

ÉCOLE DOCTORALE Vie et santé
EA 7290 Virulence bactérienne précoce

THÈSE présentée par :

Valérie GOLDSTEIN

soutenue le : **06 décembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Microbiologie

Epidémiologie vectorielle de la borréliose de Lyme en France

THÈSE dirigée par :

Monsieur JAULHAC Benoît
Madame BOULANGER Nathalie

Professeur, Université de Strasbourg
Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur VOORDOUW Marteen
Monsieur BOUE Franck

Docteur, Université de Neuchâtel
Docteur, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame CHIROUZE Catherine
Monsieur SAULEAU Erik

Professeur, Université de Bourgogne- Franche Comté
Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

A mes encadrants,

Monsieur le Professeur Jaulhac,
Je vous remercie pour m'avoir aidé à me hisser plus loin dans mes studieux efforts et de m'avoir soutenue.

Madame le Docteur Nathalie Boulanger,
Je vous remercie pour vos conseils. Ils me serviront pour la suite de mon travail.

Aux membres du jury et rapporteurs,

Je tiens à remercier les membres de mon jury,

Madame le Professeur Catherine Chirouze,
Merci à vous de participer à l'examen de mon travail de thèse.

Monsieur le Professeur Erik-André Sauleau,
Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Maarten Voordouw,
Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Franck Boué,
Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Aux membres du comité de thèse

Madame le Docteur Karen Mc Coy, merci à vous d'avoir contribué à l'avancée de ce projet.

A toutes les personnes qui ont participé à ce travail,

A toute l'équipe: Laurence Zilliox, Danièle Napolitano, Sylvie de Martino et à l'ensemble des étudiants du CNR *Borrelia* je vous remercie pour votre soutien, votre aide et pour les fous rires.

Je remercie aussi Dominique Schwartz, Damien Ertlen, Jean-Claude George et Elisabeth Ferquel pour leur contribution à ce travail.

A ceux que j'ai pu côtoyer,

Je remercie l'ensemble de l'équipe de l'EA 7290: Elody, Cathy, Gilles, Daniel, François Jehl, Thierry Lavigne, Antoine, Quentin, Frédéric, Mira. A ceux aussi côtoyé dans les couloirs de l'institut de Bactériologie, merci pour votre soutien et pour les bons moments passés ensemble : Martine, Christelle, Joris, Quentin.

Et aux autres ...

Mille mercis à ma famille et à Serge pour leur soutien indéfectible.

Table des matières

Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des abréviations	11
Introduction	12
Partie I: Généralités sur la borréliose de Lyme	17
I) Historique	18
II) Le principal vecteur, la tique dure du genre <i>Ixodes</i> spp.	18
(A) Le cycle de vie de l'espèce <i>Ixodes ricinus</i>	20
(B) Morphologie générale	22
(C) Les organes importants en pathogénie	24
1) l'appareil sensoriel	25
2) les glandes salivaires	25
(D) L'étape de transmission : le repas sanguin	26
1) Piqûre, fixation sur l'hôte et décrochement	26
2) Transmission de <i>Borrelia burgdorferi</i> sl : de la tique à l'hôte	27
(E) Répartition du vecteur	28
1) Les facteurs abiotiques	29
a) La température	31
b) L'humidité relative	32
c) La photopériode	33
2) Les facteurs biotiques	33
a) Les types de forêts	34
b) Les stades d'évolution de la forêt et la canopée	35
c) La litière/l'humus	35
(i) généralités sur l'humus : principe de sa formation et description	36
(ii) les différentes formes d'humus	36
(iii) la texture du sol	36
d) Les animaux-hôtes	37
(i) la notion de réservoir	38
(ii) réservoir animal et immunité :	39

	l'activité borricide du complément	
	(iii) les micromammifères	41
	(iv) les ongulés	43
	(v) les oiseaux	44
	e) Les prédateurs	45
	f) La notion de biodiversité	46
	g) La fragmentation	47
III)	la tique comme vecteur de pathogènes	48
	(A) L'agent pathogène dans la borreliose de Lyme :	48
	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	
	1) Le génome de <i>Borrelia burgdorferi</i>	51
	sensu lato, transmission et	
	interaction	
	2) Les protéines de <i>Borrelia</i> spp.	51
	3) Epidémiologie des différentes espèces	53
	de <i>Borrelia burgdorferi</i> sl	
IV)	La borreliose de Lyme : ses formes cliniques, son diagnostic, sa prise en charge	56
	(A) Les formes cliniques	56
	1) La phase localisée précoce	56
	2) La phase disséminée précoce	57
	3) La phase disséminée tardive	58
	(B) Le diagnostic biologique	59
	(C) La prise en charge	60
	1) La prévention primaire	60
	2) Le retrait de la tique	62
	3) Le traitement de la borreliose de Lyme	63
VI)	Les microorganismes portés par les tiques autres que <i>Borrelia burgdorferi</i> sl	65
	(A) Les bactéries	67
	(B) Les virus	68
	(C) Les parasites	69
Partie II : Surveillance du vecteur <i>Ixodes ricinus</i> par le CNR des <i>Borrelia</i> à partir de 2012		71
I)	Contexte de la surveillance	72
II)	Données d'épidémiologie nationale	73
III)	Données d'épidémiologie régionale	73
IV)	Surveillance vectorielle	74
V)	Méthode de détection de <i>B. burgdorferi</i> sl dans les tiques	78
Partie III : Description du projet		79
Etude à dix ans des densités en nymphes dans une zone d'endémie		81
I)	Contexte de l'étude	82
II)	Matériel et méthode statistique	82
III)	Résultats et article	88
Etude sur les facteurs biotiques et abiotiques en zone d'endémie		121
I)	Contexte, présentation du projet et objectif	122

II) Résultats et article	122
Etude descriptive globale du risque acarologique en Alsace	153
I) Descriptif des données	154
II) Résultats	154
III) Discussion	166
Discussion et perspectives	
(A) L'expansion des tiques	169
1) Le facteur climatique	169
2) Les facteurs biotiques	170
(B) Les autres maladies liées aux tiques	174
(C) Santé publique et prévention de la maladie de Lyme : l'évaluation du risque, ses perspectives, ses limites	176
1) L'évaluation du risque	176
2) Ses limites	178
(D) Les stratégies de maîtrise de la borréliose de Lyme et autres maladies liées aux tiques	179
Conclusion	181
Lexique	182
Bibliographie	188
Annexes	211

