l'ADN par thermolysat de culture. Alors que l'infectivité des souris pour les tiques était semblable entre ces deux isolats lors d'un repas sanguin complet (chapitre 3.2.3.2), l'infectivité des souris pour les tiques après un repas sanguin interrompu est significativement différente entre NE4049 et NE4051, NE4051 étant plus fortement transmis aux tiques que NE4049 ($P_{24}=0.01$, $P_{32}=0.009$, $P_{48}=0.02$, one-tailed Fisher exact probability test). En extrayant l'ADN au NH₄OH par contre, l'infectivité des souris variait de 3.3% (1/30) à 20% (6/30) pour les mêmes lots de tiques après 24 heures de repas sanguin (tableau 30). La méthode d'extraction utilisée ici pour la détection de l'infection chez les nymphes partiellement gorgées, soit la mise en culture, est donc significativement plus sensible que la méthode d'extraction par NH₄OH ($P<0.0001$, one-tailed Fisher exact probability test).

Tableau 31 : Temps de latence avant transmission de spirochètes de l'hôte infecté à la tique après extraction d'ADN par thermolysat de culture.

Méthode d'extraction	Isolat	Infectivité des souris en fonction du temps de repas sanguin des nymphes				
		6H	12H	24H	32H	48H
NH ₄ OH	NE4049 (n=3)	ne	ne	1/30 (3.3)	ne	ne
	NE4051 (n=3)	ne	ne	6/30 (20)	ne	ne
Thermolysat	NE4049 (n=3)	ne	ne	15/30 (50)	12/30 (40)	21/30 (70)
	NE4051 (n=3)	ne	ne	24/30 (80)	22/30 (73.3)	28/30 (93.3)
	NE36 (n=4)	4/40 (10)	19/40 (47.5)	30/40 (75)	20/36 (55.6)	ne

ne= Non effectué; n= Nombre de souris par isolat.

Pour le groupe *ospC* A2 (NE36), une transmission dès six heures de repas sanguin infectieux a été observée chez 10% (4/40) des nymphes infestant les souris infectées.

Résultats

Ces souris ont ensuite transmis des spirochètes à 47.5% (19/40), 75% (30/40) et 55.6% (20/36) des tiques s'étant gorgées pendant 12, 24 et 32 heures de repas sanguin, respectivement.

Les souris infectées transmettent des spirochètes aux tiques dès six heures après le début du repas sanguin, avec une augmentation de l'efficacité de transmission au cours du temps de repas. Alors que les infectivités des souris pour les tiques étaient semblables lors d'un repas sanguin complet, l'isolat NE4051 est plus fortement transmis aux tiques que NE4049 au début du repas sanguin.

3.5 Facteurs influençant l'infectiosité des spirochètes

Nous avons vu que les spirochètes des tiques à jeun ne sont pas infectieux pour l'hôte (Piesman, 1993; Crippa *et al.*, 2002). Certains stimuli, tels que la température, sont nécessaires pour déclencher le pouvoir infectieux des spirochètes (Crippa *et al.*, 2002).

Ainsi, l'effet de la température sur l'infectiosité des spirochètes a été testé sur des tiques infectées, qui ont été broyées et inoculées à des souris (chapitre 3.5.1) ainsi que lors d'infestations avec des nymphes infectées, exposées préalablement à une température de 37°C (chapitre 3.5.2).

3.5.1 Effets de la température sur l'infectiosité des spirochètes lors d'injections sous-cutanées de broyats de nymphes infectées

Des lots de nymphes contenant trois nymphes infectées par les groupes *ospC* A1 (NE5046), A2 (NE36), A3 (E61) et YU (NE4049 et NE4051) ont été broyées dans du milieu BSK-H. Le produit du broyat a été injecté aux souris de manière sous-cutanée et la présence de spirochètes dans ces broyats a ensuite été contrôlée par mise en culture (tableau 32).

Sachant que les spirochètes présents dans les tiques à jeun ne sont normalement pas infectieux (Piesman, 1993; Crippa *et al.*, 2002), que le contact avec le milieu de culture à température ambiante n'induit pas leur infectiosité, mais qu'ils le deviennent

lorsqu'ils sont maintenus en culture 24 heures à 34°C (Crippa *et al.*, 2002), il a été décidé d'exposer les spirochètes des tiques à jeun à un milieu préchauffé à 34°C afin de vérifier si un choc thermique pouvait avoir un effet immédiat sur l'infectiosité des spirochètes. Ainsi, chaque souris du premier groupe (n=15) a été inoculée par un broyat de trois nymphes, infectées par les isolats NE5046, NE36, E61, NE4049 et NE4051, préalablement broyées dans le milieu de culture préchauffé à 34°C et directement injecté aux souris. Aucune des 15 souris, de ce groupe n'était infectée 30 jours après l'injection (tableau 32).

Tableau 32 : Effets de la température sur l'infectiosité des spirochètes lors d'injections sous-cutanées de broyats de nymphes infectées.

Groupes	Traitement	Mode d'infection	Isolat	Nb. de nymphes broyées par souris	Prévalence d'infection des souris ^A
Groupe 1	Nymphes à jeun broyées.	Injection sous-cutanée du broyat	NE5046 (A1)	3	0/3
			NE36 (A2)	4	0/3
			E61 (A3)	4	0/3
			NE4049 (YU)	3	0/3 ^{ΔΔ}
			NE4051 (YU)	3	0/3 ^{ΔΔ}
Groupe 2	Nymphes à jeun broyées et placées 24H à T. ambiante	Injection sous-cutanée du broyat	NE5046 (A1)	3	0/3
			NE36 (A2)	4	0/3
			E61 (A3)	4	0/3
			NE4049 (YU)	3	0/3
			NE4051 (YU)	3	0/3 ^{ΔΔ}
Groupe 3	Nymphes à jeun broyées et placées 24H à 37°C	Injection sous-cutanée du broyat	NE5046 (A1)	3	0/3
			NE36 (A2)	4	2/3
			E61 (A3)	4	0/3
			NE4049 (YU)	3	0/3
			NE4051 (YU)	3	0/3 ^{ΔΔ}

^AObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose; ^{ΔΔ}Obtenu par biopsie; ne= Non effectué

Pour les groupes de souris 2 et 3, les broyats de nymphes ont été incubés 24 heures, soit à température ambiante, soit à 37°C avant injection, imitant ainsi la température d'une tique se nourrissant sur un hôte. Ici, le groupe 2 a permis d'évaluer l'effet potentiel du milieu de culture sur l'infectiosité des spirochètes, sans effet de température et le groupe 3, d'évaluer l'effet de la température. Sachant que l'infectiosité, mais aussi l'expression d'*ospC* peuvent être induites par la seule augmentation de la température en culture (Crippa *et al.*, 2002; Ojaimi *et al.*, 2003), des différences étaient

attendues entre les groupes de souris deux et trois et entre isolats. Effectivement, seules les souris inoculées par des broyats maintenus à 37°C pendant 24 heures ont développé une infection. Ainsi, deux souris sur trois ont été infectées par NE36 (A2) (tableau 32). Cependant, cela n'a pas été observé chez les souris (n=27) inoculées par les isolats des autres groupes *ospC*.

3.5.2 Effets de la température sur l'infectiosité des spirochètes lors d'infestation avec des nymphes infectées

Puisque l'expression d'*ospC* peut être induite par une augmentation de la température en culture (Ojaimi *et al.*, 2003) et que les changements de température environnante influencent l'infectiosité des spirochètes en culture (tableau 32), mais aussi dans les tiques, puisque des broyats de nymphes infectées nourries pendant 24 heures sur des souris sont infectieux (Crippa *et al.*, 2002), l'hypothèse qu'une induction pouvait aussi être attendue dans la tique maintenue à une température plus élevée que la température ambiante, permettant aux nymphes de transmettre leurs spirochètes plus rapidement aux souris qu'une transmission entre 12 et 24 heures, telle qu'observée précédemment avec le groupe YU (chapitre 3.3, tableau 28) a été émise. Ainsi, des nymphes infectées par les deux isolats du groupe YU (NE4049 et NE4051) ont été placées à 37°C pendant 24 heures, puis utilisées pour infester des souris pendant 12 ou 24 heures.

Une souris s'est montrée infectée après avoir été infestée pendant 12 heures par des tiques infectées par NE4049 (tableau 33), bien que toutes les autres souris, infestées pendant 12 (n=5) ou 24 heures (n=6) n'ont pas été infectées, ni par l'isolat NE4049, ni par NE4051 (tableau 33).

Tableau 33 : Effet de la température sur la durée de repas sanguin nécessaire pour infecter un hôte.

Groupes	Traitement	Infection	Isolat	Nb. de nymphes par souris	Prévalence d'infection des souris ^Δ
Groupe 4	Nymphes à jeun placées à 37°C pendant 24H	Infestation pendant 12H	NE4049 (YU)	3	1/3
			NE4051 (YU)	3	0/3 ^{ΔΔ}
		Infestation pendant 24H	NE4049 (YU)	3	0/3 ^{ΔΔ}
			NE4051 (YU)	3	0/3 ^{ΔΔ}

^ΔObtenu par biopsie et xénodiagnose; ^{ΔΔ}Obtenu par biopsie

La température est donc bien un facteur suffisant pour déclencher l'infectiosité des spirochètes présents dans les tiques à jeun et pourrait accélérer le temps de latence entre la fixation des tiques et le début de transmission de l'agent pathogène.

3.6 Quantification des borréliés présentes dans les tiques

Lors de l'évaluation de l'infectiosité des souris et de la capacité d'un isolat à être transmis par co-feeding, 13 tiques étaient analysées par lot. Voyant que certaines extractions d'ADN amenaient à des signaux faibles en RLB après PCR, une real-time PCR quantitative (qPCR) a été effectuée sur des échantillons ayant donné des signaux d'intensité variée en RLB. Des tiques (n=39) de trois souris différentes (A, B et C), testées en RLB, ont été analysées à nouveau en qPCR. Il s'est avéré que les échantillons faiblement détectés en RLB contenaient moins de spirochètes que les échantillons ayant démontré de fortes hybridations, qui se traduisent par des signaux d'intensité élevée (fig. 31, tableau 34). Ainsi, les intensités faibles rencontrées pour les échantillons A1 et A4 se sont traduites par des nombres de spirochètes de 451 et 987 individus par tique, respectivement, tandis que les autres échantillons contenaient tous plus de 80000 spirochètes.

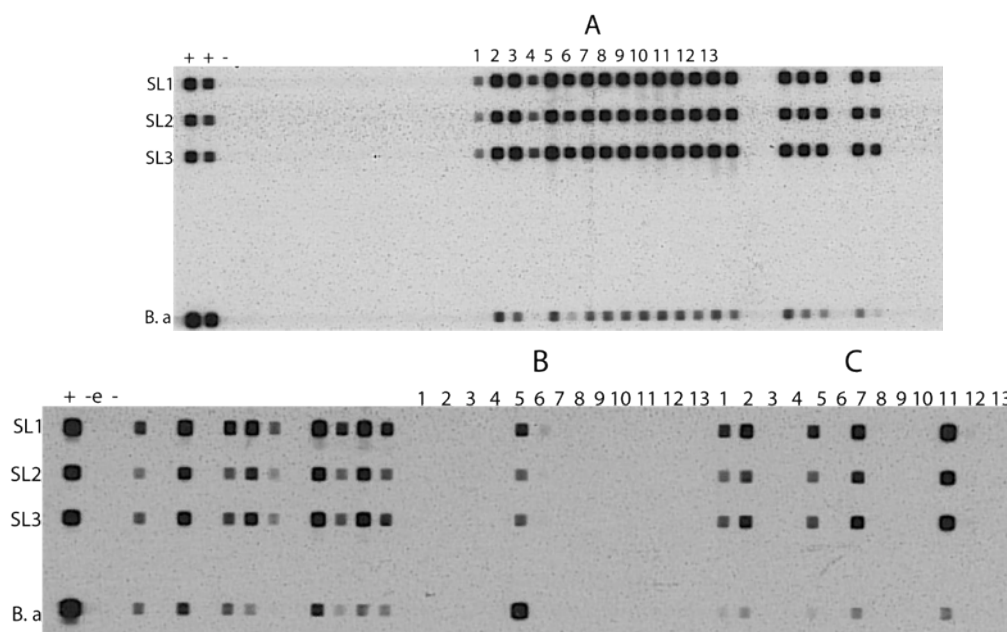


Fig. 31 : Hybridation des produits PCR lors d'une RLB sur des extraits d'ADN de tiques (n=39) de trois souris différentes (A, B et C).
 += Positif; -e= Négatif d'extraction; -= Négatif PCR; SL= Sonde *B. burgdorferi* sl; B. a= Sonde spécifique à *B. afzelii*.

Résultats

Il en est de même pour les échantillons C1 et C5, qui donnaient des signaux faibles en RLB, surtout en ce qui concerne la sonde spécifique à *B. afzelii*, et qui contenaient entre 5 et 31 spirochètes selon la qPCR, alors que l'échantillon C11, contenait 1.29×10^3 individus. Il est à noter qu'un signal était présent pour l'échantillon B6 en RLB, alors qu'aucun résultat n'a été obtenu par qPCR. Toutefois, près d'une année et demie s'était écoulée entre la RLB et la qPCR. A l'inverse, l'échantillon C12 qui démontrait un signal extrêmement faible en RLB, contenait tout de même 1.12×10^3 spirochètes.

Tableau 34 : Quantité de spirochètes présents dans des thermolysats de culture déterminée par qPCR.

A	Nombre de spirochètes	B	Nombre de spirochètes	C	Nombre de spirochètes
1	4.51E+02	1	0	1	5.01E+00
2	1.7E+06	2	0	2	2.25E+01
3	3.9E+05	3	0	3	0
4	9.87E+02	4	0	4	0
5	1.87E+06	5	7.67E-01	5	3.07E+01
6	1.78E+05	6	0	6	0
7	4.55E+05	7	0	7	1.54E+01
8	8.98E+04	8	0	8	0
9	9.05E+04	9	0	9	0
10	6.56E+05	10	0	10	0
11	1.26E+06	11	0	11	1.3E+03
12	1.14E+07	12	0	12	1.12E+03
13	1.56E+06	13	0	13	0

Il est à noter que les tiques de la souris A ont été placées en culture avant une extraction d'ADN, tandis que l'ADN des tiques des souris B et C a été extrait directement depuis les tiques.

3.7 Transformation de *B. afzelii*

Dans ce chapitre, des isolats de *B. afzelii* ont été transformés dans le but de les observer *in vivo* dans les tiques. La transformation a été effectuée par électroporation, technique la plus efficace pour l'insertion d'ADN étranger chez *B. burgdorferi* si (Samuels, 1995).

3.7.1 Production et purification de pTM61

La première tentative d'insertion de pTM61 dans *E. coli* DH5 α a été infructueuse, pas parce que la transformation n'a pas fonctionné, mais une erreur dans la concentration en gentamicine du milieu solide a sûrement inhibé la croissance des bactéries. Sans informations détaillées sur le protocole, la concentration en gentamicine était basée sur les informations fournies pour *B. afzelii*, soit 100 μ g/ml, ce qui constitue une concentration beaucoup trop importante. La deuxième tentative, en utilisant 25 μ g/ml s'est révélée être un succès. Une dizaine de colonies par boîte de Petri a ainsi été obtenue. Les colonies étaient toutefois très petites et poussaient lentement. Cette faible croissance était sans doute causée par une concentration encore très élevée en gentamicine, la concentration utilisée par le groupe du prof. Chaconas étant de 10 μ g/ml seulement (Tara Moriarty, communication personnelle). Néanmoins, les colonies ont supporté cette forte concentration, première preuve du succès de l'insertion du plasmide. La deuxième vérification de l'insertion de pTM61, par PCR sur la cassette de résistance *aaaC1*, démontre que le plasmide est bien présent chez toutes les colonies sélectionnées (fig. 32).

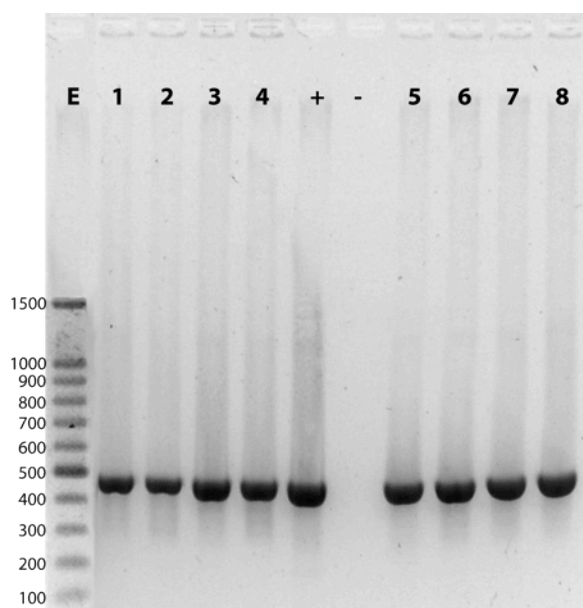


Fig. 32 : Gel d'agarose 1% sur 8 colonies de DH5 α transformées.

E= Echelle, += plasmide seul; -= négatif PCR

Résultats

Finalement, pour vérifier la structure du plasmide, une digestion enzymatique avec Hind III a été réalisée. Selon la structure de pTM61, cette enzyme coupe l'ADN à deux endroits (fig. 33). Une première fois dans l'insert, puis à la fin de la séquence codant pour la GFP. Il en résulte un fragment d'environ 1200pb. et un autre de 5900pb., qui ont bien été visualisés sur gel d'agarose (fig. 34).

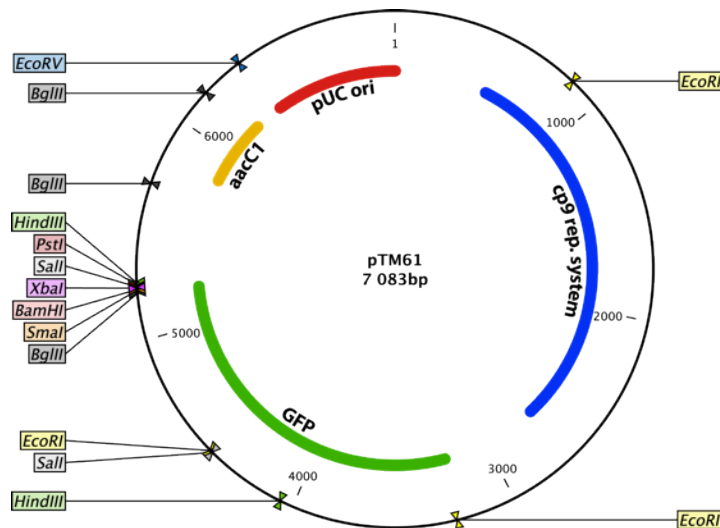


Fig. 33 : Représentation schématique de pTM61. Constituants majeurs et principaux sites de restrictions (N. Tonetti).

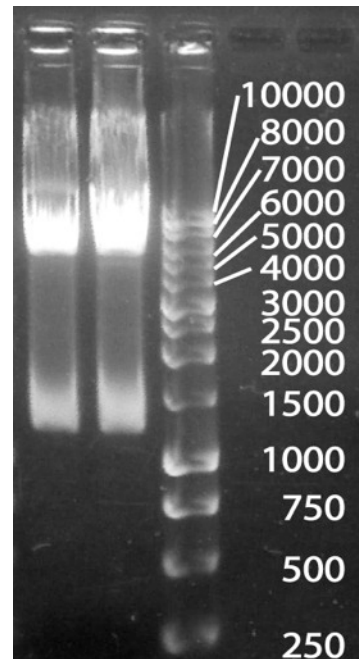


Fig. 34 : Digestion enzymatique de pTM61 grâce à Hind III. Migration sur gel d'agarose 0.8% (N. Tonetti).

La production et la purification de pTM61 à partir de ces colonies ont donné de très bons résultats, les quantités de plasmides récupérées après purification (1ml par colonne) atteignant et dépassant le maximum de 350µg de plasmide par colonne annoncé par le fabricant du kit (fig. 35). Les meilleurs rendements ont été observés lorsque les cultures de DH5α en phases de croissance exponentielles atteignaient des absorbances à 600nm proches de 2.5.

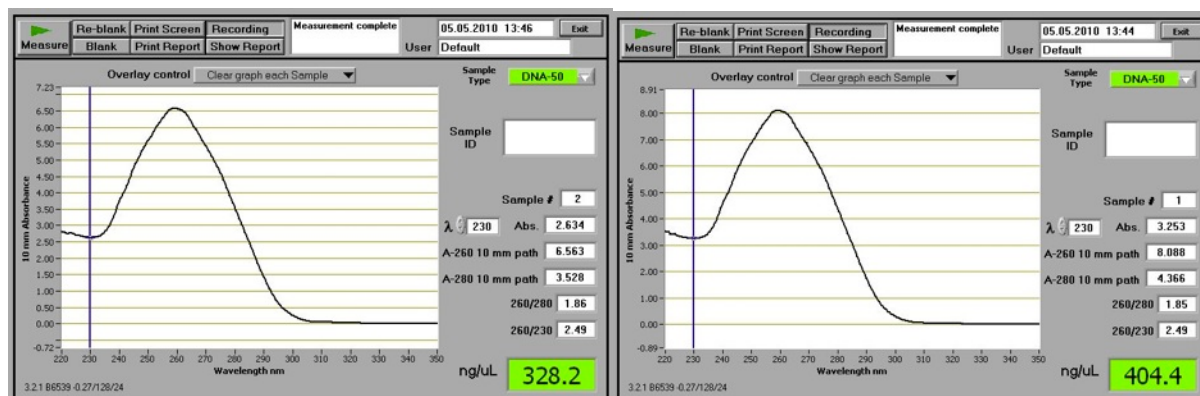


Fig. 35 : Quantification d'ADN au nanodrop après purification du plasmide.

3.7.2 Electroporation

Les souches NE4049 et NE4532 (NE4049T et NE4532T une fois transformées) ont été transformées avec succès, mais après plusieurs tentatives seulement. Les essais avec les autres souches (NE4046, NE4051, NE4053 et VS461) n'ont, par contre, donné aucun résultat. La première vérification de l'insertion du plasmide dans *B. afzelii* a été faite par culture sélective, contenant 100µg/ml de gentamicine, puis par observation de la fluorescence au microscope confocal (fig. 36).

Ces observations ont permis le réglage du microscope pour les observations ultérieures dans les tiques. Les meilleures images ont été obtenues en réglant l'intensité

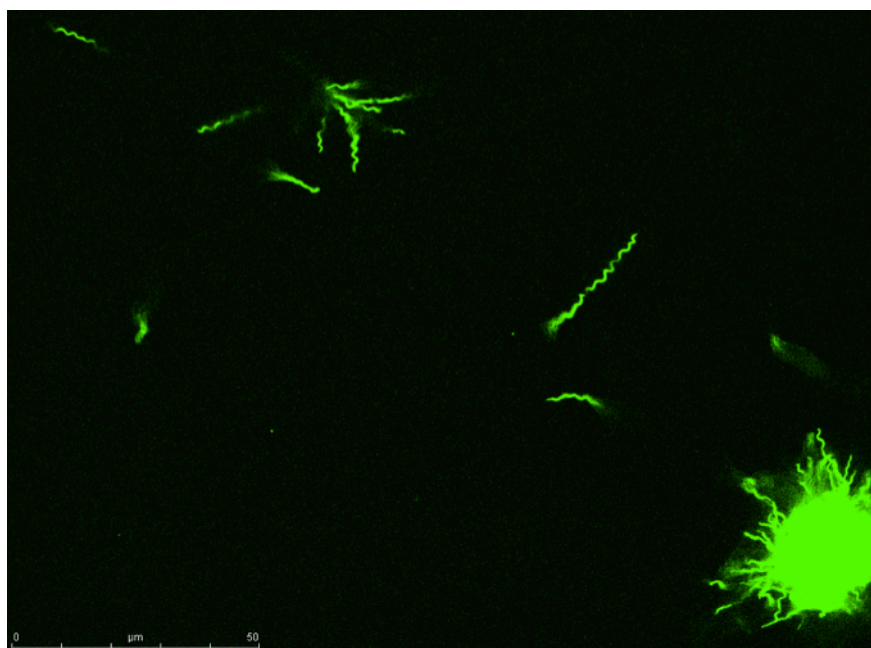


Fig. 36 : Observation de la souche NE4049T en culture au microscope confocal. Objectif 60x immersion à eau, laser Argon à 20%, raies laser de 458nm à 20%, 476nm à 70%, 488nm à 15% (N. Tonetti).

du laser à l'argon à 20%. La puissance des raies laser à 458nm, 476nm et 488nm a été augmentée de 20%, 70% et 15%, respectivement. La largeur de la bande passante pour l'observation allait de 494 à 594nm. Finalement, le gain et l'offset des détecteurs étaient adaptés continuellement pour amplifier la perception de la fluorescence et limiter le bruit de fond.

3.7.3 Observations *in vivo* de spirochètes dans *I. ricinus*

Les souches ainsi transformées ont été insérées dans des femelles et des nymphes *I. ricinus* avec la technique des capillaires pour les premières observations (chapitre 2.2.2). Le laser du microscope confocal ne traversant la cuticule ni des femelles, ni des nymphes, les observations *in vivo* ont été effectuées après dissection des tiques (chapitre 2.6.1.4). Une fois le scutum entièrement enlevé, les tiques ont été baignées dans du milieu 199 avec des sels de Hank. Ce milieu a permis de maintenir les tiques en vie et sans dégradations apparentes de tissus pendant les observations, soit au moins pendant quatre heures. Les premiers essais de visualisation *in vivo* ont été effectués avec des femelles *I. ricinus* infectées de manière artificielle. Elles se sont avérées inappropriées pour de telles observations, les organes internes présentant une forte auto fluorescence aux longueurs d'ondes utilisées pour la GFP, surtout les trachées (fig. 37).

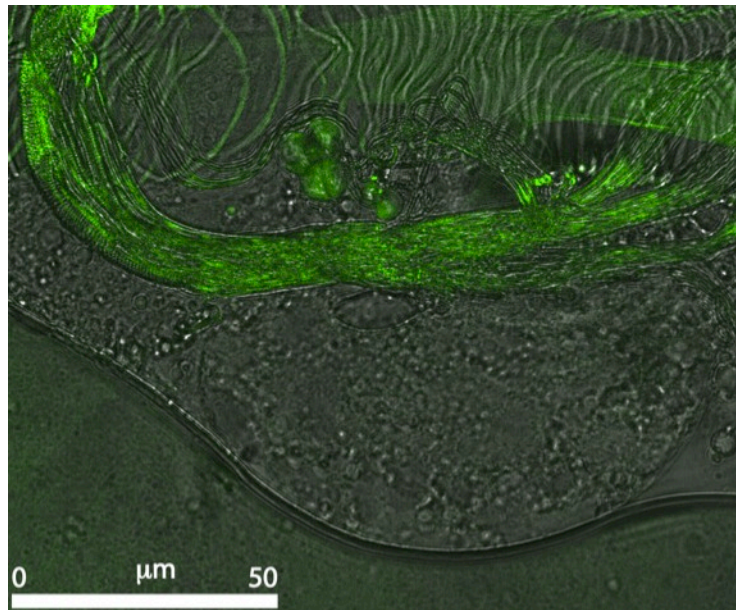


Fig. 37 : Trachées d'une femelle *I. ricinus* au microscope confocal. Objectif 100X (N. Tonetti).

Par contre, ce problème n'a pas été rencontré avec les nymphes, ce qui a permis d'observer des spirochètes sans visualiser de fluorescence "parasite". Des spirochètes ont donc été observés dans les intestins des nymphes (fig. 39) ainsi que dans l'hémocoèle (fig. 38), 24 heures après leur infection par la technique des capillaires. Les spirochètes observés dans les intestins étaient généralement mobiles (fig. 40) et ne semblaient pas attachés aux épithéliums, comme le montre les figures 39 et 40. Par contre, aucun spirochète n'a été observé dans les glandes salivaires.