Liste des tableaux

Tableau I	Principales maladies transmises par les tiques d'importance en santé humaine et animale	13
Tableau II	Les animaux et leur rôle dans l'écologie de <i>B. burgdorferi</i> sl	42
Tableau III	Synthèse des différentes régions du monde où circulent le pathogène et les caractéristiques de son écologie en lien avec l'hôte	53
Tableau IV	Recommandations françaises pour la prise en charge de la phase primaire de la borréliose de Lyme : traitement par voie orale	64
Tableau V	Résultats de l'analyse multivariée sur les densités de 2003, 2004, 2013 et 2014	84
Tableau VI	Densités en nymphes en 2003, 2004, 2013 et 2014	88
Tableau VII	Densité en nymphes et en adultes en Alsace en 2013	156
Tableau VIII	Densité en nymphes et en adultes en Alsace en 2014	156
Tableau IX	Densité en nymphes et en adultes en Alsace en 2015	157
Tableau X	Densité en nymphes et en adultes en Alsace en 2016	157
Tableau XI	Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2013	157
Tableau XII	Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2014	158
Tableau XIII	Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2015	159
Tableau XIV	Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2016	159
Tableau XV	Densité en nymphes infectées en Alsace en 2013	159
Tableau XVI	Densité en nymphes infectées en Alsace en 2014	159
Tableau XVII	Densité en nymphes infectées en Alsace en 2015	160
Tableau XVIII	Densité en nymphes infectées en Alsace en 2016	160
Tableau XIX	Densités moyennes en nymphes infectées (données 2013-2014) des 13 sites collectées régulièrement	164
Tableau XX	Niveau de risque acarologique (3 classes)	164
Tableau XI	Prévalence <i>A. phagocytophilum</i> dans les nymphes en 2004 et de 2013 à 2016	166

Liste des figures

Figure 1	Schéma représentant au sein des <i>Ixodida</i> , la place des <i>Ixodes</i> spp.	19
Figure 2	Photographie des différentes stases de la tique <i>I. ricinus</i>	20
Figure 3	Cycle de la vie de la tique <i>I. ricinus</i>	21
Figure 4	Photographie : capitulum d' <i>I. ricinus</i> observé en microscopie électronique	24
Figure 5	Représentation schématique de la morphologie	24
Figure 6	Photographie de nymphes <i>Ixodes</i> gorgée et non gorgée	24
Figure 8	Schéma de la poche hémorragique créée par la tique pour effectuer son repas sanguin	27
Figure 9	Cartographie de la distribution globale du complexe <i>I. ricinus</i>	29
Figure 10	Hauteur de quête des différentes stases d' <i>I. ricinus</i> sur la végétation basse	30
Figure 11	Structure schématique des différents types d'humus	37
Figure 12	Schéma de l'activation du complément par <i>Borrelia burgdorferi</i> sl	40
Figure 13	Schéma synthétique des spécificités d'hôte selon les espèces de <i>Borrelia burgdorferi</i> sl	41
Figure 14	Aspects macroscopique et microscopique de <i>Beauvaria bassina</i>	46
Figure 15	Position taxonomique des espèces du genre <i>Borrelia</i> spp.	49
Figure 16	Répartition mondiale des espèces du complexe <i>Borrelia burgdorferi</i> sl	50
Figure 17	Principales interactions entre la tique, l'hôte et le pathogène	52
Figure 18	Taux d'infection pour différents pathogènes chez les nymphes aux Pays-Bas en fonction du mois de l'année	54
Figure 19	Schéma de décomposition des étapes menant à la maladie de Lyme chez l'Homme	55
Figure 20	Photographie d'un érythème migrant	57
Figure 21	Photographie d'un lymphocytome cutané	59
Figure 22	Photographie d'acrodermatite chronique atrophiante	59
Figure 23	Graphique représentant l'évolution du taux des anticorps en fonction du temps	61
Figure 24	Schéma d'aménagement paysager adapté à la prévention du risque acarologique	60
Figure 25	Schéma du processus de retrait de la tique avec une pince à épiler	63
Figure 26	Carte représentant les taux d'incidence annuels estimés en France en 2010-2015, données régionales	74
Figure 27	Photographie d'un tir de drapeau	76
Figure 28	Carte de répartition des principaux sites investigués en Alsace de 2013 à 2016	155
Figure 29	Répartition globale des différentes espèces de <i>Borrelia burgdorferi</i> sl de 2013 à 2016	161
Figure 30	Répartition des différentes espèces de <i>Borrelia burgdorferi</i> sl en fonction des sites de collecte de 2013 à 2016	162
Figure 31	Carte de localisation et de prévalence des sites investigués en Alsace pour <i>A. phagocytophilum</i>	165
Figure 32	Carte de risque de borréliose de Lyme pour la partie Est des Etats-Unis	170

Figure 33	Cartographie de la présence des tiques en Suède en 1980 et 1990.	171
Figure 34	Evolution des moyennes mobiles de Strasbourg et de Lyon	172
Figure 35	Tableau de chasses départementales des chevreuils en 2008 et 2009.	173
Figure 36	Prélèvement en cerfs élaphe, daim et chevreuil dans deux départements alsaciens entre 2003 et 2013	177
Figure 37	Carte de risque de borréliose de Lyme pour la partie Est des Etats-Unis	178
Figure 38	Carte de déploiement des panneaux d'information en Alsace	181

Abréviations

ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
CDC:	Center for Disease Control
CIRE :	Cellule Inter-Régional d'Epidémiologie
CNR :	Centre National de Référence
EUCALB :	European Concerted Action on Lyme Borreliosis
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM:	Erythème migrant
FEMS:	Federation of European Microbiological Societies
FFRP:	Fédération Française de Randonnée Pédestre
GPS:	Global Positioning System
HLA:	Antigène d'histocompatibilité
IgM:	Immunoglobuline de type M
IgG :	Immunoglobuline de type G
InVS :	Institut de Veille Sanitaire, a fusionné avec l'EPRUS et l'InVs pour créer Santé Publique France en 2016
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
MSA :	Mutuelle Sociale Agricole
NS :	Non significatif
ONF :	Office National des Forêts
ONCFS :	Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage
Osp :	Outer Surface Protein
PCR :	Polymerase Chain Reaction
SPILF :	Société de Pathologies Infectieuses de Langue Française
PLDS:	Post-Lyme Disease Syndrom
Tm:	Température de Melting
TROSPA:	Tick-Receptor Osp A

Introduction

Les tiques seraient apparues il y a 225 millions d'années (Evans 1992; Sonenshine and Roe 2014; Brites-Neto et al. 2015). Ce sont des ectoparasites hématophages* stricts qui sont présents dans à peu près toutes les régions du globe. Certains genres sont plus fréquents dans les zones froides à tempérées, comme par exemple *Ixodes* et *Dermacentor* et d'autres plus habitués aux zones chaudes comme *Hyalomma* ou *Amblyomma* (zone intertropicale). Elles revêtent une importance primordiale en terme de santé publique et vétérinaire (L'Hostis and Seegers 2002; Beugnet and Marié 2009; Baneth et al. 2012). En effet, les tiques sont reconnues, avec les moustiques, comme des vecteurs* de pathogènes à la fois pour les humains et pour les animaux (Heyman et al. 2010). Elles ont, même, été les premiers arthropodes à être établis comme des vecteurs (Jongejan and Uilenberg 2004). Elles peuvent transmettre un panel très étendu de microorganismes -incluant tout aussi bien des bactéries, des parasites ou des virus- à des mammifères hôtes lors de leur repas sanguin (Parola and Raoult 2001; Dantas-Torres et al. 2012; Sonenshine and Roe 2014).