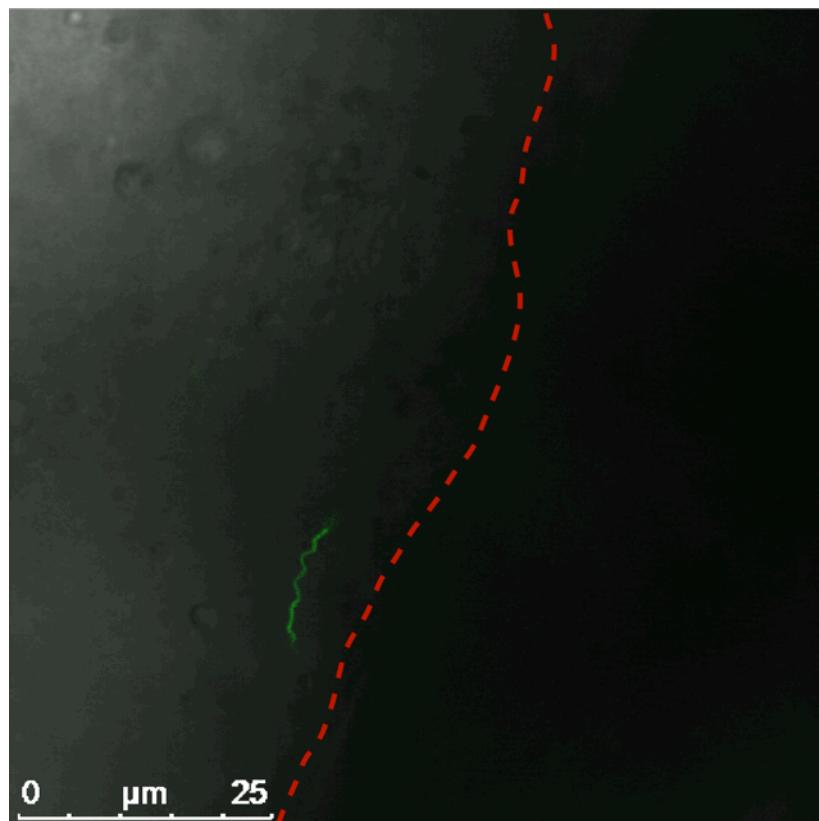


Fig. 38 : Spirochète dans l'hémocoèle d'une nymphe infectée via la nutrition par capillaire par NE4049T. En pointillés, la délimitation de l'intestin (N. Tonetti).

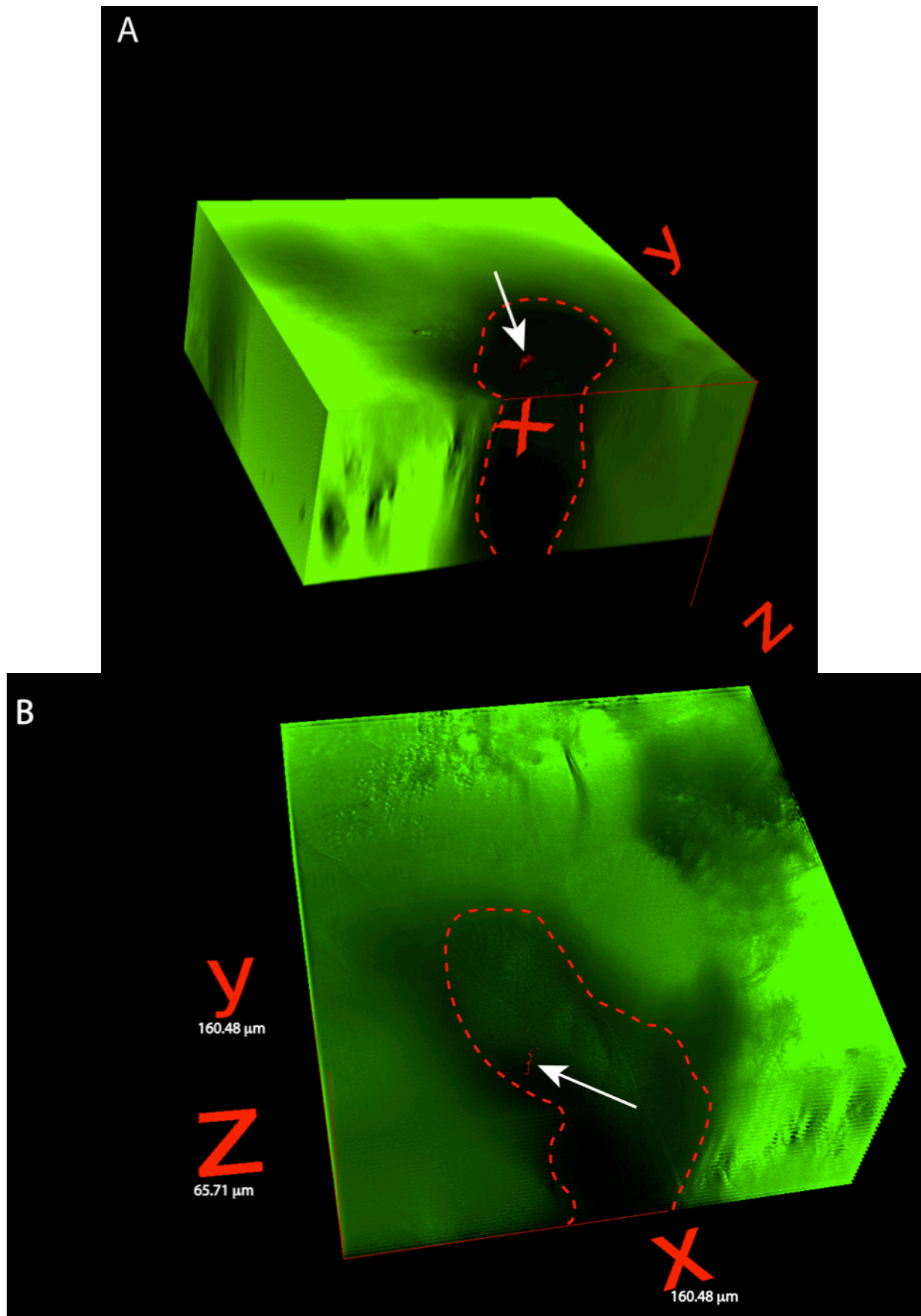


Fig. 39 : Modélisation 3D d'un diverticule intestinal d'une nymphe *I. ricinus*. La délimitation du diverticule est indiquée en pointillé. La longueur de chaque axe est indiquée en µm. **A)** coupe coronale de 65.71 µm, vue ventrale. **B)** même coupe, vue dorsale (N. Tonetti).

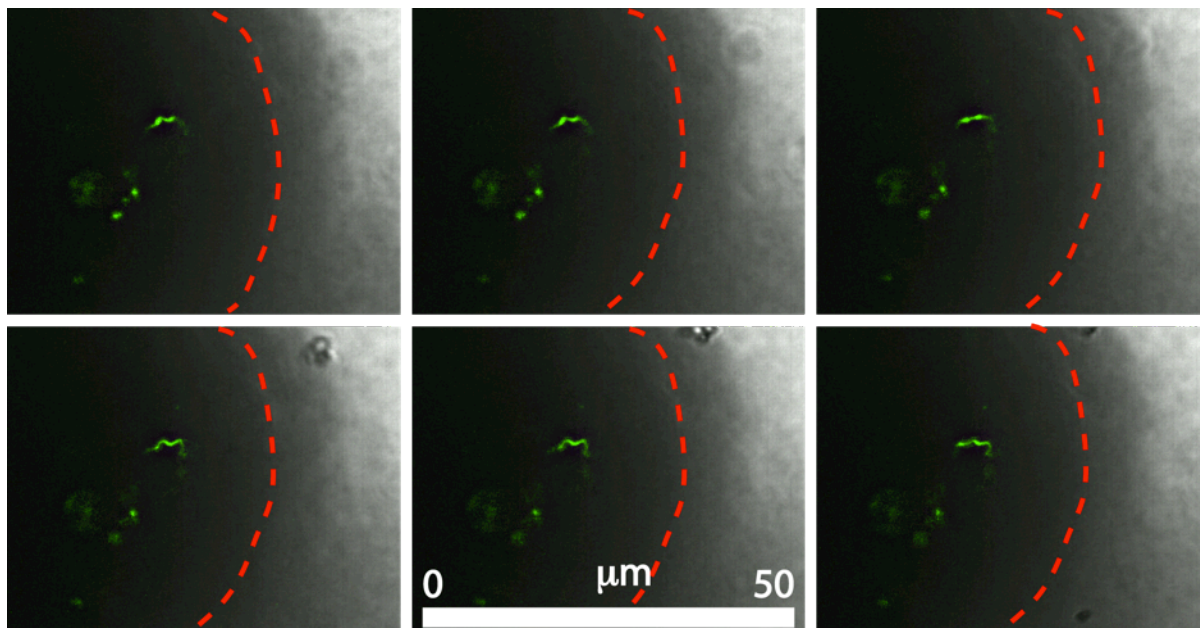


Fig. 40 : Spirochète dans la partie distale d'un diverticule intestinal d'une nymphe infectée via la nutrition par capillaire par NE4049T.
De gauche à droite et de haut en bas, suite d'images du même plan montrant la motilité d'un spirochète. En pointillé, la délimitation de l'intestin (N. Tonetti).

Voyant que l'observation de spirochètes dans des nymphes infectées artificiellement était réalisable, la même procédure a été effectuée avec des nymphes naturellement infectées par les isolats NE4049T et NE4532T. Des souris ont été infectées, à nouveau soit après une infestation avec des nymphes infectées avec NE4049T et NE4051T par la technique des capillaires, soit par injection sous-cutanée de milieu de culture avec ces deux isolats transformés. Des larves ont ensuite été placées 30 jours après l'injection sous-cutanée ou après l'infestation, pour obtenir des lots de nymphes infectées (tableau 35).

Après plusieurs tentatives, des nymphes infectées ont été obtenues pour la souche transformée NE4049T. La souche NE4532T semble quant à elle avoir perdu son pouvoir infectieux après transformation, puisqu'aucune transmission n'a été détectée après infection expérimentale, alors que l'isolat non transformé était infectieux (tableau 11).

Résultats

Tableau 35 : Taux d'infection des souris et des tiques par les souches transformées

Isolat	Groupe <i>ospC</i>	Infection des souris	Taux d'infection (%)			Biopsies	
			Souris ^Δ	Larves		1	2
				j.0	j.30		
NE4049T	YU	Capillaires	2/4	0/52	20/26 (76.9)	-/-/-	-/-/-
		Injection	2/2	0/26	5/26 (19.2)	-/-	-/-
NE4532T	Ni	Capillaires	0/2	0/26	0/26	-/-	-/-
		Injection	0/2	0/26	0/26	-/-	-/-

^ΔObtenu par biopsie et/ou xénodiagnose.

Quatre nymphes provenant d'un lot de tiques infectées à 92.3% (11/13) par l'isolat NE4049T ont ensuite été examinées avec un microscope confocal, mais aucun spirochète n'a pu être observé dans ces nymphes.

4 Discussion

Dans ce chapitre, premièrement nous nous appliquerons à faire une discussion synthétique des méthodes utilisées et des résultats obtenus pour la détermination des groupes *ospC* (chapitre 4.1, 4.2 et 4.3). Puis, les expériences sur le temps de latence avant transmission de spirochètes entre l'hôte et le vecteur et sur le déclenchement de l'infectiosité seront discutées (chapitre 4.4 et 4.5). Finalement, la dynamique de transmission de *B. afzelii* dans son ensemble sera discutée au regard de ces synthèses (chapitre 4.6).

4.1 Détermination du groupe *ospC* des isolats utilisés

La SSCP adaptée par Lagal *et al.* (2003) et par Pérez *et al.* (2011) est une méthode élégante et rapide de détermination de l'appartenance d'un isolat de *B. afzelii* à un groupe *ospC*. Basée sur la conformation adoptée par l'ADN simple brin, sa sensibilité permet de discriminer théoriquement des changements de l'ordre de la paire de base. Dans le cas présent, les séquences génétiques amplifiées mesuraient environ 270 bases, ce qui demande une résolution d'environ 5 bases afin de rentrer dans les critères du postulat de Wang et collaborateurs (1999), qui veut que les variations génétiques au sein d'un même groupe ne dépassent pas 2%. La lecture des gels est toutefois fastidieuse. Les bandes caractéristiques ne sont pas toutes toujours présentes et leurs intensités sont variables. Certaines séquences démontrent aussi plusieurs conformations, laissant apparaître ensuite de nombreuses bandes, ce qui est le cas du groupe *ospC* ME (fig. 16). Dans cette étude, l'intérêt de la SSCP s'amenuise face au séquençage, qui a l'avantage de permettre une comparaison avec les séquences existantes ainsi que d'amplifier une plus grande partie du gène. En effet, la PCR mise au point pour la SSCP n'amplifie que 270 bases (Pérez *et al.*, 2011), contre environ 540 bases pour la PCR utilisée pour le séquençage, sur les 630 bases environ que contient le gène *ospC*. Toutefois, seul le couplage des deux méthodes a permis de caractériser tous les isolats utilisés dans cette recherche, puisque l'isolat NE4046 n'a pu être affilié au groupe A5 que par SSCP, aucune des deux PCR utilisées pour le séquençage n'ayant permis une amplification. Il est possible que cet isolat ait subi un transfert génétique du gène *ospC* ou de l'entier du plasmide cp27 depuis une autre espèce de borrelies, comme nous l'avons discuté au chapitre 1.3.2.1, rendant ainsi l'amplification impossible,

Discussion

puisque les amorces ont été dessinées pour l'espèce *B. afzelii* (Earnhart *et al.*, 2005; Schulte-Spechtel *et al.*, 2006). Toutefois, si un tel transfert était apparu, la SSCP aurait dû démontrer un profil différent du profil de référence pour le groupe *ospC* A5, puisque cette technique est capable de discriminer des différences de l'ordre du nucléotide. Une mutation dans la région d'hybridation d'une des deux amorces utilisées pour amplifier le gène est aussi envisageable. Il est possible qu'un changement génétique ait eu lieu, rendant l'hybridation des amorces impossible. Puisque une région différente est amplifiée pour la SSCP, il est possible que la PCR utilisée pour cette SSCP fonctionne, mais que les PCR utilisées pour amplifier la quasi totalité du gène échouent. Tous les autres isolats utilisés correspondent bien à leurs groupes respectifs, que la correspondance ait été déterminée par séquençage ou par SSCP.

L'entier du gène *ospC* n'a donc pas été amplifié durant cette étude. Cependant, la totalité des régions variables est tout de même amplifiée par les amorces. De plus, en se basant sur le travail de Seemanapalli et collaborateurs (2010), où plusieurs clones présentant différentes délétions d'acides aminés de la protéine OspC de *B. burgdorferi* ss ont été créés et évalués quant à leurs pouvoirs infectieux, il apparaît que la région amplifiée ici contient bien les régions essentielles à l'expression de la protéine.

En comparant les séquences obtenues, on constate que les séquences partielles du gène *ospC* des deux isolats du groupe A1 sont identiques entre elles, tout comme celles des deux isolats du groupe YU (fig. 18). Pour le groupe A1, l'isolat NE4053 provient d'une larve de xénodiagnose sur un campagnol de la nature analysée après la mue, tandis que l'isolat NE5046 provient d'une nymphe libre (Pérez *et al.*, 2011). Les deux isolats du groupe YU (NE4049 et NE4051) ont eux été isolés depuis deux nymphes qui s'étaient nourries en tant que larves sur deux mulots sauvages différents (Pérez *et al.*, 2011)(tableau 10). Ces quatre isolats proviennent tous du Bois de l'Hôpital, qui est une zone endémique pour la maladie de Lyme dans le canton de Neuchâtel (Suisse).

Le séquençage des isolats a aussi permis la confirmation des nouveaux groupes *ospC* ME et YU, isolés, décrits et ainsi nommés par Pérez et collaborateurs (2011). Alors qu'un isolat du groupe ME avait déjà été décrit par Baranton et collaborateurs (2001) grâce à une séquence de Theisen *et al.* (1995)(GenBank accession number (gb) X84769), le groupe YU n'a jamais été décrit, la première séquence de ce groupe ayant été publiée en 2004 par Bunikis et collaborateurs (2004). Ce groupe YU a donc déjà été rencontré chez des isolats provenant de Suède (gb AY363720.1, homologie de 100%)(Bunikis *et*

al., 2004), mais aussi de France (gb FJ546553.1 et FJ546552.1, homologues de 100 et 99%) (Margos *et al.*, 2009) et de Tchèque (gb DQ186902.1, homologie de 99%) (Raska *et al.*, 2005). La séquence obtenue pour le groupe ME a aussi déjà été reportée en Suède ainsi qu'au Danemark (gb AY363711 et X84769) (Theisen *et al.*, 1995; Bunikis *et al.*, 2004). Bien que peu de données existent sur leurs répartitions, les distances séparant ces isolats laissent à penser qu'il s'agit bien de nouveaux groupes établis en Europe. Finalement, alors que toutes les séquences du groupe YU ne proviennent que d'isolements à partir de tiques, ce qui ne permet pas de déterminer sa pathogénicité chez l'Homme, la séquence du Danemark (isolat DK22, gb X84769), homologue au groupe ME, provient d'un érythème migrant. Le groupe ME est donc pathogène pour l'Homme et devrait pour l'instant être considéré comme étant un groupe non-invasif.

4.2 Détection de spirochètes chez la souris et chez les tiques

La détection d'une infection systémique chez la souris a été effectuée grâce à deux biopsies d'oreille, effectuées 30 jours après l'infection, puis 45 jours après l'infection lorsque la première biopsie était négative, ainsi que par xénodiagnose avec une centaine de larves placées sur les souris en même temps que la première biopsie était pratiquée. Ces biopsies étaient ensuite mises en culture et la présence de spirochètes évaluée de visu au microscope à fond noir.

La présence de spirochètes dans les tiques de xénodiagnose a été dans un premier temps détectée en extrayant l'ADN à l'hydroxyde d'ammonium bouillant directement de la tique (extraction directe), puis par PCR, suivie d'une RLB. La détection de *B. afzelii* chez *I. ricinus* est légèrement plus sensible en utilisant l'hydroxyde d'ammonium bouillant qu'un thermolysat de culture (Morán Cadenas *et al.*, 2007c). En effet, ces auteurs ont observé une meilleure détection de *B. afzelii* chez des tiques de la nature en extrayant l'ADN d'une moitié de ces tiques au NH₄OH (77.4%, 233/301) qu'après thermolysat de culture de l'autre moitié (67.1%, 202/301). En utilisant ici cette extraction au NH₄OH, les signaux obtenus lors de la RLB étaient parfois faibles et difficiles à interpréter pour certaines tiques infectées. Nous avons donc analysé certaines extractions par qPCR et il s'est avéré que les échantillons démontrant des signaux faibles en RLB ne contenaient que peu de spirochètes. A l'inverse, les tiques

Discussion

démontrant des signaux prononcés en RLB en contenant beaucoup. Il a été dès lors décidé de changer de méthode et d'extraire systématiquement l'ADN par thermolysat de culture, permettant ainsi d'augmenter le nombre de spirochètes potentiellement présents dans les tiques et ainsi de renforcer les signaux obtenus par RLB. Ce changement de méthode a aussi été appuyé par les résultats obtenus lors des expériences sur le temps nécessaire aux spirochètes pour passer de la souris à la tique. La détection de spirochètes dans les nymphes partiellement gorgées était significativement bien meilleure après la culture que lors d'une extraction directe au NH_4OH . Nous pensons que dans cette situation, les nymphes ne contenaient généralement que peu de spirochètes, puisque les repas sanguins étaient écourtés au plus tard après 48 heures, donc avant le début de la phase de gorgement rapide, entraînant par là une faible détection par extraction directe et donc accentuant les différences dans la détection de l'infection chez la tique.

Une autre méthodologie aurait ici peut-être été plus appropriée. Nous aurions pu conserver l'extraction d'ADN au NH_4OH , mais effectuer ensuite systématiquement une qPCR à la place de la PCR sur l'espace intergénique *5s-23s* suivie d'une RLB, afin d'évaluer la charge bactérienne des tiques. Par là, un net gain de temps aurait été possible en évitant les 10 jours de culture et la RLB, et aurait peut-être pu atténuer les difficultés d'interprétation des résultats obtenus par RLB, puisque cette qPCR est aussi sensible que la RLB (Herrmann et Gern, 2010), et que les résultats ne sont pas influencés par des facteurs externes, tels que le temps d'exposition des films aux membranes ou la fraîcheur des révélateurs utilisés. Opter pour cette méthodologie aurait surtout apporté des indications sur le nombre de spirochètes présents par tique, ce qui aurait permis d'observer des éventuels liens avec l'appartenance d'un isolat à un certain groupe *ospC* dans un tel système biologique. Évaluer le nombre de spirochètes présents dans les tiques au cours du repas sanguin aurait aussi été possible lors de l'évaluation du temps de latence avant transmission entre la souris et la tique.

Sur la totalité des souris ayant déclaré une infection systémique durant cette étude, quelque soit le mode d'infection utilisé ($n=76$), 96.1% (73/76) des infections observées ont été détectées par xénodiagnose, contre 75% (57/76) grâce aux biopsies ($P=0.0002$, one-tailed Fisher exact probability test). Une meilleure sensibilité de la détection de l'infection chez la souris par xénodiagnose a aussi été observée pour les

souris infectées par voie naturelle, la méthode ayant permis de détecter 97.4% (37/38) des infections observées contre 78.9% (30/38) par biopsie. Toutefois, les cultures de biopsies étaient ensuite contrôlées de visu, tandis qu'une méthode plus sensible (PCR et RLB) était utilisée sur les cultures de tiques, pouvant ainsi influencer ces résultats. Des différences semblables ont déjà été observées par Hu *et al.* (2003), qui ont décrit 91.9% (102/111) d'infection chez les souris par xénodiagnose, contre 69.4% (77/111) par biopsie d'oreille. Ces résultats ont été obtenus par contre en observant les cultures de tiques ainsi que de tissus d'oreille sous un microscope à fond noir. La détection d'une infection systémique chez la souris est donc effectivement plus sensible par xénodiagnose que par biopsie d'oreille. Cette différence n'a par contre pas été retrouvée chez les souris infectées par injection sous-cutanée, qui ont transmis des spirochètes aux tiques dans 89.5% (17/19) des cas et chez qui 73.7% (14/19) des biopsies étaient positives. Une étude portant sur *P. leucopus*, un réservoir sauvage de *B. burgdorferi* aux Etats-Unis, a montré que la détection de *B. burgdorferi* ss depuis le centre de l'oreille était significativement meilleure que depuis sa périphérie par PCR, tandis qu'aucune différence n'était observée lorsque les biopsies étaient placées en culture (Hofmeister et Childs, 1995). Bien que faites avec *B. burgdorferi* ss, ces observations nous laissent penser qu'un nombre plus faible de spirochètes se trouvent généralement en périphérie de l'oreille; nombre suffisamment faible parfois pour se situer en dessous du seuil de détection par PCR. Ainsi, cela pourrait expliquer les différences observées entre le taux de détection lorsque les biopsies étaient prélevées en périphérie et au centre de l'oreille de rongeurs sauvages. Passer par la culture aurait permis à ces auteurs d'amplifier le nombre de spirochètes présents dans les biopsies et ainsi atténuer les différences observées par PCR. Une autre étude vient appuyer cette supposition. Sinsky et Piesman (1989) n'ont observé des résultats de biopsies négatifs que lorsque des prélèvements provenaient de la périphérie des oreilles d'un hamster infecté par *B. burgdorferi* ss, et plus les biopsies étaient prélevées en direction de la base de l'oreille, plus la densité de spirochètes en culture augmentait, laissant penser qu'effectivement un faible nombre de spirochètes est présent en périphérie d'oreille (Sinsky et Piesman, 1989).

Dans notre cas, il est donc possible que la charge bactérienne des souris infectées par injection sous-cutanée soit généralement plus importante que lors des infections naturelles, puisqu'un nombre bien plus important de spirochètes sont injectés à la souris, comparé au nombre de spirochètes injectés par les tiques. Dès lors, il est possible

que les biopsies des souris infectées par injection sous-cutanée contenaient plus de spirochètes que les souris naturellement infectées, facilitant ainsi la détection en culture.

4.3 Mode d'infection des souris

Les souris ont été infectées selon trois méthodes différentes : L'infection par injection sous-cutanée de milieu de culture, par infestation avec environ 10-15 nymphes infectées par capillaires et par infestation par trois nymphes infectées lors d'un repas sanguin infectieux. Plusieurs différences émergent de ces différentes techniques, dont le nombre de spirochètes injectés en fonction du mode d'infection, la présence ou non de salive de tique et la localisation des spirochètes dans les tiques entre les nymphes infectées par capillaire et suite à un repas sanguin infectieux.

Concernant le nombre de spirochètes arrivant chez la souris, l'infection sous-cutanée est sans aucun doute la méthode ayant exposé les souris au plus grand nombre de spirochètes, puisqu'environ 200µl de culture contenant environ 10^7 spirochètes par millilitre étaient injectés, soit près de 2×10^6 spirochètes par souris. Bien que de 10 à 100 spirochètes par injection soient suffisants pour infecter des souris avec *B. burgdorferi* ss, des nombres aussi faibles ne permettent pas d'infecter toutes les souris, comparé à des doses allant jusqu'à 10^4 spirochètes (Masuzawa *et al.*, 1992; Barthold, 1999). Ainsi, seuls 10 spirochètes semblent nécessaires pour infecter des souris avec *B. burgdorferi* ss de manière intradermique, contre 3×10^3 (dose médiane) pour une injection intra péritonéale (Piesman *et al.*, 1990; Barthold, 1991). Entre 10^2 et 10^4 lors d'injections intradermiques et entre 10^4 et 10^5 spirochètes pour une injection intra péritonéale sont nécessaires pour infecter des rats (Moody et Barthold, 1991). Par contre, l'injection d'un nombre élevé de spirochètes ($\geq 10^4$) semble être défavorable aux spirochètes au début de l'infection (Kern *et al.*, 2011) et lorsque ce nombre atteint ou dépasse l'ordre du million, la réponse immunitaire de la souris est modifiée (Roehrig *et al.*, 1992; Gern *et al.*, 1993; Barthold *et al.*, 1995; Barthold, 1999). Ainsi, les souris ayant reçu des doses de $\geq 10^6$ spirochètes produisent des anticorps anti-OspA, tandis que cette réponse immunitaire est absente des souris infectées par des doses de $\leq 10^4$ spirochètes chez *B. burgdorferi* ss et correspond à la réponse immunitaire observée lors d'une infection par des tiques infectées (Gern *et al.*, 1993; Barthold *et al.*, 1995). Le nombre de spirochètes

injectés aux souris lors de cette étude était donc élevé et ne représentait pas une situation naturelle. Cependant, la volonté d'obtenir des souris infectées, et surtout infectieuses pour les tiques pour la suite de l'étude, nous ont amené à faire ce choix.