Des transferts de pathogènes entre animaux et l'Homme peuvent donc s'opérer grâce à eux. Cunningham en 2005 évoque ainsi le chiffre de 1415 pathogènes pour l'Homme parmi lesquels 61 % sont d'origine zoonotique (Cunningham 2005).

Aujourd'hui, en Europe, les tiques représentent le principal vecteur de maladies infectieuses à la fois chez l'Homme et chez les animaux (Piesman and Eisen 2008; Beugnet and Marié 2009; Schotthoefer and Frost 2015). (Tableau I)

De par leur vaste répartition géographique, l'éventail large des pathogènes véhiculés et la diversité des hôtes potentiellement engagés dans leur cycle de vie, elles constituent des maillons essentiels pour la circulation dans l'environnement de certains microorganismes. L'étude de la dynamique des tiques -englobant leur cycle de développement et leur stratégie de rencontre de l'hôte - constitue une connaissance essentielle à acquérir pour la médecine vétérinaire et humaine avec un objectif de prévention des maladies transmises.

* Une définition est disponible dans le lexique

Tableau I. Principales maladies transmises par les tiques d'importance en santé humaine et animale (D'après Piesman et Eisen, 2008 et Brites-Neto, 2015)

Pathologie	Agent causal	Vecteur primaire	Distribution géographique primaire
Virus			
Fièvre de la tique du Colorado	<i>Coltivirus</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Nord-Ouest de l'Amérique
Fièvre hémorragique Crimée-Congo	<i>Nairovirus</i>	<i>Hyalomma marginatum</i>	Afrique, Asie, Europe
Maladie de la forêt Kyasanur	<i>Flavivirus</i>	<i>Haemaphysalis spinigera</i>	Subcontinent indien
Fièvre hémorragique Omsk	<i>Flavivirus</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Asie
Encéphalite à tique	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i> , <i>Ixodes ricinus</i>	Asie, Europe
Encéphalite de Powasan	<i>Flavivirus</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>I. scapularis</i>	Hémisphère Nord (Canada, Etats-Unis, Russie)
Maladie de Louping	<i>Flavivirus</i>	<i>I. ricinus</i>	Grande-Bretagne, Espagne, Turquie
Bactérie			
Fièvre africaine de la piqûre de tique	<i>Rickettsia africae</i>	<i>Amblyomma herbraeum</i> , <i>Amblyomma variegatum</i>	Afrique, Les Antilles
Anaplasmose granulocytaire humaine	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Europe, Amérique du Nord
Ehrlichiose monocytaire humaine	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	Amérique du Nord
Borréliose de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	<i>Ixodes persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	Asie, Europe, Amérique du Nord
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Afrique, Asie, Europe
Fièvre Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Plusieurs espèces de différents genres	Afrique, Asie, Australie, Europe, Amérique du Nord
Fièvre pourpre des Montagnes Rocheuses, Fièvre boutonneuse brésilienne	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Amblyomma cajennense</i> , <i>A. sculptum</i> , <i>A. aureolatum</i> <i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Amérique du Nord, du Sud et du Centre
Fièvres récurrentes	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Ornithodoros</i> spp.	Afrique, Asie, Europe, Amérique du Nord
Tularémie	<i>Francisella tularensis</i>	Plusieurs espèces de différents genres	Asie, Europe, Amérique du Nord
Cowdriose	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	<i>A. variegatum</i> , <i>A. hebraeum</i> , <i>A. pomposum</i>	Afrique du Sud, Afrique sub-Saharienne, Caraïbe

Parasite			
Babésiose	<i>Babesia divergens</i> , <i>Babesia microti</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Europe, Amérique du Nord
Theilériose	<i>Theileria parva</i> , <i>T. annulata</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>Hyalomma</i> spp.	Afrique du Sud et de l'Est, Bassin méditerranéen, Afrique du Nord, Moyen- Orient, Inde, Sud de l'Asie
Micromycète			
Dermatophilose	<i>Dermatophilus</i> <i>congolensis</i>	<i>Amblyomma variegatum</i>	Afrique, Caraïbe, Australie

Dans l'ordre des *Ixodida*, on distingue trois familles: les *Ixodidae*, les *Argasidae* et les *Nutalliellidae*.

La famille des *Argasidae* (les tiques molles) se divise en deux sous-familles : les *Argasinae* et les *Ornithodorinae*. La sous-famille des *Ornithodorinae* regroupe huit genres dont le genre *Ornithodoros* et le genre *Carios*. La sous-famille des *Argasinae* comporte entre autre, le genre *Argas* (Klompfen et al. 2007; Mans et al. 2011). Parmi elles, on compte environ 190 espèces, dont *Argas reflexus*, la tique européenne du pigeon, est l'habitant le plus commun des aires urbaines d'Europe centrale et de l'Ouest. En effet, la tique est liée très fortement au principal oiseau nuisible urbain : le pigeon (Dautel et al. 1991).

La famille des *Nutalliellidae* ne comporte qu'une seule espèce : *Nutalliella namaqua*. Elle semble morphologiquement intermédiaire entre les *Argasidae* d'une part et les *Ixodidae*/*Amblyommidae* d'autre part. Sa présence en France métropolitaine reste peu probable.

La famille des *Ixodidae* (tiques dures) comprend 14 genres et 896 espèces d'*Ixodida* recensées dans le monde (Guglielmone et al. 2010; Guglielmone and Nava 2014), dont plus de 41 en France (Guigen and Degeilh 2001; Grech-Angelini et al. 2016; Hornok and Krawczyk 2016). Comme nous l'avons vu, ces acariens hématophages ont un rôle établi dans la transmission aux vertébrés de bactéries (*Rickettsia*, *Borrelia*, *Cowdria*, *Francisella*,...) (Vayssier-Taussat et al. 2013; Carvalho et al. 2014), de virus (*Flavivirus*,...) (Charrel et al. 2004; Hubálek and Rudolf 2012), de protistes (*Babesia*, *Trypanosoma*,...) (Gray et al. 2002; Diuk-Wasser et al. 2016), d'helminthes (filaires,...) (Ramos et al. 2014) pathogènes pour l'Homme et les animaux.