Il est par contre délicat d'estimer la quantité de spirochètes injectés par les tiques, mais dans le cas de la nutrition par capillaires, les nymphes étaient nourries avec du milieu de culture contenant lui aussi environ 10^7 spirochètes par millilitre. Toutefois, nous pouvons estimer qu'une nymphe nourrie par capillaire jusqu'à l'apparition d'une goutte fécale n'a pas dû ingurgiter plus d'un à deux microlitres de fluide. D'ailleurs, une étude de Broadwater *et al.* (2002) a mesuré que le volume ingéré par des nymphes *I. scapularis* après 2.5 heures de gorgement sur des capillaires était de $0.03\mu\text{l}$ par tique (Broadwater *et al.*, 2002), tandis que la quantité de culture ingurgitée par des nymphes *I. ricinus* était estimée à environ $1.5\mu\text{l}$ par tique selon Gern *et al.* (1993). Dès lors, nous pouvons conclure qu'une quantité de spirochètes nettement moindre était injectée par ces nymphes aux souris comparé aux injections sous-cutanées, d'autant que tous les spirochètes ingérés ne sont pas injectés ensuite aux souris (Ohnishi *et al.*, 2001; Fingerle *et al.*, 2002). Pour les nymphes naturellement infectées, la situation est encore moins claire, mais à nouveau, le nombre de spirochètes injectés par trois nymphes était sans doute plus faible que lors des injections, sachant que la charge parasitaire de nymphes de la nature infectées par *B. afzelii* a été estimée en moyenne à 6880 spirochètes par nymphe par Hermann et Gern (2010) et que à nouveau tous les spirochètes ne sont pas injectés à l'hôte (Ohnishi *et al.*, 2001; Fingerle *et al.*, 2002). Lors de la qPCR effectuée sur 39 nymphes infectées, le nombre de spirochètes présents variait de 1 à 1.3×10^3 individus par tique après extraction d'ADN directement depuis les tiques des souris B et C. Le nombre de spirochètes après thermolysat d'un millilitre de culture a par contre atteint 1.14×10^7 (souris A), correspondant au nombre de spirochètes évalué par comptage après 10 jours de culture environ.

Par contre, les spirochètes injectés de manière sous-cutanée ne profitent pas des effets de la salive de tique, qui possède, entre autre, des propriétés vasodilatatrices, anticoagulantes et surtout immunomodulatrices. Ainsi, la salive d'*Ixodes* sp. a une activité anti chimiokines amenant à une modulation/polarisation de la réponse immunitaire chez la souris (Brossard et Wikel, 1997; Hajnicka *et al.*, 2001; Skalova *et al.*, 2008). Elle est aussi capable d'inhiber les lymphocytes B *in vitro* (Hannier *et al.*,

2004) ainsi que de diminuer la réponse inflammatoire engendrée par la piqûre de la tique (Marchal *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2011; Marchal *et al.*, 2011) et d'inhiber l'action du système complément (Hovius *et al.*, 2008; Schuijt *et al.*, 2008). Cette salive amène donc à un effet positif sur l'établissement et le développement de *B. burgdorferi* si chez la souris (Zeidner *et al.*, 2002; Horka *et al.*, 2009).

Finalement, des différences dans l'infection des tiques sont aussi retrouvées entre les tiques infectées par capillaires ou lors d'un repas sanguin infectieux. Lors de la nutrition par capillaire, les spirochètes ingérés se disséminent rapidement dans le corps de la tique (Fingerle *et al.*, 2002). Ainsi, Fingerle *et al.* (2002) ont observé des spirochètes dans les glandes salivaires de toutes les tiques (n=16) nourries par capillaires avec *B. afzelii*, et ce dès la première heure suivant la nutrition, alors que dans la nature, les nymphes à jeun ne sont majoritairement infectées qu'au niveau de l'intestin (Lebet et Gern, 1994; Leuba-Garcia *et al.*, 1994).

4.4 Temps de latence avant transmission entre l'hôte et le vecteur et entre le vecteur et l'hôte

La circulation des spirochètes entre l'hôte et le vecteur est un phénomène complexe impliquant de nombreux facteurs dépendant autant de la bactérie que de l'hôte ou du vecteur. Les spirochètes doivent présenter des phénotypes particuliers afin de se disséminer, qui sont intimement liés aux milieux dans lesquels évoluent le pathogène, tels que l'intestin de la tique à jeun ou en gorgement, l'hémolymphe, les glandes salivaires ou les tissus de l'hôte (Ohnishi *et al.*, 2001; Fingerle *et al.*, 2002). Ils influencent donc la circulation du pathogène entre l'hôte et le vecteur. Sachant que la variabilité du gène *ospC* induit différents phénotypes (Theisen *et al.*, 1993) et que l'appartenance des isolats à des groupes *ospC* était définie, deux types d'expérience ont dès lors visé à savoir si cette appartenance pouvait influencer la dissémination de *B. afzelii* chez son hôte et son vecteur et ainsi agir sur le temps de repas sanguin nécessaire pour qu'il puisse y avoir transmission de la tique à l'hôte, et de l'hôte à la tique.

Nous avons observé une transmission de la tique à l'hôte dès 24 heures de repas sanguin pour le groupe YU. Il y a donc eu transmission de spirochètes entre 12 et 24 heures de repas sanguin, ce qui est en accord avec les observations effectuées par Kahl

et collaborateurs (1998) et Crippa et collaborateurs (2002). Dans ces études, des souris présentaient une infection systémique après avoir été infestées pendant respectivement 17 heures et 24 heures. Dans l'expérience de Crippa et collaborateurs (2002), aucune souris n'a été infestée pour une durée inférieure à 24 heures. Il est donc tout à fait possible que les spirochètes transmis l'aient été avant ces 24 heures. Nos résultats montrent que plus de 12 heures ont toutefois été nécessaires pour qu'il puisse y avoir infection. Cependant, seul le groupe YU a démontré une capacité d'infection avant le terme de l'expérience, qui était de 32 heures de repas sanguin. Un repas sanguin de plus longue durée est probablement nécessaire pour les tiques infectées par les autres isolats.

Rappelons que le but de cette expérience était d'évaluer le temps minimum de repas sanguin nécessaire de la transmission plutôt que le comportement des spirochètes par la suite. En effet, observer une transmission précoce est d'intérêt pour la prévention de la maladie chez l'Homme. Malheureusement, aucun des autres isolats testés n'a été transmis aux souris, même après 32 heures de repas sanguin (tableau 28). Il est de ce fait délicat de conclure qu'ils ne sont pas infectieux avant cette période de 32 heures, puisqu'aucune transmission n'a été observée. Toutefois, tous ces isolats se sont révélés infectieux pour les souris et pour les tiques, que ce soit lors d'infections via des injections sous-cutanées et/ou lors d'infections par infestation avec des nymphes infectées ayant pris un repas sanguin complet (tableau 11, fig. 23 et fig. 24). De plus, l'analyse des nymphes après repas sanguin partiel a montré que chaque lot contenait des tiques infectées. Les souris étaient donc bien infestées par des nymphes infectées, laissant présumer que ces isolats (n=4; NE5046 (A1), NE36 (A2), E61 (A3), P/sto (A4)) ne sont pas transmis avant 32 heures de repas sanguin.

Cette expérience a été menée en premier lieu avec le groupe YU pour des durées de repas sanguin de 24 heures, 32 heures et 48 heures. Au vu des résultats obtenus, il a été décidé d'ajouter une analyse déjà à 12 heures de repas. Malheureusement, des contraintes de laboratoire ne nous ont pas permis d'effectuer des expériences au delà de 32 heures de repas sanguin pour les isolats appartenant aux autres groupes *ospC*.

L'analyse de l'infection des nymphes à différents temps pendant le repas sanguin a aussi permis de mettre au jour deux situations distinctes. Soit les taux d'infection des tiques restent stables au cours du repas sanguin (A1, A2 et A3), soit ils varient (A4 et YU). Les variations observées ne sont pas aléatoires et suivent les mêmes tendances

Discussion

pour les groupes A4 et YU. Il y a une diminution du taux d'infection des nymphes dans les premières heures de repas sanguin (0-12 heures), qui est significative pour P/sto du groupe A4 et NE4049 du groupe YU, mais pas pour NE4051 (YU). Puis, une augmentation non significative entre 12 et 24 heures a été observée, suivie à nouveau d'une diminution entre 32 et 48 heures, significative à nouveau pour P/sto et NE4049 du groupe YU. De telles variations du nombre de nymphes infectées au cours du repas sanguin ont déjà été décrites chez des nymphes de la même espèce se nourrissant sur des lapins par Gern et collaborateurs (1996). En analysant les données d'une étude de Piesman et collaborateurs (1991) effectuée avec des femelles *I. scapularis*, le même phénomène apparaît. Dans cette étude, des femelles de la nature dont le taux d'infection était évalué à environ 50% ont été mises à nourrir sur des lapins pendant 24, 36, 48 heures, ainsi que jusqu'à réplétion. Après 24 heures de repas sanguin, seules 25.6% (11/43) des tiques étaient infectées, tandis que 54.6% (53/97) l'étaient après avoir passé 36 heures fixées sur l'hôte. Après 48 heures de repas sanguin, 46.7% (21/45) des femelles étaient infectées. Concernant *I. ricinus*, Gern *et al.* (1996) émettent l'hypothèse que dans certains cas, suffisamment de spirochètes seraient expulsés de l'intestin avec les selles dès le début du repas sanguin pour amener à une diminution des taux d'infection des tiques. Puis, alors que les spirochètes atteignent les glandes salivaires et commencent à être injectés à l'hôte, une transmission par co-feeding permettrait aux nymphes ayant perdu l'infection ainsi qu'aux nymphes saines de s'infecter. Il y aurait donc une perte de spirochètes liée à l'excrétion au début, si ce n'est tout au long du repas sanguin, qui serait contrebalancée lorsque la transmission par co-feeding apparaît. Cette hypothèse permet d'expliquer les variations observées jusqu'à 24 heures de repas sanguin. Puisque *I. ricinus* est capable d'infecter ses hôtes dès 17 heures de repas sanguin (Kahl *et al.*, 1998), un début de transmission par co-feeding est théoriquement possible avant 24 heures de gorgement. Seulement, cette possibilité n'explique pas vraiment la deuxième diminution observée entre 24 et 48 heures de repas sanguin pour NE4049 (YU). Il se pourrait que lors de la phase de gorgement lente dans le cas de NE4049, le co-feeding ne permette de contrebalancer la perte liée à l'excrétion qu'au début seulement. Supposons que les spirochètes ingurgités par une tique lors d'une nutrition en co-feeding restent dans l'intestin et ne migrent pas directement dans les glandes salivaires, comme cela est le cas lors d'un repas sanguin infectieux (Crippa, 2003) et sachant aussi qu'ils ne se multiplient fortement dans l'hôte généralement que

plusieurs jours après leur injection dans la peau (Horka *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2011), il est possible que la transmission par co-feeding s'épuise pendant la phase de gorgement lente, puisque seulement une petite fraction de la charge bactérienne parvient aux glandes salivaires (Ohnishi *et al.*, 2001; Kern *et al.*, 2011). L'observation que les risques d'infection des hôtes augmentent avec le temps de repas sanguin (Ohnishi *et al.*, 2001; Crippa, 2003) contredit toutefois ces hypothèses, puisque ce phénomène laisse supposer une augmentation ou une accumulation du nombre de spirochètes injectés à l'hôte. De même, l'apparition d'une infection systémique chez la tique (Zhu, 1998b) rend l'explication d'une diminution du nombre de nymphes infectées liée à l'excrétion délicate, puisque seuls les spirochètes présents dans l'intestin peuvent être expulsés avec les selles. Cependant, l'augmentation des risques d'infection au cours du repas sanguin ne se traduit pas forcément seulement par une augmentation du nombre de spirochètes injectés à l'hôte, mais pourrait aussi être liée à l'augmentation de la salivation et donc à une augmentation de facteurs facilitant l'infection par les spirochètes, ce qui favoriserait ainsi l'établissement d'une infection systémique chez la souris (Zeidner *et al.*, 2002). De même, le passage de la phase de gorgement lente à la phase rapide pourrait aussi influencer le nombre de spirochètes injectés à l'hôte, puisqu'une augmentation de la salivation est observée, et ainsi expliquer l'augmentation des risques d'infection. Lors de l'apparition d'une infection systémique chez la tique, non seulement les spirochètes présents dans la lumière intestinale pourraient toujours être expulsés avec les selles, mais les spirochètes s'en étant échappés sont ensuite en partie injectés à l'hôte. Il est donc tout de même envisageable que lors de la phase de gorgement lente, il y ait une diminution du nombre de nymphes infectées liée à l'excrétion au tout début du repas sanguin, puis que les nymphes saines et les nymphes ayant perdu leur infection s'infectent par co-feeding, amenant à une augmentation du nombre de nymphes infectées. Ensuite, il est possible que la transmission par co-feeding ne permette plus de contrebalancer la perte de spirochètes via les selles et la salive.

Les tiques utilisées pour infecter les souris avec P/sto ainsi qu'avec NE4049 pour une durée de 12 heures étaient par contre relativement âgées, puisque les larves avaient mué en nymphes 10 et 12 mois auparavant, respectivement. La période passée entre la mue et l'infestation pourrait donc expliquer la baisse systématique du nombre de nymphes infectées par P/sto observée. Il est aussi envisageable que le groupe A4 n'infecte les tiques qu'avec un faible nombre de spirochètes par individu au début du

Discussion

repas sanguin, favorisant ainsi une perte d'infection. Toutefois, nous avons vu que les nymphes semblent conserver leur infection, en tout cas jusqu'à neuf mois pour NE4049 et jusqu'à une année pour NE4051.

Lorsque nous avons étudié le temps de repas sanguin nécessaire pour que les tiques s'infectent lors d'un repas sanguin infectieux, nous avons constaté que seulement six à 12 heures de gorgement étaient nécessaires pour que les nymphes s'infectent. Cette observation est en accord avec les observations faites par Piesman (1991) chez *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss. Dans son étude, une larve sur 72 (1.4%) fixées sur des hamsters s'était infectée après seulement huit heures de repas sanguin (Piesman, 1991). Puis, les taux d'infection des larves augmentaient avec le temps d'attachement, pour atteindre 67.75% (16/24) d'infection après 48 heures de repas sanguin et 87.5% (14/16) après 72 heures. Dans notre première expérience toutefois, les taux d'infection des nymphes n'ont pas augmenté significativement par la suite, et ce jusqu'à 48 heures de repas sanguin. Sachant que le sang peut interférer avec la polymérase de la PCR (de Franchis *et al.*, 1988; Akane *et al.*, 1994; AL-Soud et Rådström, 2001), qu'une telle inhibition a été décrite chez des nymphes *I. scapularis* gorgées et infectées par *B. burgdorferi* ss (Schwartz *et al.*, 1997) et que de plus en plus de sang est accumulé par la tique au cours du repas sanguin, nous avons voulu savoir si un tel phénomène interférait avec nos résultats. Ainsi, la même expérience a été reconduite pour 24, 32 et 48 heures de repas, mais suivie d'une extraction d'ADN par thermolysat de culture au lieu d'une extraction au NH₄OH, permettant ainsi de diluer le sang présent dans la tique, mais aussi d'amplifier le nombre de borrelies potentiellement présentes. Les taux d'infection ainsi obtenus ont été bien plus élevés lors de cette deuxième expérience, atteignant 70% (21/30) pour l'isolat NE4049 et 93.3% (28/30) pour NE4051, contre un maximum observé de 6.7% (2/30) pour NE4049 et de 20% (6/30) pour NE4051 après l'extraction au NH₄OH. Le taux d'infection obtenu ici pour l'isolat NE4049 correspond à l'infectivité des souris pour les larves (85.5%, 100/117) obtenu lors des infections naturelles avec le même isolat et le dépasse pour l'isolat NE4051, qui a été capable d'infecter 70.4% (81/115) des tiques lors des infections naturelles. Il est à noter toutefois que cette expérience a été menée sur les mêmes souris, à un mois d'intervalle pour les deux méthodes d'extraction. Comme nos résultats (chapitre 3.2.2) et ceux de Gern *et al.* (1994) ont montré qu'une infestation répétée peut stimuler l'infectivité de l'hôte, une

partie de cette augmentation de la transmission de la souris à la tique observée pour NE4051 peut être expliquée par cette répétition d'infestation.

L'inhibition de la PCR par le sang ingéré est toutefois remise en question par l'étude de Huegli *et al.* (2011). Ces auteurs ont analysé des nymphes retirées de patients à différents moments du repas sanguin et aucune différence dans les prévalences d'infection des tiques n'a été observée en fonction de la durée du repas sanguin, donc de la quantité de sang présente, laissant supposer que le sang n'inhibe pas la PCR après une extraction à l'hydroxyde d'ammonium bouillant (Huegli *et al.*, 2011). Dès lors, la différence de détection que nous avons observée pourrait aussi être liée au seuil de détection de la PCR, soit à sa sensibilité. Alors que le nombre de spirochètes est généralement amplifié lorsque les tiques sont placées en culture avant une extraction d'ADN par thermolysat, seul l'ADN des spirochètes présents dans les tiques est disponible lors d'une extraction au NH₄OH. Ainsi, il est possible que le nombre de spirochètes ingérés en début de repas sanguin soit encore très faible, d'autant que le gorgement a été interrompu avant la phase de gorgement rapide. De plus, deux études laissent supposer que le nombre de spirochètes au site de nutrition augmente avec le temps de repas sanguin, par chimiotactisme et par multiplication, grâce à la salive injectée, puisque il a été démontré que des extraits de glandes salivaires de *I. scapularis* attiraient *B. burgdorferi* *ss in vitro* (Shih *et al.*, 2002) et que ceux de *I. ricinus* stimulaient la croissance de *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* *ss* (Rudolf *et al.*, 2010).

En se basant sur la littérature, il apparaît que l'évaluation du temps nécessaire pour qu'une tique saine s'infecte sur un hôte est d'importance pour la dynamique de transmission de *B. burgdorferi* *sl* dans la nature. En effet, les tiques s'infectant lors d'un repas sanguin interrompu transmettent ensuite plus rapidement des spirochètes aux hôtes lors d'un deuxième repas sanguin (Shih et Spielman, 1993). De plus, il semblerait que les repas sanguins interrompus soient assez fréquents dans la nature (Morán Cadenas *et al.*, 2007a), ces auteurs ayant détecté de l'ADN de plusieurs hôtes dans près de 20% des tiques analysées (n=587). Ces observations permettent premièrement d'expliquer, en addition de la transmission transovarienne, la présence de spirochètes chez les larves en quête (Piesman, 1991). Elles permettent aussi d'expliquer, en addition de la transmission par co-feeding et de la transmission transstadiale, les infections mixtes par plusieurs espèces de *Borrelia* observées chez certaines tiques dans de nombreuses études, dont celles de Burri *et al.* (2007), de Morán Cadenas *et al.* (2007) ou

encore Pérez *et al.* (2011). Puisque nous avons observé des différences dans les taux de transmission de l'hôte à la tique en fonction du temps de repas sanguin entre les différents isolats testés (n=3 : NE36 (A2), NE4049 (YU) et NE4051 (YU)), nous en déduisons que la dynamique de transmission de ces différents isolats peut être en partie influencée par la capacité et la rapidité à laquelle ils sont transmis aux tiques dans cette situation. Ceci pourrait en plus être accentué par le fait que le succès du repas sanguin effectué après un repas sanguin interrompu diminue avec la durée de ce dernier (Shih et Spielman, 1993). Ces auteurs ont observé que 90% des nymphes *I. scapularis* étaient capables de se fixer à nouveau sur un hôte après avoir pris un repas sanguin de 16 heures, tandis que seules 63% d'entre-elles en étaient capables après un premier repas de 48 heures et qu'aucune n'en était capable après 72 heures de repas. Dès lors, les isolats rapidement transmis aux tiques lors d'un repas sanguin infectieux seraient favorisés face aux isolats transmis plus tardivement dans le cas d'un détachement, puisque le succès d'un deuxième repas sanguin en serait affecté. Dans notre étude, l'isolat NE4051, fortement transmis par les souris aux tiques dès le début du repas sanguin, pourrait être favorisé face à NE4049, transmis plus faiblement dans les premières heures de repas sanguin.

4.5 Effets de la température sur l'infectiosité des spirochètes

Les études de Piesman (1993) et de Crippa *et al.* (2002) ont toutes deux démontré que les spirochètes de nymphes à jeun (*I. scapularis* et *I. ricinus*) ne sont pas infectieux pour les souris, des injections de broyats de nymphes à jeun infectées n'infectant pas les souris. Ils ont par contre observé qu'après un repas sanguin d'au moins 24 heures (30 heures pour *I. scapularis*), les broyats de ces nymphes deviennent infectieux. Par contre, alors que des souris (n=10) inoculées par des broyats d'*I. scapularis* infectées à jeun par *B. burgdorferi* ss, et placées 30 heures à 37°C, n'ont pas déclaré d'infection (Piesman, 1993), cinq souris sur huit ont été infectées après inoculation d'un broyat d'*I. ricinus* infectées à jeun par *B. burgdorferi* ss et une souris sur 6 avec *B. afzelii* dans l'étude de Crippa *et al.* (2002), après avoir placé ces tiques infectées 24 heures à 37°C.

Lorsque nous avons étudié l'influence de la température comme facteur déclenchant l'infectiosité des spirochètes présents dans les tiques à jeun (chapitre 3.5), nous avons obtenu des résultats contrastés. L'infectiosité des spirochètes a bien été déclenchée par une augmentation de la température, confirmant ainsi les résultats de Mara Crippa (2003), mais ce phénomène n'a été observé que pour le groupe A2. Alors que les autres groupes testés dans cette expérience étaient tous infectieux pour les souris, autant lors d'injections sous-cutanées (chapitre 3.5.1) que lors d'infestations avec des nymphes infectées (chapitre 3.5.3), aucune souris n'a été infectée après injection d'un broyat de nymphes infectées, même placées 24 heures à 37°C avant inoculation avec les groupes A1 (NE5046), A3 (E61) et YU (NE4049 et NE4051). Cette différence pourrait toutefois provenir du nombre de spirochètes injectés. Trois nymphes infectées en moyenne étaient broyées dans du milieu de culture, injecté ensuite aux souris. Le nombre de spirochètes présents dans le milieu de culture était donc très certainement plus faible que lors de l'expérience sur les injections sous-cutanées de culture de spirochètes, puisque ici les spirochètes étaient injectés après croissance à 34°C dans le milieu de culture. Il n'est donc pas exclu qu'un nombre trop faible de spirochètes pour infecter une souris ait été injecté à chaque fois pour ces isolats. En effet, bien que des nombres aussi faibles que de un à 10 spirochètes maintenus en culture suffisent à infecter des souris, des nombres plus élevés sont nécessaires pour obtenir 100% d'infection (Piesman *et al.*, 1990; Barthold *et al.*, 1991; Masuzawa *et al.*, 1992; Lima *et al.*, 2005). Il est aussi possible que les variations phénotypiques observées entre les spirochètes des tiques à jeun et une fois en culture ne s'opèrent pas à la même vitesse entre les différents isolats et que plus de 24 heures sont nécessaire pour que les isolats non infectieux lors de cette expérience le deviennent. Les résultats obtenus par Fingerle *et al.* (2002) ont montré que les profils de protéines de surface des spirochètes après nutrition des tiques par capillaires varient entre les espèces *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. bavariensis*. Chez *B. afzelii* cPKo97, les spirochètes ingérés par les tiques lors de la nutrition par capillaires exprimaient majoritairement OspA et OspC ou aucune des deux protéines. Dix-huit heures après la nutrition, environ 20% des spirochètes n'exprimaient plus que OspA, pour atteindre près de 60% après 96 heures. Chez *B. garinii* IS2r par contre, plus de 80% des spirochètes ingérés se sont très rapidement mis à n'exprimer qu'OspA, tandis que seuls 30% d'entre eux environ étaient dans cette situation au moment de la nutrition. Ces auteurs ont aussi observé des différences entre

Discussion

souches de la même espèce, laissant penser que de telles variations, dans le profil de protéines de surface, et dans le temps nécessaire pour en changer, puissent être retrouvées chez les souches utilisées dans cette étude. Il est ainsi possible que dans notre étude, l'isolat NE36 ait une capacité d'adaptation aux changements environnementaux plus rapide que les autres isolats, et donc qu'il devienne infectieux plus rapidement.

L'exposition des tiques pendant 24 heures à 37°C semble cependant avoir stimuler l'infectiosité des tiques pour les souris, une transmission avant 12 heures de repas sanguin ayant été observée pour l'isolat NE4049 lorsque les nymphes utilisées pour l'infection étaient laissées 24 heures à 37°C, tandis qu'aucune transmission n'a été observée avant 32 heures de gorgement avec les nymphes laissées à température ambiante dans l'expérience sur le temps de repas sanguin nécessaire pour l'infection de l'hôte (chapitre 3.3). Ce résultat laisse penser que le déclenchement de l'infectiosité des spirochètes présents dans l'intestin des tiques par une augmentation de la température pourrait accélérer le début de transmission de la tique à l'hôte lorsqu'elles sont exposées à une température de 37°C. Par contre, alors que l'isolat NE4051 était transmis aux souris après 12 à 24 heures de repas sanguin (tableau 28), aucune transmission précoce n'a été observée ici après avoir laissé les tiques infectées par cet isolat 24 heures à 37°C. Si la température influence bien le temps nécessaire pour qu'il y ait transmission, il était attendu que des souris exposées à des tiques infectées par cet isolat soient infectées. Il faut cependant noter que par groupe, seules trois souris étaient utilisées par isolat, ce qui ne permet de détecter que des prévalences d'infection d'un minimum de 33%, alors qu'une prévalence d'infection de 20% seulement, une souris sur cinq, a été observée dans l'expérience sur le temps nécessaire de repas sanguin pour transmettre des spirochètes aux souris pour NE4051 après 24 heures de repas. Il est donc possible que le phénomène ait été occulté par le faible nombre de souris utilisées.

Nous ne pouvons pas non plus exclure que l'infection observée avant 12 heures de repas sanguin ne soit pas liée à la température d'incubation des tiques avant l'infestation, mais qu'une telle transmission précoce puisse être observée dans des cas rares, ou que les tiques utilisées étaient infectées de manière systémique avant le repas sanguin, pouvant ainsi potentiellement injecter des spirochètes plus rapidement. Toutefois, le fait qu'une augmentation de température déclenche l'infectiosité des spirochètes présents dans les intestins des tiques à jeun (Piesman, 1993; Crippa, 2003)

et induit l'expression d'OspC (Cluss et Boothby, 1990) nous laisse penser que les spirochètes de tiques à jeun exposées à 37°C sont déjà préparés pour leur migration de la tique à la souris et ainsi peuvent être transmis plus rapidement. Ainsi, la présence d'une tique sur le corps d'un hôte, ou une température environnementale élevée, pourrait constituer un stimulus suffisant pour débiter un changement dans l'expression de protéines de surface chez *B. afzelii*. Auquel cas, une transmission précoce pourrait être envisagée. Nos résultats semblent toutefois indiquer que ce déclenchement de l'infectiosité ne soit pas l'apanage de tout isolat. D'ailleurs l'observation de Crippa (2003) était basée sur un seul isolat de *B. afzelii* (NE2961), ce qui ne permet pas de conclure que ce phénomène puisse être généralisable.

4.6 Dynamique de transmission de *B. afzelii*

Le but des infections expérimentales, l'insertion d'isolats par une nutrition de nymphes saines avec des capillaires (chapitre 2.2.2) et l'injection sous-cutanée de spirochètes à des souris saines (chapitre 2.3.4), était d'obtenir au final des nymphes infectées après un repas sanguin infectieux en tant que larves. La volonté de rendre le système biologique décrit au chapitre 2.4 le plus naturel possible impliquait d'avoir de telles nymphes, afin d'éviter les biais inhérents aux méthodes d'infections artificielles. Parmi ces biais, les différences dans l'infectivité et dans la durée d'infectivité des souris suivant le mode d'inoculation (Gern *et al.*, 1993; Lindsay *et al.*, 1997) étaient problématiques pour l'évaluation de l'efficacité de transmission de l'hôte à la tique. Le fait que la multiplication des spirochètes dans la peau soit aussi affectée par la voie d'entrée des spirochètes (Kern *et al.*, 2011) et que la réponse immunitaire des souris varie en fonction du mode d'infection (Roehrig *et al.*, 1992; Gern *et al.*, 1993; Golde *et al.*, 1994; Barthold *et al.*, 1995), qui à son tour peut influencer l'infectivité des souris (Gern *et al.*, 1993), pouvait aussi influencer la dynamique de transmission.