En France, onze espèces de tiques sont impliquées dans le parasitisme humain (Guigen and Degeilh 2001). Parmi celles-ci, les tiques dures du genre *Ixodes* spp. sont les vecteurs principaux de la borréliose de Lyme, et jouent un rôle important en pathologie humaine (Piesman and Eisen 2008; Medlock et al. 2013).

La babésiose bovine dont l'agent *Babesia divergens*, est transmis par les tiques dures (*Ixodes ricinus*), est à l'origine de syndromes hémolytiques graves ainsi que de pertes de lait et de viande au sein des élevages bovins (Mapholi et al. 2014). Elle a donc, en conséquence, un impact économique non négligeable dans les régions d'élevage (L'Hostis 1998). La tique *Dermacentor reticulatus* revêt, quant à elle, une importance vétérinaire car elle est le vecteur de *Babesia canis* chez le chien (Dumont et al. 2015).

Les tiques, et par conséquent les maladies qu'elles transmettent, sont devenues un problème de santé publique humaine au cours des trente dernières années. L'intérêt des autorités pour ces pathologies est grandissant. L'augmentation des cas humains de maladies transmises par les tiques (Hofhuis et al. 2006), les difficultés de diagnostic inhérentes aux pathologies induites, leur caractère potentiellement délétère (Amsden et al. 2005) suscite l'implication croissante des pouvoirs publics et justifie la nécessité d'études sur ces pathologies.

De plus, la découverte de l'étiologie vectorielle de certains symptômes humains (Parola et al. 2005) et la colonisation des tiques sur de nouveaux territoires (Lindgren et al. 2000; Ogden et al. 2009) provoque de nouvelles interrogations quant à leur véritable impact.

La borréliose de Lyme (Burgdorfer 1984) et l'anaplasmosse granulocytaire humaine (Bakken and Dumler 2006) n'ont été identifiées chez l'Homme que depuis les années 1980. Par ailleurs, d'autres bactéries telles *Borrelia miyamotoi* ou *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (von Loewenich et al. 2010; Platonov et al. 2011) détectées chez les tiques, ont été récemment mises en évidence dans de rares cas cliniques humains (Jahfari et al. 2012; Coipan et al. 2013; Hovius et al. 2013). Le caractère possiblement émergent des maladies transmises par les tiques en font une source de questionnement quant aux moyens de contenir ces pathologies pour en préserver la population (Blancou et al. 2005; Vorou et al. 2007; Rizzoli et al. 2011).

En conséquence, des stratégies efficaces de prévention et de contrôle des maladies à tiques s'imposent. Leur maîtrise s'appuie justement en grande partie sur la connaissance de leur épidémiologie. De façon à cibler au mieux les besoins de santé et les actions à mener en regard de cette situation, il est nécessaire de pouvoir renseigner les décideurs politiques par la production de données épidémiologiques humaine mais aussi vectorielle.

Parmi ces maladies à tiques, nous prendrons pour exemple celui de la borréliose de Lyme, maladie à transmission vectorielle la plus répandue dans l'hémisphère Nord (Stanek et al. 2012). L'agent pathogène est constitué des bactéries du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) qui sont responsables de manifestations principalement cutanées, neurologiques ou articulaires (Mead 2015). *B. burgdorferi* sl est un complexe bactérien regroupant une vingtaine d'espèces dont les plus fréquemment pathogènes pour l'Homme sont: *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. afzelii*, *B. garinii* dans les pays du centre et du Nord de l'Europe

(Scandinavie, Autriche, Suisse, Allemagne et France, notamment)(Margos et al. 2011; Stanek and Reiter 2011; Schotthoefer and Frost 2015; Hoang Johnson et al. 2016).

L'Alsace –siège et périmètre de notre étude- est une région endémique en France pour la borréliose de Lyme. C'est une plaine formée suite à l'effondrement de la zone tectonique située entre les Vosges et la Forêt Noire, façonnée par le Rhin qui coule en son centre. La diversité topographique y est importante. Ainsi, d'Est en Ouest, les paysages sont les suivants :

- les Vosges, montagnes peu élevées recouvertes de forêts,
- les collines sous-vosgiennes, principalement consacrées à la viticulture,
- puis la plaine, elle-même constituée de zones de ried* fréquemment inondées.

Ce paysage contrasté et densément peuplé a constitué l'unité géographique de ce projet de thèse de doctorat qui s'effectue au sein de l'EA 7290 : virulence bactérienne précoce, groupe borréliose de Lyme, adossé au Centre National de Référence des *Borrelia* et de l'EA 7290 : virulence bactérienne précoce, groupe borréliose de Lyme.

Partie I

Généralités sur la borréliose de Lyme

I) Historique

Les premières descriptions de manifestations cliniques rattachées à la maladie de Lyme remontent à 1883 en Allemagne. Buchwald décrit alors une lésion cutanée caractéristique : l'acrodermatite chronique. Au début du XX^{ème} siècle, le dermatologue suédois Arvid Afzelius décrit pour la première fois une lésion cutanée érythémateuse apparue suite à la piqûre d'une tique, que Lipschütz appellera ultérieurement *erythema chronicum migrans*. Cette dénomination tient son nom de sa tendance à s'élargir et à persister (Afzelius 1909; Lipschütz 1913).

En 1922, deux neurologues français, Charles Garin et Antoine Bujadoux, décrivent le premier cas d'atteinte neurologique. La transmission par une tique ainsi que la présence d'un érythème migrant (EM) au point de piqûre y est rapporté (Garin and Bujadoux 1922).

En 1975, dans la petite ville américaine d'Old Lyme (Connecticut, Etats-Unis), deux mères de familles inquiètent de la proportion importante d'arthrites survenant brutalement chez les enfants dans leur ville alertent les autorités sanitaires (CDC d'Atlanta). Un an après, une enquête épidémiologique rétrospective sur 51 cas est entreprise par un jeune rhumatologue de l'Université de Yale, A. Steere. Celui-ci confirme la teneur épidémique de l'épisode et démontre la relation entre ces arthrites et les piqûres de tique. Il observa aussi l'atténuation des symptômes par une antibiothérapie. Il évoque ainsi l'hypothèse infectieuse et fait le rapprochement avec les manifestations dermatologiques et neurologiques européennes (Steere et al. 1978).

En 1981, un entomologiste médical, W. Burgdorfer observe de son côté des spirochètes dans l'intestin de tiques prélevées en zone d'endémie* de maladie de Lyme (Burgdorfer et al. 1982). Deux ans après, est décrite dans le « New England Journal of Medicine » cette nouvelle maladie infectieuse qui est appelée: maladie de Lyme. La bactérie mise en évidence est nommée *Borrelia burgdorferi* en son honneur en 1984 (Johnson et al. 1984). L'origine vectorielle et le rôle de la tique sont établis ; la découverte de la borreliose de Lyme est donc relativement récente.

II) Le vecteur principal : la tique dure *Ixodes* spp.

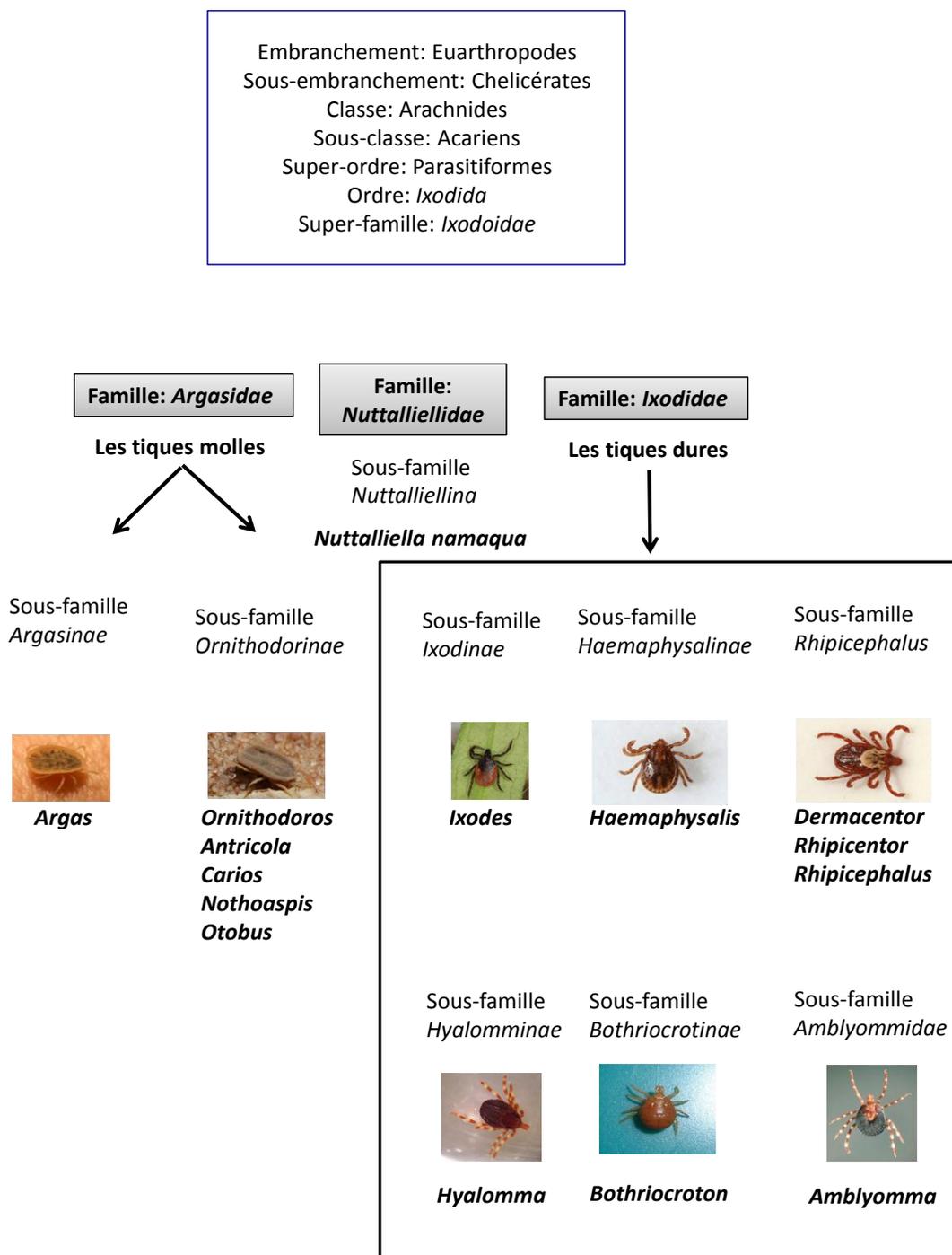
Le genre *Ixodes* spp. appartient à l'embranchement des Arthropodes, à la classe des *Arachnida*, à l'ordre des *Ixodida*, au sous-famille des *Ixodina* (Brites-Neto et al. 2015). (Figure 1)

Les arthropodes sont des organismes caractérisés par la présence d'un exosquelette et d'appendices articulées (pattes, antennes, chelicères*...) (Heuser and Dupuis 2008). Au sein des arthropodes, on distingue deux grands groupes : les

Antennates et les Chélicérates. Les tiques appartiennent à ce dernier embranchement.

Parmi les *Ixodida*, qui nous l'avons dit regroupe 896 espèces, on distingue trois sous-ordres : *Argasina*, *Nuttallielina* et *Ixodina*. Les *Ixodina* sont qualifiées de « tiques dures » alors que les *Argasina* sont qualifiées de tiques « molles », car elles ont un tégument* sans sclérification* contrairement aux *Ixodina* qui elles, possèdent des zones de tégument chitinisé* dures (Brites-Neto et al. 2015).

Figure 1. Schéma représentant au sein des *Ixodida*, la place des *Ixodes* spp. (modifié d'après Mc Coy et Boulanger, 2017)



Parmi les espèces de tiques, *I. ricinus* (qui tient son nom de la graine de ricin dont elle a l'aspect), qui est souvent appelée la tique commune ou la tique du mouton, est en Europe le vecteur de la borréliose de Lyme en Europe (Guigen and Degeilh 2001; Kosik-Bogacka et al. 2007).

Cette tique fait partie d'un complexe d'espèces. En effet *I. scapularis*, *I. persulcatus* et *I. pacificus* lui sont phylogénétiquement proches (Piesman 1989; Black and Piesman 1994; Xu et al. 2003).

D'autres espèces d'*Ixodes* sont, comme *I. uriae*, ou *I. hexagonus*, également des vecteurs de *B. burgdorferi* *sl*, ne sont toutefois que des vecteurs secondaires (Comstedt, Jakobsson, & Bergström, 2011; Guigen, 2001; Gern, Toutoungi, Hu, & Aeschlimann, 1991). En effet, ces autres espèces, de par leur mode de vie, entrent peu en contact avec l'Homme ce qui relativise le risque de piqûre par ces tiques et donc de transmission de *B. burgdorferi* moins probable (Faulde et al. 2014; Fotso Fotso et al. 2014).