Globalement, la technique de la nutrition par capillaires n'a pas permis d'obtenir du matériel infectieux, sauf avec l'isolat transformé NE4049T. Il est à noter toutefois que les isolats insérés par cette voie ne sont pas des isolats fortement infectieux pour les tiques et/ou les souris (NE4053, A1 et NE4054, ME) au regard de cette étude. Pour les

Discussion

deux autres isolats utilisés, l'un appartient au groupe *ospC* A5 (NE4047), qui très peu présent dans un cycle naturel tiques-rongeurs (Pérez *et al.*, 2011) et l'autre appartient au groupe *ospC* ME (NE4052), faiblement transmis au laboratoire, comme nous l'avons vu. Voyant les bons résultats obtenus avec l'isolat transformé NE4049T et en se basant sur la littérature sur le sujet, nous pensons que l'origine de l'inefficacité de cette technique d'infection provient des isolats utilisés plutôt que de la technique elle-même. En effet, autant dans les études de Gern *et al.* (1993) que de Broadwater *et al.* (2002) des tiques nourries par capillaires étaient infectieuses pour les souris, elles-mêmes ensuite infectieuses pour les tiques.

Il a été beaucoup plus aisé d'obtenir des souris, puis des tiques, infectées par injection sous-cutanée. Nous avons ainsi obtenu des prévalences d'infection des souris de 63% (22/35). Ces souris infectées ont ensuite transmis des spirochètes à 5.3% (24/455) des larves placées le jour de l'injection (j.0) et à 49% (140/286) des larves j.30. L'insertion d'isolats dans un système souris-tiques a ici été donc plus rapide et plus efficace par injections sous-cutanées que par nutrition par capillaires. Par contre, placer des larves le jour de l'injection ne permet pas d'obtenir beaucoup de tiques infectées, puisque seules 24 tiques sur 455 (5.3%) étaient infectées. Observer une transmission de spirochètes aux larves j.0 ne permet pas non plus de détecter précocement une infection systémique de la souris, ce qui est par contre le cas pour la transmission par co-feeding (Hu *et al.*, 2003), comme nous le discuterons plus loin avec nos résultats. En effet, seules 47.4% (9/19) des souris infectées ont transmis des spirochètes aux larves j.0. Par contre 66.7% (8/12) des cas de transmission aux larves j.0 ont tout de même été observés sur des souris infectées. Ces infestations indiquent toutefois que les spirochètes injectés ont migré dans le derme là où les larves se nourrissaient dans un intervalle de quatre jours, le repas sanguin des larves ne durant guère plus longtemps. Il est aussi possible que ces infestations favorisent le développement d'une infection chez l'hôte, puisque il a été montré qu'elles stimulent l'infectiosité des souris (Gern *et al.*, 1994)(fig. 22).

En comparant les prévalences d'infection des souris et leur infectivité lors d'injections sous-cutanées avec celles obtenues lors d'infestations avec des nymphes infectées, d'autres différences apparaissent. Globalement les prévalences d'infection des souris sont semblables, 62.9% (22/35) de souris infectées après injection sous-cutanée et 68% (38/56) lors d'infestation. Cependant, elles diffèrent en ne tenant compte que

des isolats pour lesquels les deux types d'infection ont été utilisés. La prévalence d'infection des hôtes après une injection sous-cutanée est de 87% (14/16), tandis qu'elle atteint seulement 54.1% (20/37) lors d'infestations (tableau 27) ($P < 0.019$, one-tailed Fisher exact probability test). En proposant toutefois de ne pas considérer l'isolat NE4046, puisqu'il n'a pas été infectieux lors d'infections naturelles, les différences observées dans les prévalences d'infection s'effacent à nouveau, puisque les injections sous-cutanées amènent à des prévalences d'infection de 87% (12/14), contre 60.6% (20/33) lors d'infection naturelle.

Dans l'ensemble, il a toutefois été plus aisé d'obtenir une souris infectée par injection sous-cutanée que par infestation avec des nymphes infectées. Cette différence pourrait s'expliquer par le nombre de spirochètes inoculés. Alors qu'environ 200 μ l de culture, contenant environ 10^7 spirochètes par millilitre, étaient injectés, soit près de 2×10^6 spirochètes, seules trois nymphes infectées en moyenne étaient placées sur des souris. Rappelons que bien que le nombre de spirochètes par tique peut atteindre des nombres de l'ordre du million (Herrmann et Gern, 2010), seule une fraction est transmise à l'hôte (Ohnishi *et al.*, 2001; Fingerle *et al.*, 2002). La différence dans le nombre de spirochètes peut donc être très importante, surtout si l'on se réfère aux études de Ohnishi et collaborateurs (2001) et Fingerle et collaborateurs (2002), qui ne dénombrent pas plus de 100 spirochètes par paire de glandes salivaires chez *I. scapularis* entre 63 et 71 heures de repas sanguin et près de 170 spirochètes chez *I. ricinus* avec *B. afzelii*, respectivement, ainsi que l'étude de Kern et collaborateurs (2011) qui estiment à environ cent le nombre de spirochètes injectés à l'hôte par une nymphe *I. ricinus*.

Cette différence dans les prévalences d'infection, obtenues après injection sous-cutanée ou par voie naturelle, soulève aussi le problème de l'infectivité réelle d'un isolat. Alors que des souris ont été infectées par l'injection de culture de NE4046 (A5) et que ces souris étaient ensuite infectieuses pour les tiques lors des xénodiagnoses, aucune souris n'a été infectée lors d'infection naturelle, alors que les infestations avaient été effectuées avec ces mêmes nymphes de xénodiagnose. La présence de spirochètes dans les tiques ayant été détectée par méthode moléculaire (PCR/RLB après thermolysat de culture), il n'est pas possible d'affirmer qu'ils étaient encore vivants dans ces tiques lors des infestations. Toutefois, l'isolat d'origine provient d'une tique prélevée d'un rongeur de la nature (Pérez *et al.*, 2011). Dans leur étude, Pérez *et al.* (2011) n'ont retrouvé le

Discussion

groupe *ospC* A5 que très rarement dans la nature, sur un seul des deux terrains étudiés, et essentiellement chez les tiques libres. Bien que cet isolat provienne d'une tique qui se nourrissait sur un mulot, aucun des rongeurs sélectionnés par ces auteurs n'a transmis de spirochètes appartenant au groupe *ospC* A5 aux tiques de xénodiagnose. Ces auteurs ont émis la possibilité que d'autres espèces d'hôtes pourraient préférentiellement héberger les borrelies appartenant au groupe *ospC* A5, tel que l'écureuil (*Sciurus vulgaris*), bien établi sur le terrain d'étude où ce groupe *ospC* avait été rencontré (Humair et Gern, 1997). Ce phénomène a aussi été observé aux Etats-Unis par Brisson *et al.* (2004) chez *B. burgdorferi* ss. Dans leur étude, alors que les groupes *ospC* A, D, F et K étaient fréquemment rencontrés chez les rongeurs sauvages, le groupe J, par exemple, n'a été retrouvé que chez des tiques libres, par exemple. Il est possible que l'infeciosité de NE4046 observée lors d'injection sous-cutanée provienne de la surcharge bactérienne injectée, submergeant par là le système immunitaire de la souris et permettant une infection systémique, qui serait combattue par le système complément de la souris dans le cas d'une infection naturelle (Kurtenbach *et al.*, 1998) Il est donc délicat d'utiliser des méthodes artificielles d'infection pour évaluer des dynamiques de transmission, puisque certains isolats démontrent une infectivité pour les souris et pour les tiques lors d'infections mécaniques alors qu'ils sont non infectieux dans un modèle souris-tique lors d'infections naturelles.

En observant les infectivités des souris, il apparaît aussi qu'elles varient fortement entre celles obtenues après injection sous-cutanée et par infestation avec des nymphes infectées suivant les groupes *ospC*. Alors que les souris infectées par les groupes A1 (NE4053 et NE5046) et A2 (NE36) ne présentent pas de différences d'infectivité entre ces deux méthodes utilisées pour les infecter, l'infectivité pour les tiques des souris infectées par le groupe A3 (E61) est plus élevée après une infestation par des nymphes infectées qu'après injection sous-cutanée ($P < 0.009$, one-tailed Fisher exact probability test). Un tel phénomène a déjà été décrit par Gern et collaborateurs (1993). L'infectivité de souris (AKR/N et C3H/HeJ) infectées par voie naturelle était de deux à six fois plus élevée que l'infectivité après injection sous-cutanée (Gern *et al.*, 1993). Par contre, nous avons aussi observé la situation inverse. L'infectivité des souris infectées par les groupes A4 (P/sto), A5 (NE4046) et ME (NE4054) était plus élevée

après injection sous-cutanée que lors d'infestations ($P < 0.05$, one-tailed Fisher exact probability test).

Comme nous venons de le mentionner, les injections sous-cutanées infectent les souris avec un nombre très important de spirochètes, ce qui pourrait favoriser l'établissement de spirochètes normalement faiblement infectieux dans l'hôte et ainsi amener à ces infectivités élevées. Pour la situation inverse, il est envisageable qu'un nombre trop élevé de spirochètes injectés puisse parfois amener à un effet négatif sur la population bactérienne. Kern *et al.* (2011) ont observé une diminution du nombre de spirochètes dans la peau pendant les heures suivant une injection intradermique, lorsque le nombre de spirochètes injectés atteignaient environ 10^4 individus par injection, tandis que ce n'était pas le cas avec des nombres de spirochètes plus faibles (10 , 10^2 , 10^3). Par contre, cette diminution n'a été observée que pendant les premières 24 heures suivant l'injection. Ensuite, le nombre de spirochètes augmentait pour atteindre un pic à 7 jours après l'infection. Ces mêmes auteurs, ainsi que Marchal *et al.* (2009, 2011), ont démontré que la salive de tique diminue drastiquement la réponse inflammatoire de la souris, en inhibant la production par la peau de peptides antimicrobiens de la famille des défensines et des cathélicidines, ce qui pourrait permettre un meilleur établissement des spirochètes dans la peau et ainsi favoriser une forte charge bactérienne lors d'infections systémiques. Les souris fortement infectées transmettraient ainsi des spirochètes à plus de tiques. Les corrélations observées entre les différentes voies de transmission lors d'une infection naturelle dans notre étude viennent étayer cette supposition, puisque nous avons vu que les isolats fortement infectieux pour les souris sont fortement transmis aux tiques. Ainsi les isolats NE4049 et NE4051 (YU) ont amené à des prévalences d'infection des souris de 100% (9/9) et 90% (9/10) et des infectivités de 85.5% (100/117) et 70.4% (81/115), respectivement, tandis que les isolats NE4053 (A1) et NE4054 (ME) n'ont permis respectivement d'infecter que 28.6% (2/7) et 30% (3/10) des souris, qui ont transmis des spirochètes à 3.8% (1/26) et 30.8% (12/39) des tiques seulement. De même, nous avons observé que les prévalences d'infection des souris faiblement détectées par biopsies étaient issues de souris faiblement infectieuses pour les tiques. Ainsi, en reprenant les isolats utilisés en exemple ci-dessus, 100% (9/9) et 88.9% (8/9) des infections systémiques ont été détectées par biopsies pour les isolats NE4049 et NE4051 du groupe YU, respectivement, contre 50% (1/2) et 33.3% (1/3) pour NE4053 (A1) et NE4054 (ME),

Discussion

respectivement, ce qui conforte l'idée d'un lien entre la charge bactérienne de l'hôte et son infectivité pour les tiques.

Le phénotype des spirochètes arrivant dans la peau d'une souris lors d'injection sous-cutanée ou via une tique peut être différent, puisqu'il s'agit de spirochètes en culture pour les injections et de spirochètes injectés par une tique (Fingerle *et al.*, 2002; Hodzic *et al.*, 2003). Cette différence dans le mode d'inoculation peut amener à des réponses immunitaires spécifiques au mode d'infection (Roehrig *et al.*, 1992; Gern *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2008b; Kern *et al.*, 2011). Dans l'étude de Gern et collaborateurs (1993), les spirochètes injectés par injection sous-cutanée induisaient une réponse immunitaire anti-OspA et OspB tandis que les infections via des nymphes infectées n'induisaient aucune réponse immunitaire contre ces deux protéines de surface, généralement réprimées lors du passage de la tique à l'hôte (Fingerle *et al.*, 1995; Schwan et Piesman, 2000; Ohnishi *et al.*, 2001; Fingerle *et al.*, 2002; Schwan, 2003). Sachant aussi que la réponse inflammatoire de la peau est influencée par la salive de la tique (Marchal *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2011; Marchal *et al.*, 2011), il est dès lors envisageable que des spirochètes injectés par voie mécanique puissent parfois profiter ou être défavorisés par ces différences. En provoquant en premier lieu une réponse immunitaire anti-OspA et OspB, que les spirochètes éviteraient en s'adaptant au nouveau milieu environnant en réprimant les gènes *ospA* et *ospB* et en augmentant l'expression d'OspC, ils déjoueraient une première fois le système immunitaire, permettant peut-être un meilleur établissement et une meilleure dissémination chez la souris et ainsi pourrait expliquer les infectivités des souris pour les tiques plus importantes que lors d'infections naturelles observées pour certaines souches (P/sto, NE4046 et NE4054). Pour la situation inverse, le manque d'inhibition de la réponse immunitaire provoqué par la salive de tique et le fait qu'une trop forte expression d'OspA semble fortement diminuer la dissémination des spirochètes (Xu *et al.*, 2008b) expliquerait les infectivités moins élevées qu'après une infection naturelle pour l'isolat E61. Il est important de souligner que ces expressions différentielles de protéines de surface ne sont pas toujours clairement définies. Comme nous l'avons vu, bien qu'il y ait une forte expression d'OspA et une faible expression d'OspC dans l'intestin de la tique et que la situation inverse est retrouvée dans les glandes salivaires, tous les cas de figure (des spirochètes exprimant l'une ou l'autre de ces protéines, les deux ou aucune) peuvent être observés autant dans l'intestin que dans les glandes salivaires (Ohnishi *et al.*, 2001; Fingerle *et al.*, 2002). De

plus, ces changements de profils protéiques ne s'effectuent pas à la même vitesse en fonction de l'espèce et de la souche observée (Fingerle *et al.*, 2002). Cette grande variabilité dans l'expression des protéines de surface, induite par le type d'infection, mais aussi et surtout dépendante du génotype du pathogène, amène à des comportements variables qu'il est délicat de comparer, mais qui peuvent expliquer les variations observées dans cette étude.

Finalement, l'infectivité des souris pour les larves j.0 peut dans une certaine mesure être comparée aux efficacités de transmission par co-feeding lors d'infections naturelles. A nouveau, les résultats obtenus après infection expérimentale diffèrent des résultats obtenus lors d'une infection via des nymphes infectées. L'infectivité des souris pour les larves j.0 est globalement beaucoup plus faible que celle obtenue lors d'infections naturelles, puisque les souris ont transmis des spirochètes à 5.3% (24/455) des larves j.0, contre 26% (260/1001) lors des infections naturelles (tableau 11, fig. 25). En considérant les isolats, il est intéressant de noter que tous ceux transmis par co-feeding étaient transmis aux larves j.0 après une injection sous-cutanée. Par contre, alors qu'aucune transmission par co-feeding n'a été observée pour les isolats P/sto (A4) et NE4046 (A5), ces isolats ont été transmis aux larves j.0, à des taux de 23.1% (6/26) et 3.8% (1/26), respectivement. Dans l'étude de Gern *et al.* (1996), une transmission par co-feeding de *B. burgdorferi* ss (ZS7) a été observée chez 7% (1/14) à 56% (5/9) des larves placées à proximité immédiate deux jours après des nymphes infectées (n=7/souris). Par contre, les larves placées sur les souris cinq jours après le début du repas des nymphes étaient infectées à hauteur de 22 (2/9) à 77% (10/13), avec une infection de 100% des larves (n=2) chez une souris. La transmission par co-feeding augmente donc lorsque les larves sont placées à différents temps du repas sanguin des nymphes, phénomène confirmé par Richter *et al.* (2002), ces auteurs ayant observé des taux d'infection des larves de co-feeding de 1.6% (n=125) chez des larves placées un jour après, de 29.9% (n=67) chez les larves placées deux jours après et de 55.3% (n=94) pour les larves placées trois jours suivant le début du repas sanguin des nymphes infectées. De plus, les deux études ont aussi observé une diminution du taux d'infection des larves en fonction de la distance les séparant des nymphes, démontrant par là qu'il s'agit bien d'une infection des souris localisée et non systémique. La faible infectivité des souris pour les larves j.0, comparée aux taux de transmission par co-feeding, peut donc provenir de plusieurs facteurs.

Discussion

Premièrement, le fait que les larves j.0 étaient placées directement après l'injection sous-cutanée, tandis que les larves servant à évaluer l'efficacité de transmission par co-feeding étaient ajoutées deux jours après une infestation avec des nymphes a sans doute influencé les résultats obtenus. Puisque nous venons de voir que la transmission par co-feeding augmente avec le temps de gorgement des nymphes infectées (Gern et Rais, 1996; Richter *et al.*, 2002), nous pouvons en déduire que l'établissement des spirochètes dans la peau au cours du temps favorise leur transmission aux larves lors d'une infection localisée chez la souris et que les spirochètes venant d'être injectés n'y était ainsi pas encore préparés.

De plus, alors que les larves utilisées pour l'évaluation de la transmission par co-feeding étaient retenues dans des capsules en plastique, les larves j.0 étaient appliquées au pinceau sur la zone d'injection. Comme les larves ont une préférence pour le museau et le pourtour des yeux des rongeurs, la majorité des larves se déplaçaient dans cette zone lors des infestations et ainsi s'éloignaient du lieu d'inoculation. Puisque la transmission par co-feeding chez *B. burgdorferi* sl est fortement dépendante de la distance à laquelle les tiques saines se nourrissent des tiques infectées (Gern et Rais, 1996; Randolph *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 2002), les larves ainsi éloignées du lieu d'inoculation n'étaient que peu en contact avec les spirochètes. Nous pouvons imaginer que les bactéries devaient migrer dans le derme afin d'atteindre les sites de nutrition des larves afin d'y être ensuite ingérées. Finalement, la salive injectée par les nymphes lors des infections naturelles et la différence de phénotype entre les spirochètes de culture et ceux injectés avec la salive (Fingerle *et al.*, 2002; Hodzic *et al.*, 2003; Schwan, 2003) ont aussi certainement influencé cette transmission.

Cette variabilité dans la transmission des spirochètes est aussi retrouvée lors d'infections par voie naturelle (chapitre 3.2.3). En observant les prévalences d'infection des souris tout d'abord, indépendamment du groupe *ospC*, certains isolats sont fortement infectieux pour les souris, tels que les groupes *ospC* A2 (NE36), A4 (P/sto) et YU (NE4049 et NE4051), tandis que d'autres ne le sont que faiblement, comme le groupe *ospC* ME (NE4054) ou l'isolat NE4053 (A1). Plusieurs études ont déjà démontré que des variations dans la virulence d'une espèce de borrelies sont observées entre isolats appartenant à des groupes *ospC* différents (Derdakova *et al.*, 2004; Dolan *et al.*, 2004; Hanincova *et al.*, 2008) et entre espèces d'hôte (Hanincova *et al.*, 2008). Effectivement,

l'étude de Derdakova *et al.* (2004) a démontré que des différences dans l'infectivité de *P. leucopus* pour *I. scapularis* sont retrouvées entre deux isolats, l'un appartenant au groupe RST1 et au groupe *ospC* A, groupe contenant des isolats invasifs, et l'autre au groupe RST3 et au groupe *ospC* E, contenant des isolats moins invasifs (Wang *et al.*, 2002). Alors que l'infectivité des souris infectées par l'isolat du groupe RST1 était élevée et restait élevée au cours du temps, l'infectivité de souris infectées par l'isolat du groupe RST3 diminuait rapidement avec le temps. Ces mêmes différences ont aussi été observées par Hanincova *et al.* (2008) en utilisant un système similaire, à savoir les mêmes isolats et la souris *P. leucopus*. Par contre, ces différences se sont estompées lorsque ces auteurs ont observé l'infectivité des souris de laboratoire C3H/HeNCrI comme hôte, toujours avec les deux même isolats. Dans ce cas de figure, la diminution de l'infectivité des souris infectée par l'isolat appartenant au groupe RST3 était significativement moins importante. Très justement, Derdakova *et al.* (2004) soulèvent une question importante dans leur conclusion : Est-ce que ces observations peuvent-êtré généralisées aux groupes RST? Notre étude semble y apporter une réponse plutôt négative, puisque nous avons observé de fortes différences autant dans les prévalences d'infection des souris que dans leur infectivité pour les tiques entre isolats d'un même groupe *ospC*. Sachant que le typage RST est plus global que le typage *ospC*, chaque RST englobant plusieurs groupes *ospC* différents, il paraît peu probable qu'une telle caractéristique commune à un groupe RST puisse apparaître.

Ce qui est aussi intéressant dans notre étude, c'est que ces différences soient aussi retrouvées au sein d'un même groupe *ospC*, alors que la diversité de ce gène semble être généralement en accord avec les classifications phylogénétiques (Bunikis *et al.*, 2004; Attie *et al.*, 2007). Effectivement, dans les études de Bunikis *et al.* (2004), portant sur *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii*, et de Attie *et al.* (2007), portant sur *B. burgdorferi* ss, une concordance était observée entre la classification phylogénétique basée sur l'espace intergénique *rrs-rrlA* (IGS) (Bunikis *et al.*, 2004), ou par MLST (Attie *et al.*, 2007), et la diversité du gène *ospC*. Ainsi, pour chaque lignée phylogénétique correspondait généralement un seul groupe *ospC*, ce qui laisse à penser que deux isolats portant le même allèle *ospC* aient des caractéristiques génétiques similaires. Les différences observées dans les prévalences d'infection, et d'une manière générale dans la dynamique de transmission, puisque les différentes voies de transmission sont positivement corrélées, sous entendent par contre que les deux isolats du groupe A1 ne

Discussion

partagent pas le même matériel génétique, à l'inverse du groupe YU, dont les deux isolats démontrent des dynamiques de transmission très proches. Bien sûr, il est tout-à-fait possible qu'un transfert du gène *ospC* ait eu lieu chez l'un ou l'autre des isolats du groupe A1 (NE4053 et NE5046), comme cela a déjà été démontré entre la souche m7 de *B. valaisiana* et la souche ACA1 de *B. afzelii*, qui arborent le même gène *ospC*, par exemple (Wang *et al.*, 1999a). Il est également possible que d'autres facteurs de virulence aient été transférés d'un isolat peu virulent à NE4053 ou d'un isolat fortement virulent à NE5046 lors de leur cycle naturel. Comme le groupe *ospC* A1 est bien représenté dans la nature, ayant été retrouvé chez 12% et 31% des tiques libres, chez 18% et 30% des tiques se nourrissant sur les rongeurs et chez 29% et 48% des tiques de xénodiagnose effectuées sur ces rongeurs, en fonction du terrain d'étude (Pérez *et al.*, 2011), il nous paraît plus probable qu'un transfert génétique péjorant la virulence de NE4053 ait eu lieu plutôt qu'un transfert génétique améliorant la virulence de NE5046. Il est aussi assez déroutant de voir de telles différences dans l'efficacité de transmission entre deux isolats provenant du même terrain d'étude, l'un obtenu d'une tique de xénodiagnose (NE4053) effectuée sur un campagnol et faiblement transmis dans le système biologique de cette étude, et l'autre d'une tique libre (NE5046), fortement transmis aux souris et aux tiques en laboratoire. Il est intéressant de noter que l'isolat NE4053, faiblement transmis dans notre système biologique, provient d'une tique de xénodiagnose effectuée sur un campagnol. En effet, en se référant à l'étude d'Humair *et al.* (1999), les campagnols développeraient plutôt une réponse immunitaire contre les tiques que contre les spirochètes, à l'inverse du mulot. Ainsi, le succès de mue des tiques se nourrissant sur les campagnols est moins élevé comparé au succès observé chez le mulot. Par contre, les campagnols transmettent des spirochètes à plus de tiques de xénodiagnose que les mulots. Le campagnol n'aurait donc pas un rôle très sélectif quant aux borrélioses qu'il héberge et transmet aux tiques, ce qui expliquerait la présence de cet isolat faiblement transmis aux souris de laboratoire chez un rongeur sauvage.

Ces différences entre isolats sont aussi retrouvées dans l'infectivité des souris pour les tiques. A nouveau des différences ont été observées autant entre groupes *ospC* qu'au sein d'un même groupe, toujours pour le groupe A1. L'infectivité des souris était généralement constante lorsqu'elles étaient infectées par un même isolat, le groupe ME mis à part. Les isolats étaient soit fortement infectieux pour les tiques (NE5046, NE36, E61, NE4049, NE4051), soit faiblement infectieux (NE4053, P/sto). Pour le groupe ME

par contre, les trois souris infectées ont transmis des spirochètes à respectivement 7.7% (1/13), 7.7% (1/13) et 76.9% (10/13) des tiques, bien qu'infectées à l'origine avec le même lot de tiques infectées (annexe 9.3).

Lors de la mise au point du modèle linéaire généralisé, les différentes souris utilisées par isolat, donc les différentes répétitions d'expériences, ont été utilisées comme variables explicatives du modèle, en parallèle aux isolats et aux groupes *ospC*. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents essais, indiquant une faible variabilité entre souris, autant dans leur infectivité pour les tiques que lors des transmissions par co-feeding, sauf pour les trois souris infectées par l'isolat NE4054 (ME), qui comme nous venons de le voir ont transmis des spirochètes à respectivement 7.7% (1/13), 7.7% (1/13) et 76.9% (10/13) des tiques. La souris fortement infectieuse a d'ailleurs été la seule dont les biopsies d'oreille étaient positives, laissant apparaître un lien entre la charge bactérienne de la souris et son infectivité pour les tiques, comme nous l'avons discuté précédemment.

Individuellement, des infectivités de 100% (13/13) ont été observées chez des souris infectées par des isolats des groupes A1 (NE5046) et YU (NE4049 et NE4051)(annexe 9.3). Il est intéressant de noter que regroupées par isolat, les souris ayant amené aux infectivités les plus faibles sont aussi celles dont les prévalences d'infection n'ont que partiellement été détectées par biopsie d'oreille, comparé à la détection par xénodiagnose. Cette observation laisse supposer que ces isolats ne se disséminent que lentement chez la souris et/ou qu'ils ne se multiplient pas aussi fortement que les autres, amenant à des prévalences d'infection faiblement détectées par biopsie, mais aussi à des infectivités pour les tiques plus faibles. Une telle différence de dissémination et de multiplication a d'ailleurs déjà été décrite chez *B. burgdorferi* ss (Wang *et al.*, 2001; Zeidner *et al.*, 2001).

Nous venons de voir que l'infectivité des souris est corrélée à leur prévalence d'infection. Par contre le co-feeding en est indépendant, puisque 35.1% (13/37)(la transmission par co-feeding d'une souris infestée par NE4049 n'a pas été évaluée, ramenant le total de souris infectées à 37 au lieu de 38) des souris présentant des infections systémiques n'ont pas servi de support pour une transmission par co-feeding et que les isolats des groupes A3 (E61) et A4 (P/sto) n'en ont jamais été capables. Il est à noter que ces isolats ne proviennent pas de l'étude de Pérez *et al.* (2011), mais ont été

Discussion

obtenus de biopsies de peau effectuées sur un érythème migrant d'un patient en Autriche pour E61 (Livey *et al.*, 1995) et sur une ACA en Allemagne pour P/sto (Preac-Mursic *et al.*, 1986). Nous ne connaissons pas les conditions dans lesquels ces isolats ont été maintenus, ni le nombre de repiquages qu'ils ont subis en culture. Sachant que plus un isolat subit de repiquage, plus il est enclin à perdre certains plasmides (Barbour, 1988b) et que la perte de plasmides influence la virulence d'un isolat (Norris *et al.*, 1995; Purser et Norris, 2000; Byram *et al.*, 2004), il est possible que ces deux isolats aient perdu les facteurs génétiques nécessaires pour une transmission par co-feeding. En comparant ces résultats à ceux obtenus lors des infections par injection sous-cutanée, nous avons remarqué que tous les isolats transmis par co-feeding ont été transmis aux larves j.0 et alors qu'aucune transmission par co-feeding n'a été observée pour E61 (A3), aucune larve j.0 ne s'est infectée. Par contre, alors que l'isolat P/sto (A4) n'était pas non plus transmis par co-feeding, 23.1% (6/26) des larves j.0 se sont tout de même infectées.

Cette observation qu'aucune transmission par co-feeding n'ait été observée chez 35.1% des souris infectées est en désaccord avec l'étude de Hu *et al.* (2003), dans laquelle seules 5% (6/111) des souris infectées par *B. burgdorferi* si n'avaient pas servi de support pour une transmission par co-feeding. Dans leur étude, les souris étaient aussi infestées par trois nymphes infectées en moyenne. Par contre, les tiques utilisées provenaient de la nature, ce qui exposait potentiellement les souris à plusieurs espèces et/ou isolats, puisque chaque tique infectée pouvait être infectée par un—voire plusieurs—espèces/isolats différents. Nous avons vu que l'aptitude des spirochètes à se transmettre par co-feeding est dépendante de l'isolat. Ainsi les chances d'observer une transmission par co-feeding en infestant des souris avec potentiellement plusieurs isolats augmenteraient, ce qui pourrait expliquer en partie ces différences. Dans l'étude citée, les auteurs concluent que la détection d'une infection systémique chez la souris peut être effectuée précocement en détectant une transmission par co-feeding (Hu *et al.*, 2003). Toutefois, ceci ne semble pas s'appliquer au niveau intraspécifique, puisque les résultats présentés ici indiquent que la capacité de transmission par co-feeding est une qualité intrinsèque à un certain isolat. Dans notre étude, nous avons constaté que 100% des infections systémiques pouvaient être détectées précocement grâce à l'observation d'une transmission par co-feeding pour les isolats NE5046 (A1, n=4) et NE4049 (YU, n=8), tandis que seules 50% pouvaient l'être pour les isolats NE4053 (A1, 1/2) et NE36

(A2, 2/4) et qu'aucune infection systémique n'a été détectée précocement pour les isolats E61 (A3, 0/3) et P/sto (A4, 0/4). En ne tenant compte que des 48% (26/56) de souris pour lesquelles une transmission par co-feeding a été observée, il apparaît tout de même que 92.3% (24/26) d'entre elles ont déclaré des infections systémiques par la suite. Une transmission par co-feeding est donc généralement annonciatrice d'une future infection systémique, confirmant les résultats de Hu *et al.* (2003), mais ne permet par contre pas d'évaluer efficacement des prévalences d'infection de manière précoce au niveau de l'isolat. Individuellement, des efficacités de transmission par co-feeding élevées (61% (8/13)-100% (13/13)) n'ont été observées que pour le groupe YU, les efficacités de transmission par co-feeding étant aussi généralement stables entre les différents essais (annexe 9.3). Enfin, la transmission par co-feeding démontre également des différences entre groupes *ospC* et au sein des groupes A1 et YU.

Dans les forêts Suisses favorables aux tiques, environ 60-70% des rongeurs sont infestés par des tiques immatures pendant la période d'activité des tiques (Burri *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2012). Ces rongeurs parasités sont infestés par en moyenne 10 larves et 0.5 nymphes (Pérez *et al.*, 2011), avec la présence de co-feeding chez 13-38% des rongeurs infestés (Burri *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011). Finalement, la prévalence de nymphes infectées dans ces régions est d'environ 20%, dont une majorité l'est par *B. afzelii* (Morán Cadenas *et al.*, 2007b; Pérez *et al.*, 2012). Cette dernière observation est en accord avec les situations observées dans les pays limitrophes (Rauter et Hartung, 2005). Les conditions nécessaires à une transmission de *B. afzelii* par co-feeding par des rongeurs ne sont donc pas très fréquentes dans la nature. Il faut aussi noter que dans ces études, dès qu'un rongeur est infesté par des larves et des nymphes il est considéré comme supportant le co-feeding. La séquence d'infestation dans le temps entre les larves et les nymphes n'est pas définie. Il se peut donc qu'un rongeur infesté par les deux stades, servant alors potentiellement de support pour une transmission par co-feeding, soit premièrement infesté par des larves et que la ou les nymphes infectées ne se fixent que pour les dernières heures de repas sanguin des premières. Puisqu'il n'y a pas de transmission de spirochètes dans les premières heures de repas sanguin (Crippa, 2003), aucune transmission par co-feeding ne pourra être effectuée, bien que la souris soit considérée comme supportant une telle transmission. La situation inverse est dès lors aussi possible et il devient difficile de séparer une transmission entre nymphes et larves d'une transmission de l'hôte, présentant une infection localisée ou systémique, à la

Discussion

tique. Par contre, le fait que les rongeurs de la nature soient continuellement infestés par des tiques (Pérez *et al.*, 2012) augmente les chances que des larves se nourrissent en même temps que des nymphes.

Dans le système biologique de cette étude, chaque essai permettait une transmission par co-feeding. De plus, trois nymphes infectées étaient placées sur chaque souris, ce qui est bien plus que ce qui est observé en moyenne dans la nature, et les larves étaient ajoutées deux jours après la fixation des nymphes, permettant de synchroniser la fin du repas sanguin des larves et des nymphes. Malgré cela, aucune transmission n'a été observée pour les groupes A3 et A4 et une transmission très faible est apparue pour l'isolat NE4053 (A1) et pour le groupe ME. Le fait que certains isolats soient incapables de transmission par co-feeding, même lorsque les conditions sont plus que favorables et alors qu'ils sont infectieux pour les hôtes et pour les tiques, sous-entend une composante génétique propre à un isolat permettant, ou ne permettant pas, cette transmission. Un lien avec le gène *ospC* seul n'est par contre que difficilement envisageable, puisque des différences dans la transmission par co-feeding intrinsèques à un groupe *ospC* ont été observées autant pour le groupe A1 que pour le groupe YU, bien que les séquences du gène *ospC* à l'intérieur de ces groupes sont identiques. Dès lors, d'autres gènes doivent contribuer à cette capacité de transmission de tique à tique. Bien que la souris ne soit qu'un support, il est clair que sa peau est une interface très importante dans ce type de transmission (Frischknecht, 2007). Les spirochètes injectés par les nymphes doivent pouvoir s'y établir et migrer afin de rejoindre les sites de nutrition des larves. Sans parler de la réaction immunitaire en réponse à la pique de tique, l'arrivée de spirochètes dans la peau est détectée entre autre par les kératinocytes, engendrant la production de molécules pro inflammatoires et de peptides antimicrobiens (Pivarcsi *et al.*, 2004; Singh et Girschick, 2006). Chez *B. burgdorferi* ss, les kératinocytes reconnaissent la protéine OspC, mais pas seulement, puisque des mutants n'exprimant pas OspC déclenchent tout de même la production de molécules pro inflammatoires (Marchal *et al.*, 2011). Bien que cette protéine OspC soit détectée par la peau, et surtout qu'elle se lie à SALP15 afin d'éviter cette réponse immunitaire (Hovius *et al.*, 2008; Schuijt *et al.*, 2008), laissant supposer qu'elle joue un rôle important dans l'établissement des spirochètes dans la peau, d'autres gènes doivent permettre aux spirochètes d'évoluer chez l'hôte dans les premiers instants de l'infection et ainsi influencer la transmission par co-feeding.

Même si la transmission par co-feeding ne joue que le rôle secondaire concernant la prévalence d'infection des nymphes dans la nature, elle peut être importante pour le maintien de la diversité d'*ospC* (Pérez *et al.*, 2011). Dans l'étude de Pérez *et al.* (2011), la diversité du gène *ospC* a été évaluée dans deux terrains d'étude, ici dénommés site 1 et 2, dans une population de tiques libres, de tiques se nourrissant sur des mulots et des campagnols et de tiques issues de xénodiagnoses effectuées sur ces mêmes rongeurs. Il apparaît que dans les deux terrains d'étude, la plus grande diversité d'allèles *ospC* a été observée dans les tiques libres, avec la présence de 8 et 7 différents groupes *ospC* pour les sites 1 et 2, respectivement. Par contre, seulement quatre de ces groupes étaient encore détectés chez les tiques qui s'étaient nourries sur des rongeurs capturés sur le site 1, tandis que sept groupes *ospC* étaient toujours retrouvés chez les tiques provenant des rongeurs capturés sur le site 2. Sur les deux terrains, un nombre plus élevé de groupes *ospC* a été détecté dans les larves de rongeurs lorsqu'une nutrition par co-feeding avec ces nymphes était observée (2.25 sur le site 1 et 1.75 sur le site 2) que lorsque les rongeurs n'étaient infestés que par des larves (1.17 sur le site 1 et 1 sur le site 2), amenant ces auteurs à postuler que la transmission par co-feeding participe à la diversité du gène *ospC* dans la nature (Pérez *et al.*, 2011). Finalement, 28% des rongeurs capturés sur le site 2 étaient infestés par des larves et des nymphes, contre 11% seulement sur le site 1, laissant supposer que la plus grande diversité du gène *ospC* observée chez les tiques se nourrissant sur les rongeurs capturés sur le site 2 soit due à une transmission par co-feeding.

En se référant aux études de Brisson et collaborateurs (2004, 2006), qui se sont penchées sur les mécanismes évolutifs pouvant expliquer la diversité génétique observée au niveau du gène *ospC* de *B. burgdorferi* ss dans des populations de tiques infestant quatre espèces de rongeurs aux Etats-Unis, le maintien de tous ces allèles serait lié à une sélection balayante. Dès lors, certains groupes *ospC* seraient désavantagés soit en infestant certains hôtes, pour la sélection de niche, puisque ces auteurs ont observé une distribution des groupes *ospC* de *B. burgdorferi* ss inégale en fonction de l'espèce d'hôte, soit lorsque la fréquence de l'allèle est élevée dans une population d'hôte pour la sélection dépendante de la fréquence. Pour cette sélection dépendante de la fréquence, il serait attendu que les rongeurs soient infectés par la totalité des groupes *ospC* présents dans l'environnement, ce qui n'est pas le cas dans la nature, puisque aucune des quatre espèces de rongeurs analysées n'hébergeait la

Discussion

totalité des groupes *ospC* rencontrés chez les tiques libres. Ces deux mécanismes ne sont toutefois pas exclusifs et pourraient tout à fait fonctionner parallèlement (Brisson et Dykhuizen, 2004). Brisson et Dykhuizen (2004) ne tiennent par contre pas compte de la transmission par co-feeding, jugée marginale face à la transmission de l'hôte à la tique, mais seulement de la possibilité d'infection d'un hôte et/ou de l'apparition d'une systémie chez l'hôte. Etant donné qu'une transmission par co-feeding peut avoir lieu sans infection systémique ultérieure, et que la prévalence d'infection des hôtes est indépendante d'une transmission par co-feeding (fig. 28), il est envisageable qu'elle contribue significativement à cette diversité sur les hôtes résistants à certains groupes *ospC* ou devenus résistants à certains groupes après une première exposition. Ceci est important surtout pour des isolats tels que ceux appartenant au groupe YU, qui sont transmis à plus de 60% des larves de co-feeding. Ainsi, les groupes *ospC* défavorisés parce que fortement présents dans la nature ou parce que transmis à un hôte réfractaire, pourraient toujours se maintenir dans les tiques grâce à cette transmission de tique à tique. Ceci expliquerait en partie la prévalence des groupes *ospC* A1 et YU observée dans la nature par Pérez *et al.* (2011), puisque ces groupes *ospC* semblent fortement transmis par co-feeding. Même en rencontrant de nombreux hôtes devenus résistants, les spirochètes continueraient à être transmis aux tiques par co-feeding. Toutefois, l'étude de Gilmore et Piesman (2000) a démontré que chez *I. scapularis*, la migration de *B. burgdorferi* ss de l'intestin aux glandes salivaires est fortement inhibée lorsque des nymphes infectées (n=8 et 19/souris) se nourrissent sur des souris (n=2) immunisées contre OspC grâce à une protéine recombinante. Effectivement, les auteurs ont observé que seules deux tiques sur 27 (7.4%) étaient infectées au niveau des glandes salivaires après 72 heures de repas sanguin sur les souris immunisées, contre 10/25 (40%) chez les tiques ayant infesté des souris naïves (n=3). De plus, les auteurs n'ont pas observé de lyse de bactéries lorsque des spirochètes étaient en contact avec du sérum anti-OspC. Ces tests laissent supposer une interférence entre OspC et ses ligands provoquée par les anticorps anti-OspC, empêchant ainsi la migration des spirochètes de l'intestin aux glandes salivaires, plutôt qu'un effet antibactérien envers les spirochètes exprimant OspC. Si une telle inhibition se retrouve aussi dans un système naturel, chez des rongeurs immunisés après une première exposition, la transmission par co-feeding en serait fortement affectée.

Le co-feeding est crucial pour le maintien du cycle endémique du virus de l'encéphalite à tique dans la nature (Labuda *et al.*, 1993; Randolph *et al.*, 1999; Randolph, 2011). Par contre, le facteur important pour la transmission de ce dernier n'est pas tant l'aspect spatial, contrairement à ce qui est observé avec les spirochètes, comme nous l'avons vu. Le virus passe par le sang et est distribué rapidement dans le corps de l'hôte (Randolph *et al.*, 1996; Randolph, 2011). Par contre, il y est rapidement éliminé (Kozuch *et al.*, 1981), ce qui implique que la temporalité est plus importante que les lieux de nutrition des tiques infectées et saines (Randolph *et al.*, 1999). Dans ce système, il a été démontré que bien qu'immunisés, les mulots et les campagnols permettent tout de même une transmission du virus par co-feeding entre des femelles *I. ricinus* infectés et des nymphes saines, que ces nymphes se nourrissent proches des adultes infectés ou éloignés, bien que dans ce dernier cas, l'immunisation diminue le taux de transmission par co-feeding (Labuda *et al.*, 1997). En effet, ces auteurs ont observé que 75% (9/12) des rongeurs immunisés permettaient une transmission du virus par co-feeding. Il apparaît donc important d'évaluer l'efficacité de transmission de *B. burgdorferi* si par co-feeding sur des hôtes résistants et des hôtes exposés préalablement à certains groupes *ospC* et ainsi d'évaluer correctement l'effet potentiel de cette voie de transmission sur la diversité du gène *ospC* dans la nature.

Nous avons observé que les différentes voies de transmission de *B. afzelii* dans notre modèle, soit de la souris à la tique et de la tique à la souris, sont corrélées. Cette observation laisse supposer un mécanisme commun influençant la transmission des spirochètes entre l'hôte et le vecteur. Du côté des souris, nous avons vu que le pouvoir de maintien, de multiplication et d'établissement d'une infection systémique d'un isolat pourrait expliquer ces liens, mais le fait que de fortes différences aient été observées au sein d'un même groupe *ospC* semble exclure ce gène, en partie responsable de la dissémination et de l'invasivité chez l'hôte (Lagal *et al.*, 2006; Seemanapalli *et al.*, 2010). Par contre, la dissémination dans la peau pourrait influencer et la transmission par co-feeding et l'infectiosité des souris. En se multipliant fortement et en migrant dans la peau de manière étendue, les efficacités de transmission à la tique pourraient en être affectées de manière positive. D'ailleurs, comme il a été dit plus haut, les isolats avec une dynamique de transmission faible sont ceux qui ont été les moins bien détectés dans les biopsies d'oreille, ce qui suppose soit une migration lente, soit une faible quantité de

spirochètes dans les tissus prélevés. Un des gènes codant pour une autre protéine de surface, le gène *bbk32* pourrait être un candidat potentiel expliquant ces corrélations. Il a été démontré que BBK32 est une adhésine ayant une affinité pour la fibronectine (Probert et Johnson, 1998; Probert *et al.*, 2001) et qu'elle permettrait aux spirochètes de se disséminer chez l'hôte (Probert *et al.*, 2001). La protéine est aussi exprimée suivant un schéma proche d'OspC, c'est-à-dire au début du repas sanguin de la tique, mais pas dans les tiques à jeun (Li *et al.*, 2006). Néanmoins, elle n'est pas indispensable pour l'infection de l'hôte par *B. burgdorferi* ss ni pour la transmission à la tique chez *I. scapularis*, et ne semble pas influencer l'invasivité chez l'hôte ni l'efficacité de transmission de l'hôte à la tique (Li *et al.*, 2006). Cependant, ces observations ont été effectuées avec une souche seulement (*B. burgdorferi* ss, souche B31). En se référant à nos résultats, des variations importantes sont observées entre isolats. Il est donc délicat de conclure que ce gène n'influence pas la dynamique de transmission de *B. burgdorferi* ss alors que ces observations ont été faites sur une population seulement. Du côté du vecteur, les gènes *bba64* et *bbe31* pourraient aussi être en partie responsables de ces variations, puisqu'ils semblent être très importants pour la transmission de *B. burgdorferi* ss de la tique à l'hôte (Gilmore *et al.*, 2010; Patton *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2011). Dans ces études, des mutants de *B. burgdorferi* ss n'exprimant pas BBA64 n'étaient que faiblement infectieux pour des souris lors d'une transmission par *I. scapularis*, alors que ces mêmes mutants étaient infectieux pour les souris lors d'injections et étaient capables d'être transmis aux tiques (Gilmore *et al.*, 2010), amenant à la conclusion que ce gène est impliqué à l'interface glandes salivaires-transmission à l'hôte (Patton *et al.*, 2011a). Nous pouvons donc imaginer que des différences génétiques touchant ce gène *bba64* pourraient influencer la capacité de transmission des spirochètes de la tique à l'hôte. L'étude de Zhang *et al.* (2011) a quant à elle permis d'observer que la protéine BBE31 permet à *B. burgdorferi* ss de traverser la paroi intestinale et ainsi d'envahir les tiques de manière systémique en se liant au récepteur intestinal de la tique *I. scapularis* TRE31, pour Tick Receptor of BBE31. Ils ont observé que des tiques privée du récepteur TRE31 étaient nettement moins infectées au niveau des glandes salivaires et dans l'hémolymphe que les tiques exprimant ce récepteur, sans que la charge bactérienne dans l'intestin des tiques ne varie. Ils ont aussi observé une nette diminution de la prévalence d'infection chez des souris ayant reçu une injection de sérum de lapins exposés à BBE31, comparé aux souris naïves. Une

variabilité d'interaction entre ce gène *bbe31* et TRE31 pourraient aussi contribuer aux différences d'efficacité de transmission de la tique à l'hôte observées dans cette étude, en agissant sur le nombre de spirochètes arrivant aux glandes salivaires et donc pouvant être injectés aux souris.

La dynamique de transmission de *B. afzelii* par *I. ricinus* ne semble donc pas être influencée par le seul gène *ospC* au niveau intraspécifique. D'autres gènes, tels que *bba64*, *bbk32*, *bbe31* décrits plus haut doivent participer d'une manière non négligeable à la capacité d'un isolat à circuler entre son hôte et son vecteur. Etant donné les interactions auxquelles le gène *ospC* participe, il apparaît cependant qu'il doit contribuer à l'efficacité de transmission globale, mais que son action pourrait être masquée par les effets d'autres gènes participant aussi à la virulence d'un isolat, vu les nombreuses interactions existantes entre les protéines exprimées par *B. afzelii* et son environnement.

Finalement, nous avons vu que l'hôte peut influencer la dynamique de transmission de *B. burgdorferi* si via son système immunitaire (Kurtenbach *et al.*, 1998; Kurtenbach *et al.*, 2002; Hanincova *et al.*, 2008). Nous pouvons aussi envisager que les tiques influencent cette dynamique. En effet, bien que la structure génétique des populations d'*I. ricinus* en Europe soit assez hétérogène (Noureddine *et al.*, 2011), des sous-populations, liées à certains hôtes, sont observées dans la nature (Kempf *et al.*, 2011). Il existe donc des populations de vecteurs génétiquement différentes dans l'environnement. En se référant à l'étude de Narasimhan *et al.* (2007), il apparaît que la protéine de la salive de *B. burgdorferi* ss Salp25D, un antioxydant, favorise la transmission des spirochètes de l'hôte à la tique (Narasimhan *et al.*, 2007). Nous pouvons donc imaginer que des différences génétiques au niveau du gène *salp25D* existent entre les populations d'*I. ricinus*, amenant à des populations de tiques s'infectant plus facilement que d'autres lors d'un repas sanguin infectieux. Cette supposition pourrait s'appliquer bien évidemment à d'autres gènes que *salp25D*, cité ici à titre d'exemple.

4.7 Distribution des groupes *ospC* dans la nature

Discussion

La moitié des isolats utilisés lors des infections naturelles (NE4053, NE4046, NE4049, NE4051 et NE4054) proviennent d'échantillons récoltés durant le travail de Pérez *et al.* (2011, 2012). La comparaison de leurs résultats avec les dynamiques de transmission évaluées ici lors d'infection naturelle dévoile que les groupes les plus fréquemment transmis lors de xénodiagnoses sur des mulots et des campagnols dans l'étude de Pérez *et al.* (2011) sont les groupes auxquels appartiennent les isolats les plus fortement transmis aux souris et aux tiques dans ce travail. Effectivement, dans l'étude de Pérez *et al.* (2011), les groupes A1 et YU étaient les groupes les plus fréquemment rencontrés chez les larves de xénodiagnose sur les mulots et les campagnols, ce pour les deux sites étudiés, avec des fréquences de 29% et 48% pour le groupe A1 et 59% et 33% pour le groupe YU sur les sites 1 et 2, respectivement. Dans notre recherche, les isolats NE5046 (A1), NE4049 et NE4051 (YU), les plus fortement transmis aux tiques, appartiennent aussi à ces groupes. A l'inverse, les isolats faiblement transmis aux souris et aux tiques en laboratoire appartenaient aux groupes A3, A4 et ME, groupes faiblement transmis ou non présents lors de xénodiagnoses sur les rongeurs sauvages dans le travail de Pérez *et al.* (2011). En effet, seuls les groupes A4, à une fréquence de 4%, et ME, à une fréquence de 5%, ont été isolés après xénodiagnose pour le site 1 et seul le groupe A3, à une fréquence de 13%, a été détecté pour le site 2 (Pérez *et al.*, 2011). De plus, alors que le groupe A5 n'était pas infectieux en laboratoire, il n'a jamais été transmis par les rongeurs sauvages aux tiques de xénodiagnose, bien que ce groupe était détecté dans les tiques libres (Pérez *et al.*, 2011).

Le modèle de laboratoire Balb/c-*I. ricinus* utilisé ici paraît donc correspondre à la situation naturelle qui implique des mulots et des campagnols. Par contre, les dynamiques de transmission de l'isolat NE36 (A2) et de l'isolat NE4053 du groupe A1 en laboratoire ne correspondent pas aux observations de Pérez *et al.* (2011). Alors que dans notre étude toutes les souris (n=4) ont été infectées par l'isolat du groupe A2 et que ces souris ont transmis des spirochètes à 67.3% (35/52) des larves placées 30 jours après l'infection, ce groupe *ospC* n'a été retrouvé par xénodiagnose que chez des rongeurs capturés dans le site 2 et à une fréquence de 3% seulement par Pérez *et al.* (2011). L'isolat NE4053, appartenant au groupe *ospC* A1, n'a amené qu'à de faibles prévalences d'infection des souris en laboratoire, alors que le groupe A1 était prédominant dans les larves de xénodiagnose sur les rongeurs sauvages, sur les deux terrains d'étude de Pérez *et al.* (2011, 2012). Il est envisageable que le groupe A2, au

moment du travail de terrain de Pérez *et al.* (2011) était dans une phase de répression, si l'on se réfère à la théorie de sélection balançante appliquée au gène *ospC* (Brisson et Dykhuizen, 2006). Ceci expliquerait le fait qu'il n'ait été que peu fréquemment transmis aux tiques de xénodiagnose par les rongeurs sauvages, qui pouvaient être dans de nombreux cas immunisés contre ce groupe *ospC* grâce à une exposition antérieure, mais fortement transmis aux souris de laboratoires, puisqu'elles étaient naïves au moment de l'infection. Par contre, les différences observées avec l'isolat NE4053 du groupe A1 sont difficilement explicables au regard de cette sélection balançante. Comment un tel génotype peut-il survivre dans l'environnement, voyant sa faible dynamique de transmission en laboratoire et la forte représentation de son groupe *ospC* dans la nature? Puisque nous avons observé des dynamiques de transmission diamétralement opposées au sein d'un même groupe *ospC* (A1) en laboratoire, nous pensons soit que d'autres gènes doivent avoir un effet sur la dynamique de transmission de cet isolat, tels que *bbk32*, *bbe31* ou *bba64* cités plus haut, par exemple, soit que la sélection balançante s'applique à d'autres gènes permettant de lutter contre les défenses de l'hôte ou étant fortement immunogènes. Ce génotype ne serait donc pas favorisé chez les rongeurs, mais serait maintenu essentiellement par d'autres espèces, tel que l'écureuil, comme nous l'avons mentionné au travers de l'étude de Pérez *et al.* (2011) pour le groupe *ospC* A5.

La persistance de l'agent pathogène chez l'hôte pourrait aussi influencer la distribution des groupes *ospC* dans la nature. En effet, bien que certains spirochètes puissent perdurer pendant plusieurs années chez le mulot par exemple (Gern *et al.*, 1994), ces auteurs ayant observé qu'ils restaient infectieux pour les tiques jusqu'à 40 mois après leur capture, que les rongeurs sont continuellement infestés par des tiques (Burri *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2012) et qu'une infestation répétée stimule l'infectivité des rongeurs (Gern *et al.*, 1994), seuls 60% environ des mulots et campagnols sont infectés par *B. burgdorferi* si dans la nature (Pérez *et al.*, 2012). Dès lors, certains rongeurs doivent pouvoir éliminer leur infection au cours du temps, malgré une infestation continue. En se référant à nos résultats sur l'évolution de l'infectivité des souris pour les tiques au cours du temps, toutes les souris ont démontré une baisse de l'infectivité, venant confirmer les résultats de Donahue *et al.* (1987), qui ont observé une même diminution chez *P. leucopus*, infectés par *B. burgdorferi* ss (Donahue *et al.*, 1987).