(A) Le cycle de vie de l'espèce *Ixodes ricinus*

Le cycle de vie des tiques *I. ricinus* dure en moyenne deux à trois ans (Sonenshine 1991). Au cours de sa vie, une tique va effectuer trois grandes transformations physiologiques appelées « mues* » qui vont marquer le passage d'une stase à une autre. La tique *I. ricinus* possède trois stases : la larve, la nymphe et l'adulte (femelle ou mâle) (Figure 2).

Figure 2. Photographie des différentes stases de la tique *I. ricinus* (Stanek et al. 2012)

De gauche à droite : larve, nymphe, adulte femelle, adulte mâle

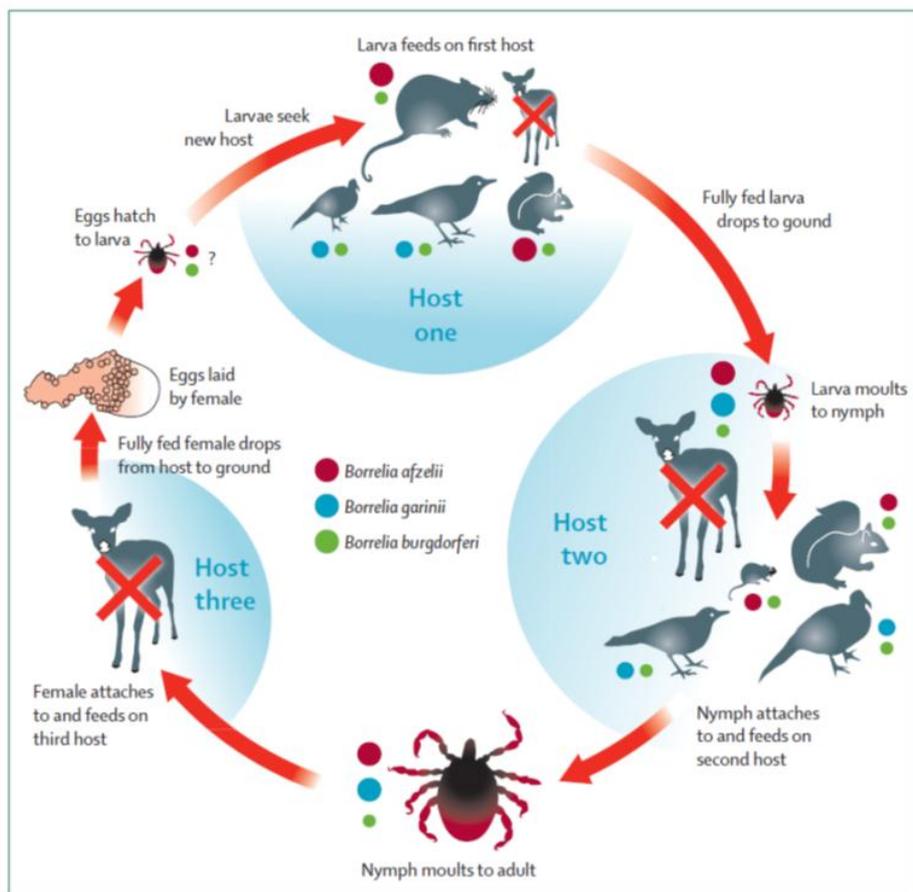


La tique *I. ricinus*, est une tique triphasique, trixène* et télotrope*. C'est à dire que chacune des stases est hématophage* et se gorge sur un hôte différent (Degeilh 2007). Dans le cycle de vie d'une tique, les mues* matérialisent le passage d'un stade* à un autre.

Lorsqu'une mue s'accompagne de changements physiologiques, histologiques et comportementaux, alors celles-ci sont le théâtre d'une véritable métamorphose. Les métamorphoses définissent alors le passage d'une stase à une autre stase, comme c'est le cas chez les tiques du genre *Ixodes* spp. Au sein du genre *Ixodes* spp., trois stases sont distinguées : la larve, la nymphe et l'adulte (mâle ou femelle). Une mue n'entraînant pas de métamorphose, implique alors le passage à un stade supérieur. Pour ce qui est d' *I. ricinus*, chaque mue entraîne une métamorphose, stades et stases sont donc confondus (Perez-Eid 2007).

Des phases de diapause* -qui se définissent comme des arrêts anticipés du développement ou de l'activité, déterminés génétiquement ou par des facteurs extérieurs annonçant des conditions défavorables (Belozarov 2008)- peuvent entrecouper, notamment en période froide, la vie de la tique, allongeant ainsi sa durée et donc son cycle de vie -qui peut alors durer plus de 4 ans (MacLeod 1936).

Figure 3. Cycle de vie et hôtes des tiques du genre *Ixodes* (Stanek et al. 2012)



(Les animaux marqués d'une croix sont considérés comme non compétents pour *B. burgdorferi* sl)

Les larves présentes dans le milieu extérieur se nourrissent sur un hôte en trois jours. A réplétion*, elles se détachent, tombent au sol et muent en nymphes. Ces nymphes, pour réaliser leur deuxième mue, vont se mettre en quête d'un hôte (Mannelli et al. 2011). (Figure 3) Pour cela, elles attendent celui-ci sur la végétation, on dit qu'elles sont « à l'affût », c'est à dire en recherche d'hôte. Au passage d'un hôte, la nymphe va se laisser tomber sur celui-ci. Une fois sur son hôte, pour son point de piqûre, elle va privilégier les zones où la peau est, en général, plus fine : aine, anus, mamelles, oreilles... (Berglund et al. 1995). Elles se gorgent sur cet hôte en cinq jours environ et va se laisser tomber au sol. La nymphe mue alors en une tique adulte mâle ou femelle. (Figure 3)

L'accouplement entre un mâle et une femelle aboutit à la mort du mâle et donnera une ponte de 2 000 à 3 000 œufs après que la femelle a effectué un dernier gorgement* de 10 jours (Perez-Eid 2007). Une fois la ponte réalisée, la femelle meurt.