Discussion

Toutefois, il apparaît que certains isolats induisent une diminution de l'infectivité plus rapide que d'autres. Ainsi, une baisse de près de 40% de l'infectivité de la souris infectée par E61 (A3) a été observée neuf mois après son infection, tandis qu'une baisse de seulement 23% a été observée pour la souris infectée par NE36 (A2), et ce 14 mois après l'inoculation de spirochètes. En tenant compte des observations faites par Humair *et al.* (1999), Burri *et al.* (2011) et Pérez *et al.* (2012), montrant que le nombre de larves et de nymphes infestant les rongeurs est très faible en hiver, il est envisageable que cette période soit suffisante pour l'élimination de certains isolats par les rongeurs. Dès lors, des isolats tel que E61 (A3), rapidement éliminé par la souris, pourraient être plus facilement perdus que d'autres, tel que NE36 (A2), toujours infectieux pour les tiques 14 mois après l'infection de l'hôte. Toutefois, le travail de Humair et collaborateurs (1999) semble montrer que les mulots et les campagnols infectés restent infectieux toute l'année, même en l'absence d'infestation. Ainsi, ces auteurs ont observé que tous les campagnols infectés (n=7) restaient infectieux pour les tiques durant l'hiver. Pour les mulots, il apparaît tout de même que 1/4 rongeurs, infectieux pour les tiques en janvier et février, ne l'était plus au mois de mars. Bien qu'il semblerait que la majorité des rongeurs conservent leur infection durant l'hiver selon cette étude, certains individus paraissent l'éliminer, ou du moins perdent leur infectiosité pour les tiques, durant les périodes où l'infestation moyenne est très faible (Humair *et al.*, 1999), ce qui corrobore nos résultats.

Comme nous l'avons écrit, Pérez et collègues (2011) ont aussi évalué la distribution des groupes *ospC* dans les tiques se nourrissant sur les rongeurs, ce qui implique une transmission de l'hôte à la tique, mais aussi par co-feeding cette fois. A nouveau, la distribution des groupes reflète les efficacités de transmission observées en laboratoire, à l'exception du groupe ME. Sur le site 1, le groupe ME était présent dans 56% des tiques nourries sur les rongeurs sauvages. Ce groupe semble donc être capable d'une bonne transmission par co-feeding, puisqu'il n'était que faiblement transmis lors de xénodiagnoses sur le même terrain, avec une fréquence de 5% seulement. Cette observation n'est pas en accord avec les corrélations entre l'infectivité des souris et la transmission par co-feeding observées en laboratoire, ni avec l'efficacité de transmission par co-feeding du groupe ME, puisque seules 7.7% (1/13) des tiques ont été infectées lorsqu'une telle transmission était observée, et que sur la totalité des essais, ce taux

n'atteint que 0.8% (1/130). Au vu des différences observées au sein du groupe A1, il est par contre tout-à-fait possible que l'isolat utilisé ici ne représente pas la majorité des souches arborant l'allèle *ospC* ME.

Bien que les résultats de cette étude reflètent la situation retrouvée dans la nature, il n'est pas possible de conclure que certains groupes *ospC* sont plus fortement transmis aux tiques et/ou aux hôtes que d'autres d'une manière globale, puisque ces résultats ont été obtenus pour une espèce d'hôte seulement. En se référant à une étude sur *I. scapularis* et *B. burgdorferi* ss (Hanincova *et al.*, 2008), qui a démontré que les dynamiques de transmission de deux isolats diffèrent entre les souris de laboratoire C3H et *P. leucopus*, un réservoir de la maladie de Lyme aux Etats-Unis, les résultats obtenus ici varieraient vraisemblablement avec d'autres espèce d'hôtes. Il y aurait donc une interaction intime entre le génotype de l'hôte et le génotype du pathogène, comme cela a déjà été décrit chez *Plasmodium falciparum* (Lambrechts *et al.*, 2005). Les auteurs de cette étude ont remarqué que la résistance des moustiques au plasmodium est fonction de la souche du pathogène, mais aussi du génome du moustique. Ainsi, l'exemple hypothétique d'une colonie de moustique A résistante à la souche de plasmodium A, sera sensible aux souches B et C, tandis que la famille B, résistante à l'isolat B, sera sensible aux autres, etc. Il semble par contre que les souris Balb/c soient un bon modèle de laboratoire en substitution aux mulots et campagnols. Finalement, ces résultats indiquent aussi qu'une évaluation de la distribution des groupes *ospC* dans la nature devrait tenir compte des variations locales des génotypes présents en plus de la diversité des réservoirs, puisqu'au sein d'une même espèce d'hôte, de fortes variations sont observées dans les efficacités de transmission de la tique à l'hôte, de l'hôte à la tique et de tique à tique.

4.8 Transformation de *B. afzelii* et microscopie confocale

La difficulté majeure rencontrée dans les transformations était sûrement liée à la quantité de plasmide ajoutée aux spirochètes compétents. Le protocole utilisé, provenant de Samuels *et al.* (1995) et modifié par Moriarty *et al.* (2008), indiquait que les électroporations devaient s'effectuer avec 50 µg de plasmide pour 50 µl de spirochètes compétents, soit une concentration de 1 µg/µl, ce qui est énorme. Cette

Discussion

concentration a régulièrement engendré des arcs électriques lors de l'électroporation, ce qui tue les spirochètes compétents (Samuels, 1995). Une plus faible concentration de plasmide aurait certes réduit le nombre d'individus transformés après électroporation (Samuels, 1995), mais aurait peut être permis d'obtenir au final plus d'essais positifs. Dans l'étude de Fingerle *et al.* (2007) d'ailleurs, seuls 10 à 20 µg de plasmide étaient utilisés par électroporation. Un autre problème concerne le plasmide lui-même. Alors que les résultats obtenus ici confirment ceux obtenus par Fingerle *et al.* (2007), à savoir que l'origine de répllication du cp9 de *B. burgdorferi* ss (utilisée dans pTM61 et dans le vecteur pBSV2 utilisé par Fingerle *et al.* (2007)) fonctionne bien chez *B. afzelii* (Fingerle *et al.*, 2007), la stabilité du plasmide ne semble pas être suffisante pour une observation de nymphes naturellement infectées, puisqu'aucun spirochète n'a pu être observé dans des nymphes infectées en tant que larves. Pour une telle observation, il nous a d'abord fallu obtenir une souris infectée par un isolat transformé, puis l'infester avec des larves. Nous avons ensuite dû attendre que ces larves muent pour une observation au microscope confocal. Ainsi, le temps passé sans pression de sélection exercée par un antibiotique, ici la gentamicine, était extrêmement long. En suivant les protocoles de cette recherche, il fallait attendre 30 jours après une injection sous-cutanée pour infester une souris. Puis 3-4 jours de gorgement, puis environ un mois pour la mue et finalement une à deux semaines avant dissection, pour que la cuticule soit assez rigide. Entre deux et trois mois s'écoulaient donc sans pression de sélection avant de pouvoir débiter les observations. Une idée serait de modifier un plasmide conservé déjà présent dans l'isolat ciblé, tel que cp27 chez *B. afzelii* (Dunham-Ems *et al.*, 2009), puisqu'il semble indispensable à la survie des spirochètes. Sans pression de sélection une fois inséré dans un système biologique, ce plasmide devrait donc tout de même persister et ainsi conserver une fluorescence sans antibiotique.

5 Conclusion et perspectives

Cette étude soulève de nombreuses questions concernant les mécanismes influençant la dynamique de transmission de l'agent de la maladie de Lyme par son vecteur. Les résultats obtenus démontrent que les dynamiques de transmission varient fortement entre isolats dans un modèle où l'hôte et le vecteur sont comparables, indiquant que des mécanismes intrinsèques à une population ont une forte influence sur les efficacités des différentes voies de transmission. Les corrélations observées laissent entrevoir qu'un groupe de gènes amenant à un certain phénotype influencerait la transmission des spirochètes dans son ensemble, mais que des mécanismes propres à la voie de transmission par co-feeding doivent aussi exister, puisqu'une présence et une absence de transmission par co-feeding pour certains isolats ont été observées, alors qu'une transmission hôte-tiques relativement élevée était observée pour le groupe A3 par exemple. La variabilité du gène *ospC* ne suffit donc pas à expliquer les différences observées dans les efficacités de transmission entre isolats. Cela implique aussi que la distribution des groupes *ospC* dans la nature est en partie dépendante des populations de spirochètes présentes, et qu'un comportement général d'un groupe *ospC* ne peut pas être estimé au niveau intraspécifique.

Afin de compléter cette étude et pour apporter quelques réponses, plusieurs expériences devraient être réalisées. Premièrement, il serait très intéressant d'étendre le séquençage de ces isolats à d'autres gènes, tels que *bbk32*, *bbe31* ou *bba64*, afin de voir si une corrélation entre la virulence et les différences génétiques au niveau de ces gènes peut être trouvée, surtout pour le groupe A1, puisque des différences importantes dans les efficacités de transmission ont été observées. Il serait aussi intéressant d'estimer la filiation des deux isolats de ce groupe par un typage génétique de type MLST, puisqu'ils n'ont pas été récoltés à la même période. Il faudrait aussi estimer les capacités de croissance de chaque isolat, qui pourraient influencer ces dynamiques, d'une part en culture, mais aussi dans la tique et dans la peau une fois injectés à l'hôte. La microscopie confocale pourrait d'ailleurs être un très bon outil pour cette estimation dans les tiques, et permettrait aussi d'évaluer les capacités d'infection systémique de chaque isolat. Pour la dissémination dans la peau, il est envisageable d'avoir une observation empirique de la rapidité de déplacement en plaçant successivement des larves à différentes distances du site d'inoculation par des nymphes infectées, comme cela a déjà été effectué (Richter *et al.*, 2002), mais pour les différents isolats caractérisés

Conclusion et perspectives

durant ce travail. Toutefois, nous venons de voir que des infestations successives peuvent stimuler l'infection et faire ensuite varier l'infectivité des hôtes, ce qui pourrait être contourné en utilisant une technique moléculaire quantitative telle que la qPCR. D'autre part, la question du co-feeding dans la perpétuation de la diversité génétique d'*ospC* devrait aussi être clarifiée pour permettre de mieux comprendre la dynamique de circulation de ces groupes dans la nature. Une expérience relativement aisée permettrait déjà de savoir si le co-feeding a vraiment un effet de maintien de la diversité génétique du gène *ospC* dans la nature au regard d'une sélection dépendante de la fréquence. En utilisant le système biologique mis au point pour cette recherche, il serait intéressant de tester l'efficacité du co-feeding sur des souris préalablement exposées à un groupe *ospC* donné. Il faudrait infecter des souris avec un isolat connu, traiter ces souris avec un antibiotique afin d'éradiquer les spirochètes une fois l'infection déclarée et après une production d'anticorps anti-OspC détectée, puis tester à nouveau la transmission par co-feeding selon le protocole décrit au chapitre 2.5.1. Si l'immunité de l'hôte influence la migration des spirochètes dans les glandes salivaires, comme supposé par l'étude Gilmore et collaborateurs (2000), une transmission par co-feeding devrait dans ce cas être inhibée ou fortement réduite. Si aucune différence n'est observée, le co-feeding pourrait contribuer fortement au maintien de la diversité observée. Pour éviter les doutes d'une persistance de spirochètes chez les souris après traitements, un transfert de sérum entre les souris infectées et des souris saines pourrait aussi être envisagé (Lise Gern, communication personnelle). Finalement, il serait aussi très intéressant d'observer le comportement de ces isolats lors d'infections mixtes, autant lors d'une transmission par co-feeding que sur la prévalence d'infection des hôtes et leurs infectivités. Comme il semblerait qu'il y ait interactions entre différentes souches lors d'infections mixtes (Derdakova *et al.*, 2004), de telles études représenteraient plus fidèlement la situation naturelle et permettraient de mieux comprendre la circulation de tous ces géotypes dans l'environnement.

6 Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon comité de thèse, composé du Dr Lise Gern, des professeurs Bruno Betschart et Peter-Allan Diehl de l'Université de Neuchâtel ainsi que du Dr Nathalie Boulanger, de l'Université de Strasbourg. Je vous remercie d'avoir bien voulu participer à cet examen.

Je remercie particulièrement le Dr Lise Gern, qui m'a permis d'effectuer cette recherche. Pour ta disponibilité, l'encadrement, les opportunités d'échanges lors de congrès et toutes ces discussions, autant scientifiques que diverses pendant les pauses café, je te remercie profondément.

Je remercie aussi le prof. Bruno Betschart pour sa confiance en moi dans l'enseignement des travaux pratiques et sa générosité sans limite.

A Séverine Monnier, qui a participé à cette recherche lors de son travail de master et au Dr Fransisca Morán Cadenas, pour les transformations, le soutien et toutes nos discussions.

A Michèle, pour la microscopie confocale.

A Alizée, Mégane et Christopher pour leur aide lors des coups de bourre.

Au Dr Moriarty, pour sa gentillesse et le matériel nécessaire aux transformations gracieusement offert.

A Pitou, l'homme de toute situation, toujours disponible et enclin à aider. Pour ses compétences tant dans les manipulations de tiques, de rongeurs, de spirochètes que dans l'œnologie.

A Caro, pour tous ces TP partagés, sa fraîcheur, ses encouragements et sa spontanéité. A Léonore et Coralie, avec qui la suite des TP furent une joie.

Un grand merci à tout le laboratoire de parasitologie, dont l'ambiance au laboratoire et en dehors transforme même les journées les plus noires en moments délicieux. A Marion pour la complicité. A LNA pour sa gentillesse. A Rodney pour les rires. Au Dr Vacuno, autant pour les côtés scientifiques qu'à côté du bar. A Mirko, l'homme du bush.

A Brigitte et Natacha, pour leur aide dévouée et ces somptueuses fêtes de Noël.

A toute ma famille, pour leur amour et leur soutien.

A tous mes amis, qui me supportent et qui contribuent à ce que je suis aujourd'hui.

A l'APAH, Ceza, Vacuna, Toby, Morale, le grand thermique. Longue vie à nos réunions.

A Laurent...

▮ Bibliographie

1. **Adam, T., G. S. Gassmann, C. Rasiah, U. B. Gobel**, Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect. Immun.* **59**, 2579 (1991).
2. **Aeschlimann, A.**, *Ixodes ricinus*, Linneus, 1758 (Ixodoidea: Ixodidae). Preliminary study of the biology of the species in Switzerland. *Acta Trop.* **29**, 321 (1972).
3. **Afzelius, A.**, Erythema chronicum migrans. *Acta Derm.-Venereol.* **2**, 120 (1921).
4. **Akane, A., K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, K. Kimura**, Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* **39**, 362 (1994).
5. **AL-Soud, W. A., P. Rådström**, Purification and Characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 485 (2001).
6. **Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, S. G. Rijpkema, L. M. Schouls**, Sexual transmission of *Borrelia garinii* by male *Ixodes persulcatus* ticks (*Acari, Ixodidae*). *Exp. Appl. Acarol.* **23**, 165 (1999).
7. **Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, I. Van De Pol, L. M. Schouls**, Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2237 (2001).
8. **Alghaferi, M. Y., J. M. Anderson, J. Park, P. G. Auwaerter, J. N. Aucott, D. E. Norris, J. S. Dumler**, *Borrelia burgdorferi ospC* heterogeneity among human and murine isolates from a defined region of northern Maryland and southern Pennsylvania: lack of correlation with invasive and noninvasive genotypes. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1879 (2005).
9. **Anderson, J. F.**, Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**, 23 (1991).
10. **Anguita, J., N. Ramamoorthi, J. W. Hovius, S. Das, V. Thomas, R. Persinski, D. Conze, P. W. Askenase, M. Rincon, F. S. Kantor, E. Fikrig**, Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* **16**, 849 (2002).
11. **Attie, O., J. F. Bruno, Y. Xu, D. Qiu, B. J. Luft, W. G. Qiu**, 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 (2007).
12. **Baranton, G., S. J. De Martino**, *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. *Curr. Probl. Dermatol.* **37**, 1 (2009).
13. **Baranton, G., D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J. C. Piffaretti, M. Assous, P. A. Grimont**, Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 378 (1992).
14. **Baranton, G., G. Seinost, G. Theodore, D. Postic, D. Dykhuizen**, Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. *Res. Microbiol.* **152**, 149 (2001).
15. **Barbour, A. G.**, Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* **57**, 521 (1984).
16. **Barbour, A. G.**, Antigenic variation of surface proteins of *Borrelia* species. *Rev. Infect. Dis.* **10 Suppl 2**, S399 (1988a).
17. **Barbour, A. G.**, Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 475 (1988b).
18. **Barbour, A. G., S. F. Hayes**, Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* **50**, 381 (1986).

Bibliographie

19. **Barbour, A. G., B. I. Restrepo**, Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 449 (2000).
20. **Barbour, A. G., S. L. Tessier, W. J. Todd**, Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **41**, 795 (1983).
21. **Barthold, S. W.**, Infectivity of *Borrelia burgdorferi* relative to route of inoculation and genotype in laboratory mice. *J. Infect. Dis.* **163**, 419 (1991).
22. **Barthold, S. W.**, Specificity of infection-induced immunity among *Borrelia burgdorferi* sensu lato species. *Infect. Immun.* **67**, 36 (1999).
23. **Barthold, S. W., E. Fikrig, L. K. Bockenstedt, D. H. Persing**, Circumvention of outer surface protein A immunity by host-adapted *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **63**, 2255 (1995).
24. **Barthold, S. W., D. H. Persing, A. L. Armstrong, R. A. Peeples**, Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am. J. Pathol.* **139**, 263 (1991).
25. **Bellet-Edimo, R., B. Betschart, L. Gern**, Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmission of *Borrelia Burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. *Bull. Soc. Neuchl. Sci. Nat.* **128**, 117 (2005).
26. **Benach, J. L., E. M. Bosler, J. P. Hanrahan, J. L. Coleman, G. S. Habicht, T. F. Bast, D. J. Cameron, J. L. Ziegler, A. G. Barbour, W. Burgdorfer, R. Edelman, R. A. Kaslow**, Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *New Engl. J. Med.* **308**, 740 (1983).
27. **Bergström, S., L. Noppa, A. Gylfe, Y. Östberg**, Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato., in *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*. J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek, Eds. (CABI Publishing, New York, 2002), pp. 47-89.
28. **Binder, E., R. Doepfmer, O. Hornstein**, Experimental transmission of chronic *erythema migrans* from man to man. *Hautarzt* **6**, 494 (1955).
29. **Bockenstedt, L. K., E. Hodzic, S. Feng, K. W. Bourrel, A. de Silva, R. R. Montgomery, E. Fikrig, J. D. Radolf, S. W. Barthold**, *Borrelia burgdorferi* strain-specific OspC-mediated immunity in mice. *Infect. Immun.* **65**, 4661 (1997).
30. **Boerlin, P., O. Peter, A. G. Bretz, D. Postic, G. Baranton, J. C. Piffaretti**, Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect. Immun.* **60**, 1677 (1992).
31. **Bouattour, A., A. Ghorbel, A. Chabchoub, D. Postic**, Lyme borreliosis situation in North Africa. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* **81**, 13 (2004).
32. **Brisson, D., D. E. Dykhuizen**, *ospC* diversity in *Borrelia burgdorferi*: different hosts are different niches. *Genetics* **168**, 713 (2004).
33. **Brisson, D., D. E. Dykhuizen**, A modest model explains the distribution and abundance of *Borrelia burgdorferi* strains. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 615 (2006).
34. **Broadwater, A. H., D. E. Sonenshine, W. L. Hynes, S. Ceraul, S. A. De**, Glass capillary tube feeding: a method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Entomol.* **39**, 285 (2002).
35. **Brossard, M., S. K. Wikel**, Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med. Vet. Entomol.* **11**, 270 (1997).
36. **Buitrago, S., T. E. Martin, J. Tetens-Woodring, A. Belicha-Villanueva, G. E. Wilding**, Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **47**, 11 (2008).

37. **Bunikis, J., U. Garpmo, J. Tsao, J. Berglund, D. Fish, A. G. Barbour**, Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology* **150**, 1741 (2004).
38. **Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, J. P. Davis**, Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**, 1317 (1982).
39. **Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, O. Peter, A. Aeschlimann**, *Erythema chronicum migrans* - a tickborne spirochetosis. *Acta Trop.* **40**, 79 (1983).
40. **Burri, C., V. Bastic, G. Maeder, E. Patalas, L. Gern**, Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland. *J. Med. Entomol.* **48**, 615 (2011).
41. **Byram, R., P. E. Stewart, P. Rosa**, The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**, 3561 (2004).
42. **Caimano, M.**, The Genus *Borrelia*, in *The Prokaryotes*. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, Eds. (Springer New York, 2006), pp. 235-293.
43. **Caimano, M. J., X. Yang, T. G. Popova, M. L. Clawson, D. R. Akins, M. V. Norgard, J. D. Radolf**, Molecular and evolutionary characterization of the cp32/18 family of supercoiled plasmids in *Borrelia burgdorferi* 297. *Infect. Immun.* **68**, 1574 (2000).
44. **Carroll, J. A., C. F. Garon, T. G. Schwan**, Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **67**, 3181 (1999).
45. **Casjens, S., N. Palmer, R. van Vugt, W. M. Huang, B. Stevenson, P. Rosa, R. Lathigra, G. Sutton, J. Peterson, R. J. Dodson, D. Haft, E. Hickey, M. Gwinn, O. White, C. M. Fraser**, A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490 (2000).
46. **Casjens, S., R. van Vugt, K. Tilly, P. A. Rosa, B. Stevenson**, Homology throughout the multiple 32-kilobase circular plasmids present in Lyme disease spirochetes. *J. Bacteriol.* **179**, 217 (1997).
47. **Casjens, S. R., C. M. Fraser-Liggett, E. F. Mongodin, W. G. Qiu, J. J. Dunn, B. J. Luft, S. E. Schutzer**, Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J. Bacteriol.* **193**, 1489 (2011a).
48. **Casjens, S. R., E. F. Mongodin, W. G. Qiu, J. J. Dunn, B. J. Luft, C. M. Fraser-Liggett, S. E. Schutzer**, Whole-genome sequences of two *Borrelia afzelii* and two *Borrelia garinii* Lyme disease agent isolates. *J. Bacteriol.* **193**, 6995 (2011b).
49. **Casjens, S. R., E. F. Mongodin, W. G. Qiu, B. J. Luft, S. E. Schutzer, E. B. Gilcrease, W. M. Huang, M. Vujadinovic, J. K. Aron, L. C. Vargas, S. Freeman, D. Radune, J. F. Weidman, G. I. Dimitrov, H. M. Khouri, J. E. Sosa, R. A. Halpin, J. J. Dunn, C. M. Fraser**, Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *PloS One* **7**, e33280 (2012).
50. **Chu, C. Y., W. Liu, B. G. Jiang, D. M. Wang, W. J. Jiang, Q. M. Zhao, P. H. Zhang, Z. X. Wang, G. P. Tang, H. Yang, W. C. Cao**, A novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3130 (2008).
51. **Cluss, R. G., J. T. Boothby**, Thermoregulation of protein synthesis in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **58**, 1038 (1990).
52. **Coleman, J. L., J. A. Gebbia, J. Piesman, J. L. Degen, T. H. Bugge, J. L. Benach**, Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* **89**, 1111 (1997).

Bibliographie

53. **Cotte, V., S. Bonnet, M. Cote, M. Vayssier-Taussat**, Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**, 723 (2010).
54. **Crippa, M.**, Evolution de *B. burgdorferi* s.l, agent de la borréliose de Lyme dans la tique *I. ricinus* et étude de sa transmission à l'hôte. Doctoral thesis, Université de Neuchâtel (2003). 123.
55. **Crippa, M., O. Rais, L. Gern**, Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2**, 3 (2002).
56. **Crother, T. R., C. I. Champion, J. P. Whitelegge, R. Aguilera, X. Y. Wu, D. R. Blanco, J. N. Miller, M. A. Lovett**, Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin. *Infect. Immun.* **72**, 5063 (2004).
57. **de Franchis, R., N. C. Cross, N. S. Foulkes, T. M. Cox**, A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10355 (1988).
58. **De Silva, A. M., E. Fikrig**, Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 397 (1995).
59. **De Silva, A. M., D. Fish, T. R. Burkot, Y. Zhang, E. Fikrig**, OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks. *Infect. Immun.* **65**, 3146 (1997).
60. **Demaerschalck, I., A. Ben Messaoud, M. De Kesel, B. Hoyois, Y. Lobet, P. Hoet, G. Bigaignon, A. Bollen, E. Godfroid**, Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 602 (1995).
61. **Derdakova, M., V. Dudioak, B. Brei, J. S. Brownstein, I. Schwartz, D. Fish**, Interaction and transmission of two *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in a tick-rodent maintenance system. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6783 (2004).
62. **Dolan, M. C., J. Piesman, B. S. Schneider, M. Schriefer, K. Brandt, N. S. Zeidner**, Comparison of disseminated and nondisseminated strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in mice naturally infected by tick bite. *Infect. Immun.* **72**, 5262 (2004).
63. **Donahue, J. G., J. Piesman, A. Spielman**, Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**, 92 (1987).
64. **Dunham-Ems, S. M., M. J. Caimano, U. Pal, C. W. Wolgemuth, C. H. Eggers, A. Balic, J. D. Radolf**, Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *J. Clin. Invest.* **119**, 3652 (2009).
65. **Dykhuisen, D. E., D. Brisson, S. Sandigursky, G. P. Wormser, J. Nowakowski, R. B. Nadelman, I. Schwartz**, The propensity of different *Borrelia burgdorferi* sensu stricto genotypes to cause disseminated infections in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **78**, 806 (2008).
66. **Earnhart, C. G., E. L. Buckles, J. S. Dumler, R. T. Marconi**, 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 (2005).
67. **Earnhart, C. G., R. T. Marconi**, An octavalent lyme disease vaccine induces antibodies that recognize all incorporated OspC type-specific sequences. *Hum. vaccines* **3**, 281 (2007).
68. **Eggers, C. H., B. J. Kimmel, J. L. Bono, A. F. Elias, P. Rosa, D. S. Samuels**, Transduction by phiBB-1, a bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **183**, 4771 (2001).

69. **Eicken, C., V. Sharma, T. Klabunde, R. T. Owens, D. S. Pikas, M. Hook, J. C. Sacchettini**, Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* **276**, 10010 (2001).
70. **Eisen, L., R. S. Lane**, Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, in *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*. J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek, Eds. (CABI Publishing, New York, 2002), pp. 91-114.
71. **Evison, J., C. Aebi, P. Francioli, O. Peter, S. Bassetti, A. Gervaix, S. Zimmerli, R. Weber**, Lyme disease Part 2: clinic and treatment. *Rev. Med. Suisse* **2**, 925 (2006a).
72. **Evison, J., C. Aebi, P. Francioli, O. Peter, S. Bassetti, A. Gervaix, S. Zimmerli, R. Weber**, Lyme disease Part I: epidemiology and diagnosis. *Rev. Med. Suisse* **2**, 919 (2006b).
73. **Fikrig, E., U. Pal, M. Chen, J. F. Anderson, R. A. Flavell**, OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infect. Immun.* **72**, 1755 (2004).
74. **Fingerle, V., G. Goettner, L. Gern, B. Wilske, U. Schulte-Spechtel**, Complementation of a *Borrelia afzelii* OspC mutant highlights the crucial role of OspC for dissemination of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 97 (2007).
75. **Fingerle, V., U. Hauser, G. Liegl, B. Petko, V. Preac-Mursic, B. Wilske**, Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1867 (1995).
76. **Fingerle, V., S. Rauser, B. Hammer, O. Kahl, C. Heimerl, U. Schulte-Spechtel, L. Gern, B. Wilske**, Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1456 (2002).
77. **Fingerle, V., U. C. Schulte-Spechtel, E. Ruzic-Sabljić, S. Leonhard, H. Hofmann, K. Weber, K. Pfister, F. Strle, B. Wilske**, Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 279 (2008).
78. **Francischetti, I. M., A. Sa-Nunes, B. J. Mans, I. M. Santos, J. M. Ribeiro**, The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* **14**, 2051 (2009).
79. **Franta, Z., H. Frantova, J. Konvickova, M. Horn, D. Sojka, M. Mares, P. Kopacek**, Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites Vectors* **3**, 119 (2010).
80. **Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Wathley, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuji, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith, J. C. Venter**, Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**, 580 (1997).
81. **Frischknecht, F.**, The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell. Microbiol.* **9**, 1630 (2007).
82. **Fukunaga, M., A. Hamase**, Outer surface protein C gene sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Japan. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2415 (1995).