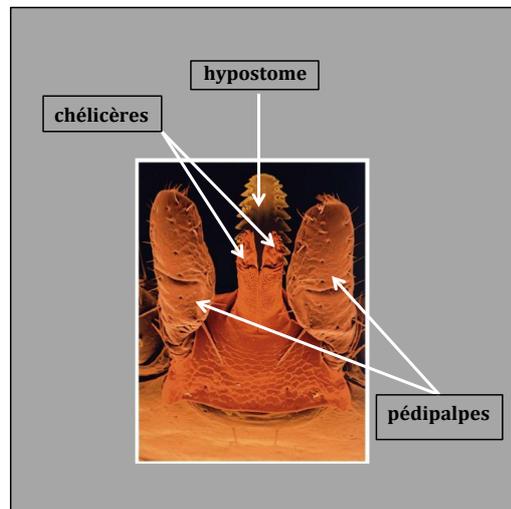
(B) Morphologie générale

Les arthropodes constituent un embranchement se caractérisant par un corps segmenté. Chez eux, le squelette est externe (exosquelette) et composé le plus souvent de chitine et présente des appendices articulées (antennes, pattes, mandibules, chélicères,...) (Lecointre and Le Guyader 2006).

Chez les tiques, le corps est composé d'une partie antérieure : le capitulum et d'une partie postérieure globuleuse: l'idiosome.

Sur le capitulum, on retrouve les organes nécessaires à la fixation de la tique sur l'hôte et à la succion du sang. Ce capitulum est composé d'une paire de pédipalpes (ayant un rôle strictement sensoriel), de l'hypostome, composé de nombreuses dents dirigées vers l'arrière et de chélicères, pièces perforatrices permettant l'incision puis l'ancrage de l'hypostome. Cet ensemble est appelé rostre (Rodhain and Perez-Eid 1985). (Figure 4)

**Figure 4. Photographie : Capitulum d'*I. ricinus*
observé en microscopie électronique
(<http://web.expasy.org/prolune/dossiers/025/>)**



L'idiosome est lui composé de pores, de soies (sensilles, mécano-proprioceptives et chimio-réceptrices) dont la répartition est propre aux espèces (Sonenshine et al. 1986; Leonovich 1990).

Sur la face ventrale, se trouve les pattes, mais aussi un pore génital (pour les adultes femelles) dans sa région antérieure et un orifice anal dans la région postérieure. Cette face est aussi parcourue par des sillons. (Figure 5) La nymphe se distingue de la femelle par l'absence de pore génital et par sa taille.

La tique (aux stases nymphale et adulte) possède des stigmates respiratoires au niveau dorso-latéral. La larve, elle, par son tégument* fin, opère une respiration transcutanée. Les stases nymphale et adulte sont dotées de quatre paires de pattes alors que la stase larvaire n'en possède que trois. Les larves mesurent 0,5 à 1 mm, les nymphes 1 à 2 mm, les adultes entre 5 et 15 mm. Une femelle gorgée peut atteindre une taille supérieure à 1 cm (Gern 2004).

Un scutum (ou écusson, plaque chitineuse rigide) recouvre partiellement (et antérieurement chez la larve, la nymphe, et l'adulte femelle) ou presque totalement (mâle) la face dorsale des tiques du genre *Ixodina*. La place prépondérante du scutum sur la face dorsale est, d'ailleurs, un des éléments permettant de distinguer le mâle de la femelle. La distinction entre mâle et femelle est possible, d'une part, grâce à l'examen du scutum, et d'autre part, par la taille. En effet, le mâle est plus petit que la femelle. Son scutum -recouvrant toute la face dorsale- limite très fortement son gorgement.

Chez les larves, nymphes et adultes femelles, une partie postérieure peut s'étendre, permettant ainsi le gorgement*.

Une fois gorgée, la nymphe peut atteindre 2 mm. (Figure 6) La tique ingère une quantité de sang l'équivalent de 100 à 200 fois son poids (Mehlhorn 2011).

Figure 5. Représentation schématique de la morphologie ventrale et dorsale des adultes femelles *Ixodina* (d'après Morel, cité dans Boyard, 2007)

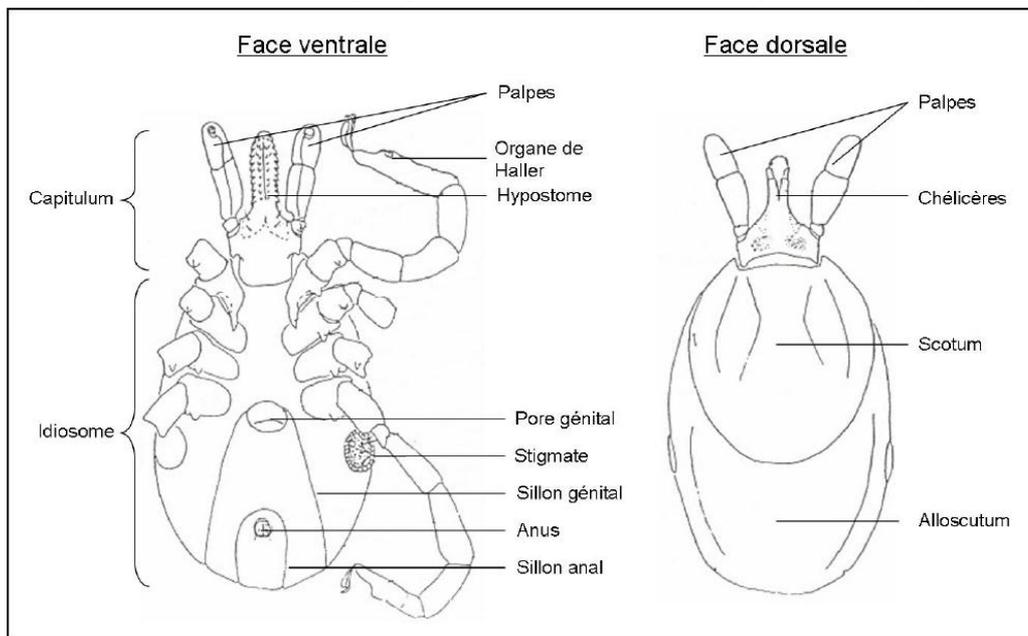


Figure 6. Photographie de nymphes *Ixodes* gorgée et non gorgée (Photo N. Boulanger)



(C) Les organes importants en pathogénie

Dans cette partie, nous ne détaillerons que les appareils ayant un lien avec la recherche d'hôtes ou avec le parasitisme hématoophage* de la tique. En conséquence,

seuls l'appareil sensoriel et les glandes salivaires d'*I. ricinus* seront abordés dans le paragraphe ci-dessous.