Bibliographie

83. **Gaertner, D. J., T. M. Hallman, F. C. Hankenson, M. A. Batchelder**, Anesthesia and Analgesia for Laboratory Rodents, in *Anesth. Analg. Lab. Anim.* R. Fish, P. Danneman, M. Brown, A. Karas, Eds. (2008), pp. 239-297.
84. **Gern, L., A. Estrada-Pena, F. Frandsen, J. S. Gray, T. G. Jaenson, F. Jongejan, O. Kahl, E. Korenberg, R. Mehl, P. A. Nuttall**, European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl. Bakteriolog.* **287**, 196 (1998a).
85. **Gern, L., A. Estrada-pena, F. Frandsen, J. S. Gray, T. G. T. Jaenson, F. Jongejan, O. Kahl, E. Korenberg, R. Mrhl, P. A. Nuttall**, European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentbl.Bakt.* **287**, 196 (1998b).
86. **Gern, L., P. F. Humair**, Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe., in *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control.* J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek, Eds. (CABI Publishing, New York, 2002), pp. 149-174.
87. **Gern, L., N. Lebet, J. Moret**, Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. *Exp. Appl. Acarol.* **20**, 649 (1996).
88. **Gern, L., F. Moran Cadenas, C. Burri**, Influence of some climatic factors on *Ixodes ricinus* ticks studied along altitudinal gradients in two geographic regions in Switzerland. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 55 (2008).
89. **Gern, L., O. Rais**, Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodidae*). *J. Med. Entomol.* **33**, 189 (1996).
90. **Gern, L., U. E. Schaible, M. M. Simon**, Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses in inbred strains of mice. *J. Infect. Dis.* **167**, 971 (1993).
91. **Gern, L., M. Siegenthaler, C. M. Hu, S. Leuba-Garcia, P. F. Humair, J. Moret**, *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur. J. Epidemiol.* **10**, 75 (1994).
92. **Gern, L., Z. Zhu, A. Aeschlimann**, Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 89 (1990).
93. **Gigon, F.**, Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le plateau Suisse-Une contribution à l'écologie de ce vecteur-. Université de Neuchâtel (1985). 239.
94. **Gilmore, R. D., Jr., R. M. Bacon, A. M. Carpio, J. Piesman, M. C. Dolan, M. L. Mbow**, Inability of outer-surface protein C (OspC)-primed mice to elicit a protective anamnestic immune response to a tick-transmitted challenge of *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Microbiol.* **52**, 551 (2003).
95. **Gilmore, R. D., Jr., R. R. Howison, G. Dietrich, T. G. Patton, D. R. Clifton, J. A. Carroll**, The *bba64* gene of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent, is critical for mammalian infection via tick bite transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7515 (2010).
96. **Gilmore, R. D., Jr., K. J. Kappel, M. C. Dolan, T. R. Burkot, B. J. Johnson**, Outer surface protein C (OspC), but not P39, is a protective immunogen against a tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* challenge: evidence for a conformational protective epitope in OspC. *Infect. Immun.* **64**, 2234 (1996).
97. **Gilmore, R. D., Jr., J. Piesman**, Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. *Infect. Immun.* **68**, 411 (2000).
98. **Glöckner, G., R. Lehmann, A. Romualdi, S. Pradella, U. Schulte-Spechtel, M. Schilhabel, B. Wilske, J. Suhnel, M. Platzer**, Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res.* **32**, 6038 (2004).
99. **Glöckner, G., U. Schulte-Spechtel, M. Schilhabel, M. Felder, J. Suhnel, B. Wilske, M. Platzer**, Comparative genome analysis: selection pressure on the *Borrelia* vls cassettes is essential for infectivity. *BMC Genomics* **7**, 211 (2006).

100. **Goettner, G., L. Gern, U. Schulte-Spechtel, B. Wilske, V. Fingerle**, OspC of *Borrelia 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.* **296**, 122 (2006).
101. **Golde, W. T., K. J. Kappel, G. Dequesne, C. Feron, D. Plainchamp, C. Capiou, Y. Lobet**, Tick transmission of *Borrelia burgdorferi* to inbred strains of mice induces an antibody response to P39 but not to outer surface protein A. *Infect. Immun.* **62**, 2625 (1994).
102. **Gray, J. S.**, The biology of *Ixodes* ticks, with special reference to *Ixodes ricinus*. Paper presented at the Current Research on Tick-Borne Infections, Kalmar, Sweden, 2001.
103. **Greenberg, E. P., E. Canale-Parola**, Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *J. Bacteriol.* **132**, 356 (1977a).
104. **Greenberg, E. P., E. Canale-Parola**, Relationship between cell coiling and motility of spirochetes in viscous environments. *J. Bacteriol.* **131**, 960 (1977b).
105. **Grimm, D., K. Tilly, R. Byram, P. E. Stewart, J. G. Krum, D. M. Bueschel, T. G. Schwan, P. F. Policastro, A. F. Elias, P. A. Rosa**, Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3142 (2004).
106. **Güner, E. S., N. Hashimoto, N. Takada, K. Kaneda, Y. Imai, T. Masuzawa**, First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J. Med. Microbiol.* **52**, 807 (2003).
107. **Gylfe, B. Olsen, D. Strasevicius, N. Marti Ras, P. Weihe, L. Noppa, Y. Ostberg, G. Baranton, S. Bergstrom**, Isolation of Lyme disease *Borrelia* from puffins (*Fratercula arctica*) and seabird ticks (*Ixodes uriae*) on the Faeroe Islands. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 890 (1999).
108. **Haake, D. A.**, Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* **146 (Pt 7)**, 1491 (2000).
109. **Hajnicka, V., P. Kocakova, M. Slavikova, M. Slovak, J. Gasperik, N. Fuchsberger, P. A. Nuttall**, Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite immunol.* **23**, 483 (2001).
110. **Hanincova, K., N. H. Ogden, M. Diuk-Wasser, C. J. Pappas, R. Iyer, D. Fish, I. Schwartz, K. Kurtenbach**, Fitness variation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 153 (2008).
111. **Hannier, S., J. Liversidge, J. M. Sternberg, A. S. Bowman**, Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology* **113**, 401 (2004).
112. **Hansmann, Y.**, Treatment and prevention of Lyme disease. *Curr. Probl. Dermatol.* **37**, 111 (2009).
113. **Hefty, P. S., S. E. Jolliff, M. J. Caimano, S. K. Wikel, J. D. Radolf, D. R. Akins**, Regulation of OspE-related, OspF-related, and Elp lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* strain 297 by mammalian host-specific signals. *Infect. Immun.* **69**, 3618 (2001).
114. **Hellwage, J., T. Meri, T. Heikkila, A. Alitalo, J. Panelius, P. Lahdenne, I. J. Seppala, S. Meri**, The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8427 (2001).
115. **Herrmann, C., L. Gern**, Survival of *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *J. Med. Entomol.* **47**, 1196 (2010).

Bibliographie

116. Herzberger, P., C. Siegel, C. Skerka, V. Fingerle, U. Schulte-Spechtel, A. van Dam, B. Wilske, V. Brade, P. F. Zipfel, R. Wallich, P. Kraiczy, Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *Infect. Immun.* **75**, 4817 (2007).
117. Hinnebusch, J., A. G. Barbour, Linear- and circular-plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **174**, 5251 (1992).
118. Hodzic, E., S. Feng, K. J. Freet, S. W. Barthold, *Borrelia burgdorferi* population dynamics and prototype gene expression during infection of immunocompetent and immunodeficient mice. *Infect. Immun.* **71**, 5042 (2003).
119. Hofmeister, E. K., J. E. Childs, Ear biopsy location influences detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR, but not by culture in naturally infected *Peromyscus leucopus*. *J. Wildl. Dis.* **31**, 345 (1995).
120. Horka, H., K. Cerna-Kyckova, A. Skalova, J. Kopecky, Tick saliva affects both proliferation and distribution of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 373 (2009).
121. Hovius, J. W., T. J. Schuijt, K. A. de Groot, J. J. Roelofs, G. A. Oei, J. A. Marquart, R. de Beer, C. van 't Veer, T. van der Poll, N. Ramamoorthi, E. Fikrig, A. P. van Dam, Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J. Infect. Dis.* **198**, 1189 (2008).
122. Hovius, J. W., A. P. van Dam, E. Fikrig, Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends Parasitol.* **23**, 434 (2007).
123. Hu, C. M., Y. Cheminade, J. L. Perret, V. Weynants, Y. Lobet, L. Gern, Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 421 (2003).
124. Hubalek, Z., Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* **37**, 31 (2009).
125. Huegli, D., J. Moret, O. Rais, Y. Moosmann, P. Erard, R. Malinverni, L. Gern, Prospective study on the incidence of infection by *Borrelia burgdorferi* sensu lato after a tick bite in a highly endemic area of Switzerland. *Ticks Tick Borne Dis.* **2**, 129 (2011).
126. Humair, P. F., L. Gern, Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop.* **69**, 213 (1997).
127. Humair, P. F., O. Rais, L. Gern, Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* **118 (Pt 1)**, 33 (1999).
128. Hyde, F. W., R. C. Johnson, Genetic relationship of lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira* spp. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 151 (1984).
129. Jacot, S., Etude des gènes exprimés au cours du repas sanguin dans l'intestin de la tique *Ixodes ricinus*. Doctoral thesis, Université de Neuchâtel (2003). 104.
130. Jauris-Heipke, S., G. Liegl, V. Preac-Mursic, D. Rossler, E. Schwab, E. Soutschek, G. Will, B. Wilske, Molecular analysis of genes encoding outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: relationship to *ospA* genotype and evidence of lateral gene exchange of *ospC*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1860 (1995).
131. Johnson, R. C., G. P. Schmidt, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt, J. Don, *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **Oct. 1984**, 496 (1984).

132. **Jouda, F., J. L. Perret, L. Gern**, Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **4**, 23 (2004a).
133. **Jouda, F., J. L. Perret, L. Gern**, *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J. Med. Entomol.* **41**, 162 (2004b).
134. **Kahl, O., C. Janetzki-Mittmann, J. S. Gray, R. Jonas, J. Stein, R. de Boer**, Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralbl. Bakteriol.* **287**, 41 (1998).
135. **Kempf, F., T. De Meeus, E. Vaumourin, V. Noel, V. Taragel'ova, O. Plantard, D. J. Heylen, C. Eraud, C. Chevillon, K. D. McCoy**, Host races in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme borreliosis. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 2043 (2011).
136. **Kern, A., E. Collin, C. Barthel, C. Michel, B. Jaulhac, N. Boulanger**, Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of Lyme disease. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**, 1343 (2011).
137. **Kimsey, R. B., A. Spielman**, Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* **162**, 1205 (1990).
138. **Kirstein, F., S. Rijpkema, M. Molkenboer, J. S. Gray**, Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1102 (1997).
139. **Kozuch, O., S. P. Chunikhin, M. Gresikova, J. Nosek, V. B. Kurenkov, J. Lysy**, Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents. *Acta virologica* **25**, 219 (1981).
140. **Kraiczy, P., C. Skerka, V. Brade, P. F. Zipfel**, Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **69**, 7800 (2001).
141. **Kudryashev, M., M. Cyrklaff, B. Alex, L. Lemgruber, W. Baumeister, R. Wallich, F. Frischknecht**, Evidence of direct cell-cell fusion in *Borrelia* by cryogenic electron tomography. *Cell. Microbiol.* **13**, 731 (2011).
142. **Kudryashev, M., M. Cyrklaff, W. Baumeister, M. M. Simon, R. Wallich, F. Frischknecht**, Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. *Mol. Microbiol.* **71**, 1415 (2009).
143. **Kumaran, D., S. Eswaramoorthy, B. J. Luft, S. Koide, J. J. Dunn, C. L. Lawson, S. Swaminathan**, Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *EMBO J.* **20**, 971 (2001).
144. **Kurtenbach, K., S. De Michelis, S. Etti, S. M. Schafer, H. S. Sewell, V. Brade, P. Kraiczy**, Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-the key role of host complement. *Trends Microbiol.* **10**, 74 (2002).
145. **Kurtenbach, K., K. Hanincova, J. I. Tsao, G. Margos, D. Fish, N. H. Ogden**, Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 660 (2006).
146. **Kurtenbach, K., H. S. Sewell, N. H. Ogden, S. E. Randolph, P. A. Nuttall**, Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect. Immun.* **66**, 1248 (1998).
147. **Labuda, M., V. Danielova, L. D. Jones, P. A. Nuttall**, Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med. Vet. Entomol.* **7**, 339 (1993).

Bibliographie

148. **Labuda, M., O. Kozuch, E. Zuffova, E. Eleckova, R. S. Hails, P. A. Nuttall**, Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* **235**, 138 (1997).
149. **Lagal, V., D. Portnoi, G. Faure, D. Postic, G. Baranton**, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect.* **8**, 645 (2006).
150. **Lagal, V., D. Postic, G. Baranton**, Molecular diversity of the *ospC* gene in *Borrelia*. Impact on phylogeny, epidemiology and pathology. *Wien. Klin. Wochenschr.* **114**, 562 (2002).
151. **Lagal, V., D. Postic, E. Ruzic-Sabljić, G. Baranton**, 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 (2003).
152. **Lambrechts, L., J. Halbert, P. Durand, L. C. Gouagna, J. C. Koella**, Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **4**, 3 (2005).
153. **Lebet, N., L. Gern**, Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp. Appl. Acarol.* **18**, 177 (1994).
154. **Leboulle, G., C. Rochez, J. Louahed, B. Ruti, M. Brossard, A. Bollen, E. Godfroid**, Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**, 225 (2002).
155. **Leuba-Garcia, S., M. D. Kramer, R. Wallich, L. Gern**, Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* **280**, 468 (1994).
156. **Leuba-Garcia, S., R. Martinez, L. Gern**, Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and in the skin of mice. *Zentralbl. Bakteriol.* **287**, 475 (1998).
157. **Li, X., X. Liu, D. S. Beck, F. S. Kantor, E. Fikrig**, *Borrelia burgdorferi* lacking BBK32, a fibronectin-binding protein, retains full pathogenicity. *Infect. Immun.* **74**, 3305 (2006).
158. **Li, X., G. Neelakanta, X. Liu, D. S. Beck, F. S. Kantor, D. Fish, J. F. Anderson, E. Fikrig**, Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infect. Immun.* **75**, 4237 (2007).
159. **Liang, F. T., F. K. Nelson, E. Fikrig**, Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *J. Exp. Med.* **196**, 275 (2002).
160. **Lima, C. M., N. S. Zeidner, C. B. Beard, C. A. Soares, M. C. Dolan, G. Dietrich, J. Piesman**, Differential infectivity of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* derived from *Ixodes scapularis* salivary glands and midgut. *J. Med. Entomol.* **42**, 506 (2005).
161. **Lin, T., J. H. Oliver, Jr., L. Gao**, 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 (2002).
162. **Lindsay, L. R., I. K. Barker, G. A. Surgeoner, S. A. McEwen, G. D. Campbell**, Duration of *Borrelia burgdorferi* infectivity in white-footed mice for the tick vector *Ixodes scapularis* under laboratory and field conditions in Ontario. *J. Wildl. Dis.* **33**, 766 (1997).
163. **Lipschütz, B.**, Über eine seltene Erythemform (*Erythema chronicum migrans*). *Arch. Dermatol. Syph.* **118**, 349 (1913).

164. **Livey, I., C. P. Gibbs, R. Schuster, F. Dorner**, Evidence for lateral transfer and recombination in OspC variation in Lyme disease *Borrelia*. *Mol. Microbiol.* **18**, 257 (1995).
165. **Marchal, C., F. Schramm, A. Kern, B. J. Luft, X. Yang, T. J. Schuijt, J. W. Hovius, B. Jaulhac, N. Boulanger**, Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. *Infect. Immun.* **79**, 774 (2011).
166. **Marchal, C. M., B. J. Luft, X. Yang, J. Sibia, B. Jaulhac, N. M. Boulanger**, Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the in vitro interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2515 (2009).
167. **Marconi, R. T., C. F. Garon**, Identification of a third genomic group of *Borrelia burgdorferi* through signature nucleotide analysis and 16S rRNA sequence determination. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 533 (1992).
168. **Margos, G., A. Hojgaard, R. S. Lane, M. Cornet, V. Fingerle, N. Rudenko, N. Ogden, D. M. Aanensen, D. Fish, J. Piesman**, Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**, 151 (2010).
169. **Margos, G., S. A. Vollmer, M. Cornet, M. Garnier, V. Fingerle, B. Wilske, A. Bormane, L. Vitorino, M. Collares-Pereira, M. Drancourt, K. Kurtenbach**, A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5410 (2009).
170. **Marti Ras, N., D. Postic, M. Foretz, G. Baranton**, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species "made in the U.S.A."? *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1112 (1997).
171. **Masuzawa, T.**, Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 229 (2004).
172. **Masuzawa, T., Y. Beppu, H. Kawabata, Y. Yanagihara, Y. Iwamoto, T. Shimizu, R. C. Johnson**, Experimental *Borrelia burgdorferi* infection of outbred mice. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3016 (1992).
173. **Matuschka, F. R., P. Fischer, K. Musgrave, D. Richter, A. Spielman**, Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 100 (1991).
174. **Mikkilä, H. O., I. J. Seppala, M. K. Viljanen, M. P. Peltomaa, A. Karma**, The expanding clinical spectrum of ocular Lyme borreliosis. *Ophthalmology* **107**, 581 (2000).
175. **Moody, K. D., S. W. Barthold**, Relative infectivity of *Borrelia burgdorferi* in Lewis rats by various routes of inoculation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 135 (1991).
176. **Morán Cadenas, F., O. Rais, P. Humair, V. Douet, J. Moret, L. Gern**, Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J. Med. Entomol.* **44**, 1109 (2007a).
177. **Morán Cadenas, F., O. Rais, F. Jouda, V. Douet, P. F. Humair, J. Moret, L. Gern**, Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J. Med. Entomol.* **44**, 683 (2007b).
178. **Morán Cadenas, F., H. Schneider, E. Lommano, C. Burri, J. Moret, L. Gern**, A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**, 555 (2007c).
179. **Moriarty, T. J., M. U. Norman, P. Colarusso, T. Bankhead, P. Kubes, G. Chaconas**, Real-time high resolution 3D imaging of the Lyme disease spirochete

Bibliographie

- adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathog.* **4**, e1000090 (2008).
180. **Narasimhan, S., B. Sukumaran, U. Bozdogan, V. Thomas, X. Liang, K. DePonte, N. Marcantonio, R. A. Koski, J. F. Anderson, F. Kantor, E. Fikrig**, A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host Microbe* **2**, 7 (2007).
181. **Neelakanta, G., X. Li, U. Pal, X. Liu, D. S. Beck, K. DePonte, D. Fish, F. S. Kantor, E. Fikrig**, Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes ticks*. *PLoS Pathog.* **3**, e33 (2007).
182. **Nilsson, A., L. Lundqvist**, Host Selection and Movements of *Ixodes Ricinus* (Acari) Larvae on Small Mammals. *Oikos* **31**, 313 (1978).
183. **Norris, S. J., J. K. Howell, S. A. Garza, M. S. Ferdows, A. G. Barbour**, High- and low-infectivity phenotypes of clonal populations of in vitro-cultured *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **63**, 2206 (1995).
184. **Nouredine, R., A. Chauvin, O. Plantard**, Lack of genetic structure among Eurasian populations of the tick *Ixodes ricinus* contrasts with marked divergence from north-African populations. *Int. J. Parasitol.* **41**, 183 (2011).
185. **Ogden, N. H., L. R. Lindsay, M. Morshed, P. N. Sockett, H. Artsob**, "The rising challenge of Lyme borreliosis in Canada" *1481-8531 (Electronic) 1188-4169 (Linking)* (2008a).
186. **Ogden, N. H., G. Margos, D. M. Aanensen, M. A. Drebot, E. J. Feil, K. Hanincova, I. Schwartz, S. Tyler, L. R. Lindsay**, Investigation of genotypes of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks collected in surveillance in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, (2011).
187. **Ogden, N. H., P. A. Nuttall, S. E. Randolph**, Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitology* **115 (Pt 6)**, 591 (1997).
188. **Ogden, N. H., L. St-Onge, I. K. Barker, S. Brazeau, M. Bigras-Poulin, D. F. Charron, C. M. Francis, A. Heagy, L. R. Lindsay, A. Maarouf, P. Michel, F. Milord, C. J. O'Callaghan, L. Trudel, R. A. Thompson**, Risk maps for range expansion of the Lyme disease vector, *Ixodes scapularis*, in Canada now and with climate change. *Int. J. Health Geogr.* **7**, 24 (2008b).
189. **Ohnishi, J., J. Piesman, A. M. de Silva**, Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 670 (2001).
190. **Ojaimi, C., C. Brooks, S. Casjens, P. Rosa, A. Elias, A. Barbour, A. Jasinskas, J. Benach, L. Katona, J. Radolf, M. Caimano, J. Skare, K. Swingle, D. Akins, I. Schwartz**, Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect. Immun.* **71**, 1689 (2003).
191. **Oliver, J. H., Jr., Z. Al-Ahmadi, R. L. Osburn**, Reproduction in ticks (*Acari: Ixodoidea*). 3. Copulation in *Dermacentor occidentalis* Marx and *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard) (*Ixodidae*). *J. Parasitol.* **60**, 499 (1974).
192. **Oliver, J. H., Jr., T. Lin, L. Gao, K. L. Clark, C. W. Banks, L. A. Durden, A. M. James, F. W. Chandler, Jr.**, An enzootic transmission cycle of Lyme borreliosis spirochetes in the southeastern United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11642 (2003).
193. **Olsen, B., D. C. Duffy, T. G. Jaenson, A. Gylfe, J. Bonnedahl, S. Bergstrom**, Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 3270 (1995).
194. **Olsen, B., T. G. Jaenson, L. Noppa, J. Bunikis, S. Bergstrom**, A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* **362**, 340 (1993).

195. **Pagès, J.-M.**, Role of Bacterial Porins in Antibiotic Susceptibility of Gram-Negative Bacteria, in *Bacterial and Eukaryotic Porins: Structure, Function, Mechanism*. R. Benz, Ed. (Wiley-VCH, 2005), pp. 41-60.
196. **Pal, U., A. M. de Silva, R. R. Montgomery, D. Fish, J. Anguita, J. F. Anderson, Y. Lobet, E. Fikrig**, Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J. Clin. Invest.* **106**, 561 (2000).
197. **Pal, U., X. Li, T. Wang, R. R. Montgomery, N. Ramamoorthi, A. M. Desilva, F. Bao, X. Yang, M. Pypaert, D. Pradhan, F. S. Kantor, S. Telford, J. F. Anderson, E. Fikrig**, TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* **119**, 457 (2004a).
198. **Pal, U., X. Yang, M. Chen, L. K. Bockenstedt, J. F. Anderson, R. A. Flavell, M. V. Norgard, E. Fikrig**, OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest.* **113**, 220 (2004b).
199. **Patton, T. G., G. Dietrich, M. C. Dolan, J. Piesman, J. A. Carroll, R. D. Gilmore, Jr.**, Functional analysis of the *Borrelia burgdorferi* bba64 gene product in murine infection via tick infestation. *PLoS One* **6**, e19536 (2011a).
200. **Patton, T. G., G. Dietrich, R. D. Gilmore, Jr.**, Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in tick feces provides evidence for organism shedding during vector feeding. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**, 197 (2011b).
201. **Pérez, D., Y. Kneubuhler, O. Rais, L. Gern**, 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 Zoonotic Dis.*, (2012).
202. **Pérez, D., Y. Kneubuhler, O. Rais, F. Jouda, L. Gern**, *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. *Ticks Tick Borne Dis.* **2**, 137 (2011).
203. **Perret, J. L., E. Guigoz, O. Rais, L. Gern**, Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.* **86**, 554 (2000).
204. **Piesman, J.**, Experimental acquisition of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) during partial blood meals. *J. Med. Entomol.* **28**, 259 (1991).
205. **Piesman, J.**, Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J. Infect. Dis.* **167**, 1082 (1993).
206. **Piesman, J., J. G. Donahue, T. N. Mather, A. Spielman**, Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field-collected larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **23**, 219 (1986).
207. **Piesman, J., L. Gern**, Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* **129 Suppl**, S191 (2004).
208. **Piesman, J., T. N. Mather, R. J. Sinsky, A. Spielman**, Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 557 (1987).
209. **Piesman, J., G. O. Maupin, E. G. Campos, C. M. Happ**, Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J. Infect. Dis.* **163**, 895 (1991).
210. **Piesman, J., J. R. Oliver, R. J. Sinsky**, Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**, 352 (1990).
211. **Pivarsci, A., L. Kemeny, A. Dobozy**, Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **51**, 303 (2004).

Bibliographie

212. **Postic, D., C. Edlinger, C. Richaud, F. Grimont, Y. Dufresne, P. Perolat, G. Baranton, P. A. Grimont**, Two genomic species in *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.* **141**, 465 (1990).
213. **Postic, D., E. Korenberg, N. Gorelova, Y. V. Kovalevski, E. Bellenger, G. Baranton**, *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res. Microbiol.* **148**, 691 (1997).
214. **Preac-Mursic, V., B. Wilske, E. Patsouris, S. Jauris, G. Will, E. Soutschek, S. Rainhardt, G. Lehnert, U. Klockmann, P. Mehraein**, Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. *Infection* **20**, 342 (1992).
215. **Preac-Mursic, V., B. Wilske, G. Schierz**, European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl. Bakteriol.* **263**, 112 (1986).
216. **Probert, W. S., M. Crawford, R. B. Cadiz, R. B. LeFebvre**, Immunization with outer surface protein (Osp) A, but not OspC, provides cross-protection of mice challenged with North American isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* **175**, 400 (1997).
217. **Probert, W. S., B. J. Johnson**, Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Mol. Microbiol.* **30**, 1003 (1998).
218. **Probert, W. S., J. H. Kim, M. Hook, B. J. Johnson**, Mapping the ligand-binding region of *Borrelia burgdorferi* fibronectin-binding protein BBK32. *Infect. Immun.* **69**, 4129 (2001).
219. **Purser, J. E., S. J. Norris**, Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13865 (2000).
220. **Qiu, W. G., S. E. Schutzer, J. F. Bruno, O. Attie, Y. Xu, J. J. Dunn, C. M. Fraser, S. R. Casjens, B. J. Luft**, Genetic exchange and plasmid transfers in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto revealed by three-way genome comparisons and multilocus sequence typing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14150 (2004).
221. **Radolf, J. D., M. J. Caimano**, The long strange trip of *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein C. *Mol. Microbiol.* **69**, 1 (2008).
222. **Ramamoorthi, N., S. Narasimhan, U. Pal, F. Bao, X. F. Yang, D. Fish, J. Anguita, M. V. Norgard, F. S. Kantor, J. F. Anderson, R. A. Koski, E. Fikrig**, The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* **436**, 573 (2005).
223. **Randolph, S. E.**, Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* **129 Suppl**, S37 (2004).
224. **Randolph, S. E.**, Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis.* **2**, 179 (2011).
225. **Randolph, S. E., L. Gern, P. A. Nuttall**, Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. today* **12**, 472 (1996).
226. **Randolph, S. E., D. Miklisova, J. Lysy, D. J. Rogers, M. Labuda**, Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology* **118 (Pt 2)**, 177 (1999).
227. **Raska, M., M. Sebestova, E. Weigl**. (Palacky University, Olomouc, 2005).
228. **Rauter, C., T. Hartung**, Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7203 (2005).
229. **Ribeiro, J. M., T. N. Mather, J. Piesman, A. Spielman**, Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (*Acari: Ixodidae*). *J. Med. Entomol.* **24**, 201 (1987).

230. **Richter, D., R. Allgower, F. R. Matuschka**, Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1421 (2002).
231. **Rijpkema, S., H. Bruinink**, Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR in questing *Ixodes ricinus* larvae from the Dutch North Sea island of Ameland. *Exp. Appl. Acarol.* **20**, 381 (1996).
232. **Roehrig, J. T., J. Piesman, A. R. Hunt, M. G. Keen, C. M. Happ, B. J. Johnson**, The hamster immune response to tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* differs from the response to needle-inoculated, cultured organisms. *J. immunol.* **149**, 3648 (1992).
233. **Rudenko, N., M. Golovchenko, L. Grubhoffer, J. H. Oliver, Jr.**, *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 (2011).
234. **Rudenko, N., M. Golovchenko, T. Lin, L. Gao, L. Grubhoffer, J. H. Oliver, Jr.**, Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3875 (2009).
235. **Rudolf, I., S. Sikutova, J. Kopecky, Z. Hubalek**, Salivary gland extract from engorged *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) stimulates in vitro growth of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. basic Microbiol.* **50**, 294 (2010).
236. **Samuels, D. S.**, Electrotransformation of the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Methods Mol. Biol.* **47**, 253 (1995).
237. **Sarih, M., F. Jouda, L. Gern, D. Postic**, First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **3**, 133 (2003).
238. **Sauer, J. R., J. L. McSwain, A. S. Bowman, R. C. Essenberg**, Tick salivary gland physiology. *Annu. Rev. Entomol.* **40**, 245 (1995).
239. **Schouls, L. M., I. Van De Pol, S. G. Rijpkema, C. S. Schot**, Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2215 (1999).
240. **Schuijt, T. J., J. W. Hovius, N. D. van Burgel, N. Ramamoorthi, E. Fikrig, A. P. van Dam**, The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infect. Immun.* **76**, 2888 (2008).
241. **Schulte-Spechtel, U., V. Fingerle, G. Goettner, S. Rogge, B. Wilske**, Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains with impact for the development of serological assays and indicates lateral gene transfer of the dbpA gene. *Int. J. Med. Microbiol.* **296 Suppl 40**, 250 (2006).
242. **Schutzer, S. E., C. M. Fraser-Liggett, S. R. Casjens, W. G. Qiu, J. J. Dunn, E. F. Mongodin, B. J. Luft**, Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **193**, 1018 (2011).
243. **Schwan, T. G.**, Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 108 (2003).
244. **Schwan, T. G., J. Piesman**, Temporal changes in outer surface proteins A and C of the lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 382 (2000).
245. **Schwan, T. G., J. Piesman, W. T. Golde, M. C. Dolan, P. A. Rosa**, Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2909 (1995).
246. **Schwartz, I., S. Varde, R. B. Nadelman, G. P. Wormser, D. Fish**, Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**, 339 (1997).

Bibliographie

247. **Seemanapalli, S. V., Q. Xu, K. McShan, F. T. Liang**, Outer surface protein C is a dissemination-facilitating factor of *Borrelia burgdorferi* during mammalian infection. *PLoS One* **5**, e15830 (2010).
248. **Seinost, G., D. E. Dykhuizen, R. J. Dattwyler, W. T. Golde, J. J. Dunn, I. N. Wang, G. P. Wormser, M. E. Schriefer, B. J. Luft**, Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. *Infect. Immun.* **67**, 3518 (1999a).
249. **Seinost, G., W. T. Golde, B. W. Berger, J. J. Dunn, D. Qiu, D. S. Dunkin, D. E. Dykhuizen, B. J. Luft, R. J. Dattwyler**, Infection with multiple strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in patients with Lyme disease. *AMA Arch. Dermatol.* **135**, 1329 (1999b).
250. **Shih, C. M., L. L. Chao, C. P. Yu**, Chemotactic migration of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) to salivary gland extracts of vector ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**, 616 (2002).
251. **Shih, C. M., A. Spielman**, Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2878 (1993).
252. **Singh, S. K., H. J. Girschick**, Toll-like receptors in *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 705 (2006).
253. **Sinsky, R. J., J. Piesman**, Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1723 (1989).
254. **Skalova, A., G. Iezzi, F. Ampenberger, M. Kopf, J. Kopecky**, Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *J. Immunol.* **180**, 6186 (2008).
255. **Smith, R. P., Jr., S. B. Muzaffar, J. Lavers, E. H. Lacombe, B. K. Cahill, C. B. Lubelczyk, A. Kinsler, A. J. Mathers, P. W. Rand**, *Borrelia garinii* in seabird ticks (*Ixodes uriae*), Atlantic Coast, North America. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1909 (2006).
256. **Sonck, C. E.**, *Erythema chronicum migrans* with multiple lesions. *Acta Derm.-Venereol.* **45**, 34 (1965).
257. **Stanek, G., M. Reiter**, The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 487 (2011).
258. **Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, F. M. Steele**, Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum.* **20**, 7 (1977).
259. **Stevenson, B., N. El-Hage, M. A. Hines, J. C. Miller, K. Babb**, 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 (2002).
260. **Stevenson, B., J. C. Miller**, Intra- and interbacterial genetic exchange of Lyme disease spirochete erp genes generates sequence identity amidst diversity. *J. Mol. Evol.* **57**, 309 (2003).
261. **Stewart, P. E., R. Byram, D. Grimm, K. Tilly, P. A. Rosa**, The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* **53**, 1 (2005).
262. **Strle, F., G. Stanek**, Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* **37**, 51 (2009).
263. **Strle, K., K. L. Jones, E. E. Drouin, X. Li, A. C. Steere**, *Borrelia burgdorferi* RST1 (OspC type A) genotype is associated with greater inflammation and more severe Lyme disease. *Am. J. Pathol.* **178**, 2726 (2011).
264. **Theisen, M., M. Borre, M. J. Mathiesen, B. Mikkelsen, A. M. Lebech, K. Hansen**, Evolution of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein OspC. *J. Bacteriol.* **177**, 3036 (1995).

265. **Theisen, M., B. Frederiksen, A. M. Lebech, J. Vuust, K. Hansen**, Polymorphism in *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2570 (1993).
266. **Tilly, K., A. Bestor, D. P. Dulebohn, P. A. Rosa**, OspC-independent infection and dissemination by host-adapted *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **77**, 2672 (2009).
267. **Tilly, K., J. G. Krum, A. Bestor, M. W. Jewett, D. Grimm, D. Bueschel, R. Byram, D. Dorward, M. J. Vanraden, P. Stewart, P. Rosa**, *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect. Immun.* **74**, 3554 (2006).
268. **Tourand, Y., T. Bankhead, S. L. Wilson, A. D. Putteet-Driver, A. G. Barbour, R. Byram, P. A. Rosa, G. Chaconas**, Differential telomere processing by *Borrelia* telomere resolvases *in vitro* but not *in vivo*. *J. Bacteriol.* **188**, 7378 (2006).
269. **van Dam, A. P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. de Jongh, L. Spanjaard, A. C. Ramselaar, M. D. Kramer, J. Dankert**, Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 708 (1993).
270. **Vor, T., C. Kiffner, P. Hagedorn, M. Niedrig, F. Ruhe**, Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp. Appl. Acarol.* **51**, 405 (2010).
271. **Wang, G., C. Ojaimi, R. Iyer, V. Saksenberg, S. A. McClain, G. P. Wormser, I. Schwartz**, Impact of genotypic variation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto on kinetics of dissemination and severity of disease in C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* **69**, 4303 (2001).
272. **Wang, G., C. Ojaimi, H. Wu, V. Saksenberg, R. Iyer, D. Liveris, S. A. McClain, G. P. Wormser, I. Schwartz**, 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 (2002).
273. **Wang, G., A. P. van Dam, J. Dankert**, Evidence for frequent *ospC* gene transfer between *Borrelia valaisiana* sp. nov. and other Lyme disease spirochetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 289 (1999a).
274. **Wang, G., A. P. van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, J. Dankert**, Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 926 (1997).
275. **Wang, I. N., D. E. Dykhuizen, W. Qiu, J. J. Dunn, E. M. Bosler, B. J. Luft**, Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Genetics* **151**, 15 (1999b).
276. **Wilske, B., U. Busch, V. Fingerle, S. Jauris-Heipke, V. Preac Mursic, D. Rossler, G. Will**, Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* **24**, 208 (1996).
277. **Wormser, G. P., D. Brisson, D. Liveris, K. Hanincova, S. Sandigursky, J. Nowakowski, R. B. Nadelman, S. Ludin, I. Schwartz**, *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **198**, 1358 (2008).
278. **Xu, Q., K. McShan, F. T. Liang**, Essential protective role attributed to the surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* against innate defences. *Mol. Microbiol.* **69**, 15 (2008a).
279. **Xu, Q., K. McShan, F. T. Liang**, Modification of *Borrelia burgdorferi* to overproduce OspA or VlsE alters its infectious behaviour. *Microbiology* **154**, 3420 (2008b).

Bibliographie

280. **Xu, Y., R. C. Johnson**, Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2679 (1995).
281. **Xu, Y., C. Kodner, L. Coleman, R. C. Johnson**, Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infect. Immun.* **64**, 3870 (1996).
282. **Younsi, H., D. Postic, G. Baranton, A. Bouattour**, High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *Eur. J. Epidemiol.* **17**, 53 (2001).
283. **Younsi, H., M. Sarih, F. Jouda, E. Godfroid, L. Gern, A. Bouattour, G. Baranton, D. Postic**, Characterization of *Borrelia lusitaniae* isolates collected in Tunisia and Morocco. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1587 (2005).
284. **Zeidner, N. S., B. S. Schneider, M. C. Dolan, J. Piesman**, An analysis of spirochete load, strain, and pathology in a model of tick-transmitted Lyme borreliosis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **1**, 35 (2001).
285. **Zeidner, N. S., B. S. Schneider, M. S. Nuncio, L. Gern, J. Piesman**, Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and ticks species-specific. *J. Parasitol.* **88**, 1276 (2002).
286. **Zhang, L., Y. Zhang, S. Adusumilli, L. Liu, S. Narasimhan, J. Dai, Y. O. Zhao, E. Fikrig**, Molecular interactions that enable movement of the Lyme disease agent from the tick gut into the hemolymph. *PLoS Pathog.* **7**, e1002079 (2011).
287. **Zhu, Z.**, Contribution à l'étude de la transmission de la borreliose de Lyme en Europe. Doctoral thesis, Université de Perpignan (1991).
288. **Zhu, Z.**, *Borrelia burgdorferi* in replete nymphal *Ixodes ricinus*: a localization study using light and electron microscopy. *Acarologia* **34**, 123 (1998a).
289. **Zhu, Z.**, Histological observations on *Borrelia burgdorferi* growth in naturally infected female *Ixodes ricinus*. *Acarologia* **39**, 11 (1998b).
290. **Zhu, Z., L. Gern, A. Aeschlimann**, Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* during blood meal. *Rev. Suisse Zool.* **97**, 784 (1990).
291. **Zhu, Z., L. Gern, A. Aeschlimann**, *Borrelia burgdorferi* in naturally infected female *Ixodes ricinus*. Paper presented at the First Int. Conf. Tick-Borne Path. Host-Vect. Interf., Minnesota, St.Paul, 1992a.
292. **Zhu, Z., L. Gern, A. Aeschlimann**, Localization of *Borrelia burgdorferi* in molting *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) nymphs. Paper presented at the 5th Int Conf Lyme Borreliosis, Arlington, Va, 1992b.

B **Résumé**

La protéine de surface C (OspC) de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) est impliquée dans de nombreux mécanismes participant à la dissémination de l'agent pathogène chez son hôte. La grande diversité du gène *ospC* a permis une classification des différents allèles en groupes, laissant apparaître un lien entre l'invasivité de la bactérie chez l'Homme et les différents groupes *ospC*.

Sachant que le gène *ospC* est aussi impliqué dans la dissémination des spirochètes chez la tique, nous avons étudié la dynamique de transmission des spirochètes de la tique à l'hôte et vice-versa en fonction de leur appartenance à un groupe *ospC*. Nous avons donc évalué la dynamique de transmission de *B. afzelii* par *Ixodes ricinus* après infection expérimentale et naturelle pour des isolats appartenant aux groupes invasifs A1, A2, A3, A4, A5 et aux groupes indéfinis ME et YU. L'efficacité de transmission de la tique à l'hôte, de l'hôte à la tique, mais aussi de tique à tique lors du co-feeding a ainsi été évaluée pour chaque isolat.

Tous les groupes *ospC* ont été infectieux pour les souris et/ou les tiques après injection sous-cutanée et/ou via des tiques infectées. Par contre, aucune transmission par co-feeding n'a été observée pour les génotypes A3 et A4, ce qui laisse supposer une composante génétique propre à cette voie de transmission. Des différences importantes dans la dynamique de transmission ont été observées entre les infections expérimentales et naturelles. La voie d'inoculation des spirochètes est donc un facteur influençant fortement la dynamique de transmission.

Finalement, le temps de repas sanguin nécessaire pour qu'il y ait transmission de spirochètes de la l'hôte à la tique, et inversement, a aussi été évalué. Un repas sanguin de 6 heures seulement a été suffisant pour observer une transmission de spirochètes de l'hôte à la tique, avec une infectivité des souris pour les tiques augmentant avec la durée de repas sanguin. Pour la situation inverse, seules les souris infestées pendant 24 heures et plus ont déclaré des infections systémiques. Toutefois, placer des tiques 24 heures à 37°C avant infestation des souris a permis une transmission après seulement 12 heures de repas sanguin.

Des différences significatives dans la dynamique de transmission ont été observées autant entre génotypes qu'au sein d'un même génotype, laissant supposer que le gène *ospC* seul n'est pas responsable des différences d'efficacité de transmission observées au niveau intra spécifique. Il ne semble donc pas possible d'évaluer

Résumé

correctement les risques encourus par l'Homme de développer une maladie de Lyme invasive en se basant uniquement sur la distribution des différents *ospC* dans la nature.

Mots clés : *ospC*, dynamique de transmission, efficacité de transmission, *Borrelia afzelii*, système biologique, *Ixodes ricinus*, groupes invasifs, prévalence d'infection, infectivité, transmission par co-feeding, PCR, microscopie confocale.

Borrelia burgdorferi sensu lato (sl) outer surface protein C (OspC) is involved in numerous crucial mechanisms during the life cycle of the pathogen, influencing its dissemination in the vector and in the host. The genetic diversity at the *ospC* locus has led to a classification into groups of alleles. While there is a linkage between invasiveness in human and the different *ospC* genotypes, many interrogations remain on how the host-vector-host dynamic of transmission is influenced by those genotypes, which could have an impact on their distribution in nature.

We therefore investigated the transmission dynamics of *B. afzelii* isolates belonging to invasive genotypes A1, A2, A3, A4, A5 and to undefined groups ME and YU, using a laboratory-based system including Balb/c mice and *Ixodes ricinus* ticks with experimental or tick infections. The efficiency of transmission from infected mice to ticks and from infected ticks to mice was evaluated for each isolate as well as the efficiency of co-feeding transmission between infected nymphs and uninfected larvae feeding on uninfected mice.

Each *ospC* group was infectious for mice and/or ticks after experimental and/or natural infections. On the other hand, no co-feeding transmission occurred for *ospC* groups A3 and A4, which suggests a genetic component unique to this transmission pathway. Important differences in the transmission efficiencies were observed between experimental and natural infections. Inoculation route therefore greatly influences the transmission dynamic of spirochetes.

Finally, delays in the transmission of *B. afzelii* from mice to tick and from tick to mice were also evaluated. Host to tick transmission was observed as soon as six hours after tick attachment. Transmission to ticks was enhanced with the duration of the blood meal. For the tick to host transmission delay, mice were infected after being challenged for 24 hours with infectious ticks. Incubating infectious ticks 24 hours at 37°C shortened the delay to only 12 hours of blood meal.

Significant differences in the tick to host, host to tick and co-feeding transmissions were observed among and within *B. afzelii ospC* groups, suggesting that *B. afzelii ospC* gene alone is not responsible for variations in the efficiency of host-vector-host dynamic of transmission at the intra specific level. Evaluating risks of infection with an invasive form of the Lyme disease agent based on the distribution of those genotypes in nature seems therefore not relevant.

Résumé

Key words : *ospC*, transmission dynamic, transmission efficiency, *Borrelia afzelii*, biological system, *Ixodes ricinus*, invasive groups, prevalence of infection, infectivity, co-feeding transmission, PCR, confocal microscopy.

Annexes

9.1 Régions variables du gène *ospC*



En rouge, la région variable V1; en jaune la région semi-variable SV; en vert la région variable V2 (N. Tonetti).

9.2 Système expérimental hôte-vecteur-pathogène

L'obtention de tiques infectées par repas sanguin infectieux nécessite d'avoir des souris infectées et infectieuses. Deux techniques sont utilisées à ces fins. Une infection de tiques par capillaires, suivi de l'infestation de souris saines (technique des capillaires) ou une injection sous-cutanées de cultures de borrelies à des souris, suivie d'une infestation par des tiques saines (technique de l'injection sous-cutanée). Toutes les souris utilisées lors de ces expériences sont des Balb/c mâles, âgées de 12 semaines environ.

Infection des souris

Jour 0: Anesthésie de l'animal et pose de la capsule.

1. Injecter 0.03-0.045ml (1.5µl/gramme) du mélange xylazine-kétamine dans le péritoine.
2. Raser une partie du dos de la souris pour pouvoir y poser la capsule.
3. Enduire le pourtour de la capsule avec la cire chaude et l'apposer sur la partie rasée.
4. Sceller tout le tour de la capsule avec la même cire en utilisant une seringue.
5. Préparer un morceau de ruban adhésif avec un bout de papier buvard au centre pour boucher le trou.
6. Ajouter les nymphes préalablement infectées par capillaire*.

Jour 2: Anesthésie de l'animal et ajout de 100 larves environ.

1. Anesthésier la souris.
2. Enlever le ruban adhésif et vérifier que les nymphes soient fixées.
3. Ajouter 100 larves environ puis refermer la capsule avec le ruban adhésif.

Jours 2-3: Retrait du ruban adhésif obstruant l'ouverture de la capsule

1. Anesthésier la souris (facultatif).
2. Enlever le ruban adhésif et sortir les éventuelles tiques déjà détachées.

Jours 5-8: Récolte des nymphes et des larves gorgées

1. Récolter les tiques gorgées dans le bac d'eau.
2. Les placer 20 minutes dans une boîte de Petri contenant un papier buvard.
3. Mettre les tiques dans un tube en verre avec quelques mues, lui même placé dans une boîte contenant de l'eau pour l'humidité.

Jour 30: Contrôle de l'infection des souris par biopsie et xénodiagnose

1. Anesthésier la souris.
2. Désinfecter l'oreille avec de l'alcool à 70% ainsi que les ciseaux et la pince.
3. Découper la partie distale de l'oreille afin d'obtenir environ 2 mm² de tissus et le placer directement dans le milieu de culture.
4. Placer le tube dans une étuve à 34 °C en vérifiant que la biopsie coule au fond du tube.
5. Infestation de la souris avec 100 larves.

Jours 37-45: Détection de borréliés dans les milieux de culture

1. La présence de borréliés est vérifiée au microscope à fond noir à 500X.
2. 2^{ème} biopsie si le résultat de la première est négatif.

technique de l'injection sous-cutanée :

Jour 0: Anesthésie de l'animal, injection sous-cutanée et infestation.

1. Anesthésier la souris.
2. injecter 0.2ml de culture contenant de 1 à 5x10⁷ borréliés.
3. Ajouter une centaine larves afin de stimuler l'infection.

Jour 30: Contrôle de l'infection des souris par biopsie et xénodiagnose

1. Anesthésier la souris.
2. Désinfecter l'oreille avec de l'alcool à 70% ainsi que les ciseaux et la pince.
3. Découper la partie distale de l'oreille afin d'obtenir environ 2 mm² de tissus et le placer directement dans le milieu de culture.
4. Placer le tube dans une étuve à 34 °C en vérifiant que la biopsie coule au fond du tube.
5. Infestation de la souris avec 100 larves.

Jours 37-45: Détection de borréliés dans les milieux de culture

1. La présence de borréliés est vérifiée au microscope à fond noir à 500X.
2. 2^{ème} biopsie si le résultat de la première est négatif.

Annexes

Ces deux techniques permettent donc d'obtenir des nymphes infectées. Celles-ci sont utilisées pour l'infestation d'autres souris selon les conditions décrites au paragraphe *Infection des souris* en remplaçant les nymphes infectées par capillaires par les nymphes obtenues après l'une ou l'autre de ces manipulations (*).

9.3 Résultats bruts lors d'infection naturelle

Groupe <i>ospC</i>	Isolat	Souris	Nb. de nymphes utilisées	Txi. nymphes	Provenance	Co-feeding	Co-feeding Zème		Biopsie		Infectivité	Prévalence
							1	2	1	2		
A1	NE4053	1	11	38.5 (5/13)	x	15.4 (2/13)	ne	0	1	0 (0/13)	1	
		2	7	46.2 (6/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	7.7 (1/13)	1	
		3	20	15.4 (2/13)	c	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		4	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		5	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		6	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		7	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
A2	NE5046	1	4	84.6 (11/13)	x	46.2 (6/13)	ne	1	ne	84.6 (11/13)	1	
		2	4	84.6 (11/13)	x	23.1 (3/13)	ne	1	ne	84.6 (11/13)	1	
		3	4	84.6 (11/13)	x	23.1 (3/13)	ne	1	ne	100 (13/13)	1	
		4	4	84.6 (11/13)	x	38.5 (5/13)	ne	1	ne	100 (13/13)	1	
A3	NE36	1	5	69.2 (9/13)	x	0 (0/13)	ne	1	ne	76.9 (10/13)	1	
		2	5	69.2 (9/13)	x	7.7 (1/13)	ne	1	ne	46.2 (6/13)	1	
		3	5	69.2 (9/13)	x	0 (0/13)	ne	1	ne	76.9 (10/13)	1	
		4	5	69.2 (9/13)	x	53.8 (7/13)	ne	1	ne	69.2 (9/13)	1	
A4	P/sto	1	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	0	1	84.6 (11/13)	1	
		2	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		3	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	1	ne	61.5 (8/13)	1	
		4	13	23.1 (3/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	15.4 (2/13)	1	
A5	NE4046	1	6	53.8 (7/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	15.4 (2/13)	1	
		2	6	53.8 (7/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	15.4 (2/13)	1	
		3	6	53.8 (7/13)	x	0 (0/13)	ne	1	ne	23.1 (3/13)	1	
		4	6	53.8 (7/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	7.7 (1/13)	1	
YU	NE4049	1	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		2	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		3	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
		4	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0	
YU	NE4049	1	13	23.1 (3/13)	c	ne	ne	1	0	69.2 (9/13)	1	
		2	6	69.2 (9/13)	x	38.5 (5/13)	30.8 (4/13)	1	0	84.6 (11/13)	1	
		3	6	69.2 (9/13)	x	61.5 (8/13)	46.2 (6/13)	0	1	76.9 (10/13)	1	
		4	6	69.2 (9/13)	x	92.3 (12/13)	53.8 (7/13)	0	1	92.3 (12/13)	1	

5	6	69.2 (9/13)	x	100 (13/13)	ne	1	0	69.2 (9/13)	1
6	4	76.9 (10/13)	x	30.8 (4/13)	69.2 (9/13)	1	ne	100 (13/13)	1
7	4	76.9 (10/13)	x	76.9 (10/13)	69.2 (9/13)	1	ne	92.3 (12/13)	1
8	4	76.9 (10/13)	x	84.6 (11/13)	69.2 (9/13)	1	1	84.6 (11/13)	1
9	4	76.9 (10/13)	x	92.3 (12/13)	76.9 (10/13)	1	ne	100 (13/13)	1
1	16	69.2 (9/13)	c	92.3 (12/13)	ne	0	0	100 (13/13)	1
2	10	46.2 (6/13)	x	38.5 (5/13)	ne	0	1	84.6 (11/13)	1
3	3	100 (13/13)	x	7.7 (1/13)	7.7 (1/13)	1	ne	76.9 (10/13)	1
4	3	100 (13/13)	x	15.4 (2/13)	38.5 (5/13)	0	1	69.2 (9/13)	1
5	3	100 (13/13)	x	15.4 (2/13)	0 (0/13)	0	1	36.4 (4/11)	1
6	3	100 (13/13)	x	46.2 (6/13)	ne	0	0	0 (0/13)	0
7	4	76.9 (10/13)	x	69.2 (9/13)	84.6 (11/13)	ne	1	69.2 (9/13)	1
8	4	76.9 (10/13)	x	46.2 (6/13)	30.8 (4/13)	ne	1	61.5 (8/13)	1
9	4	76.9 (10/13)	x	84.6 (11/13)	100 (13/13)	ne	1	76.9 (10/13)	1
10	4	76.9 (10/13)	x	46.2 (6/13)	69.2 (9/13)	ne	1	53.8 (7/13)	1
1	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0
2	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0
3	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0
4	4	84.6 (11/13)	x	7.7 (1/13)	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0
5	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0
6	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0
7	4	84.6 (11/13)	x	0 (0/13)	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0
8	7	46.2 (6/13)	x	0 (0/13)	ne	0	0	7.7 (1/13)	1
9	7	46.2 (6/13)	x	0 (0/13)	ne	1	ne	76.9 (10/13)	1
10	7	46.2 (6/13)	x	0 (0/13)	ne	ne	ne	ne	ne
11	7	46.2 (6/13)	x	0 (0/13)	ne	ne	0	7.7 (1/13)	1

x= Nymphes infectées lors d'un repas sanguin infectieux; c= Nymphes infectées par co-feeding; ne= Non effectué

9.4 Résultats bruts lors d'injection sous-cutanée

Groupe <i>ospC</i>	Isolat	Souris	Infection	Txi larves j.0	Biopsies		Txi larves j.30	Prévalence	
					1	2			
A1	NE4053	1	sc	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0	
		2	sc	0 (0/13)	0	0	23.1 (3/13)	1	
		3	sc	7.7 (1/13)	0	0	0 (0/13)	0	
		4	sc	0 (0/13)	0	1	0 (0/13)	1	
	NE4997	1	sc	23.1 (3/13)	1	ne	84.6 (11/13)	1	
		2	sc	0 (0/13)	1	ne	61.5 (8/13)	1	
	NE5022	1	sc	0 (0/13)	1	ne	ne	1	
		2	sc	7.7 (1/13)	0	0	0 (0/13)	0	
	NE5046	1	sc	7.7 (1/13)	0	1	84.6 (11/13)	1	
		2	sc	23.1 (3/13)	0	1	76.9 (10/13)	1	
	A2	NE36	1	sc	0 (0/13)	1	ne	23.1 (3/13)	1
			2	sc	7.7 (1/13)	1	ne	69.2 (9/13)	1
A3	E61	1	sc	0 (0/13)	1	ne	15.4 (2/13)	1	
		2	sc	0 (0/13)	1	ne	23.1 (3/13)	1	
A4	P/sto	1	sc	46.2 (6/13)	1	ne	53.8 (7/13)	1	
		2	sc	0 (0/13)	1	ne	61.5 (8/13)	1	
	Simon	1	sc	7.7 (1/13)	0	0	0 (0/13)	0	
		2	sc	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0	
A5	NE4046	1	sc	7.7 (1/13)	0	0	76.9 (10/13)	1	
		2	sc	0 (0/13)	0	0	84.6 (11/13)	1	
	NE4047	1	sc	0 (0/13)	0	0	7.7 (1/13)	1	
		2	sc	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0	
		3	sc	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0	
		4	sc	7.7 (1/13)	0	0	15.4 (2/13)	1	
	NE5023	1	sc	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0	
		2	sc	0 (0/13)	0	0	0 (0/13)	0	
ME	NE4054	1	sc	7.7 (1/13)	1	ne	84.6 (11/13)	1	
		2	sc	15.4 (2/13)	0	1	61.5 (8/13)	1	

sc= Injection sous-cutané; ne= Non effectué.