1) L'appareil sensoriel

Les organes sensoriels revêtent une importance capitale pour la survie de l'espèce car ils permettent le repérage des hôtes potentiels. L'organe sensoriel le plus étudié chez la tique est l'organe de Haller qui est localisé sur le tarse de la première paire de patte et comporte de nombreuses soies (Leonovich 1990). L'organe de Haller permet de localiser l'hôte et d'analyser son environnement car il détecte le CO₂, des molécules odorantes (phénol et lactone) et la chaleur émis par les hôtes potentiels (Leonovich 2004). Cet organe se trouve sur la partie la plus éloignée du corps ; c'est pourquoi, lorsque les tiques sont à l'affût, elles bougent la première paire de pattes (Waladde and Rice 1982). L'organe de Haller exprimerait des récepteurs à la fois olfactif et gustatif alors que les chélicères et les pédipalpes expriment uniquement des récepteurs gustatifs (Sonenshine 2006). Les tiques à l'affût répondent également à des stimuli vibratoires (Sonenshine et al. 1986).

I. ricinus possède également des cellules photo-sensibles sur le dos mais pas d'yeux contrairement à d'autres espèces de tiques (*Rhipicephalus* spp. par exemple) (Medlock et al. 2013).

2) Les glandes salivaires

Chez les tiques, la fonction des glandes salivaires est multiple. Comme chez les autres arthropodes hématophages, les glandes salivaires émettent diverses substances qui facilitent le prélèvement de sang, notamment en réduisant les réactions de l'hôte. Trois processus peuvent en effet entraver le repas sanguin : l'hémostase, l'inflammation et l'immunité (Francischetti et al. 2009). Pour les contrer, la tique a développé des moyens pharmacologiques (lipides et protéines bioactives) sophistiqués. Ces molécules sont anti-hémostatiques, anti-plaquettaires, vasodilatatrices, anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Ces différentes substances sécrétées permettent une piqûre non douloureuse et un gorgement* efficace (Sauer et al. 1995; Francischetti et al. 2009; Kazimírová and Štibrániová 2013).

Les propriétés pharmacologiques des substances présentes dans la salive de la tique ont d'ailleurs intéressé le domaine de la pharmacie. Ainsi, le dabigatran (Pradaxa®) est un inhibiteur direct, compétitif et réversible de la thrombine* libre ou fixée à la fibrine et a été extrait de la salive de tique. Il est indiqué en prévention des événements veineux thrombo-emboliques chez les patients bénéficiant d'une chirurgie (prothèse totale de genou ou de hanche) (Eriksson et al. 2008). D'autres molécules, comme l'Ixolaris ou le Penthalaris, avec des actions au niveau de la

cascade de la coagulation, ont été testées mais ne sont pas sorties sur le marché (Francischetti et al. 2002, 2004).

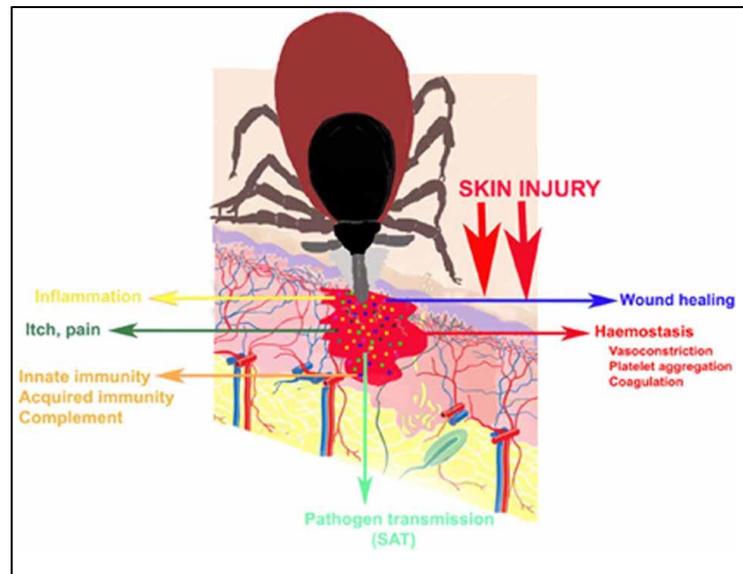
(D) L'étape de transmission : le repas sanguin

1) Piquêre, fixation sur l'hôte et décrochement

Lorsque la tique s'arrête à un endroit du corps – plus fréquemment les aisselles, le creux du genou- la piquêre de la tique débute par une découpe de la peau à l'aide de ses chélicères. Ceux-ci pénètrent progressivement dans l'épiderme avec l'hypostome, dont les dents rétrogrades assurent l'ancrage dans les tissus. Cet ancrage est complété par une sécrétion visqueuse (ou ciment) (Kazimírová and Štibrániová 2013). Les pédipalpes, à rôle exclusivement sensoriel, restent à la surface de la peau. (Figure 8)

La pénétration dans les tissus s'effectue selon une première phase de 3-5 min et s'accompagne d'une sécrétion de ciment qui, en se solidifiant, parfait la fixation. Dans une seconde phase, lorsque les pièces buccales sont ainsi « cimentées » à la peau de l'hôte, les chélicères recommencent leur découpe pour progresser plus profondément, de même que reprend la sécrétion de ciment (Perez-Eid 2007). La fixation complète de la tique est obtenue en 10-30 min à 1 heure (Balashov 1967) et parfois plus, jusqu'à 96h (Binnington and Kemp 1980).

Figure 8. Schéma de la poche hémorragique créée par la tique pour effectuer son repas sanguin (d'après Kazimirova, 2013)



La tique peut effectuer isolément un repas sanguin sur son hôte, mais très souvent, plusieurs tiques en même temps réalisent leur gorgement sur un même animal. A la faveur d'une telle agrégation de tiques, une transmission du pathogène entre tiques dite par « co-feeding » peut avoir lieu.

2) La transmission de *B. burgdorferi* sl : de la tique à l'hôte

Dans le corps de la tique et précisément dans son tube digestif, *B. burgdorferi* sl exprime différentes protéines dont la protéine OspA qui permet la fixation de la bactérie à sa paroi intestinale au moyen d'une protéine appelée TROSPA (Pal et al. 2004a). Une fois la tique attachée à un hôte et le début du repas sanguin commencé, les spirochètes expriment une autre protéine : Osp C. Ce changement induit le détachement de la bactérie du récepteur TROSPA et sa migration de l'intestin vers les glandes salivaires via l'haemolymph (Kazimírová and Štibrániová 2013).

Au niveau des glandes salivaires, les spirochètes fixent la protéine SALP15 - celle-ci a notamment une action protectrice vis à vis des anticorps présent dans le sang de l'hôte. SALP15 a donc une action facilitatrice sur la transmission et également sur la multiplication dans la peau de ces bactéries (Ramamoorthi et al. 2005).

Les spirochètes sont inoculés à l'hôte avec l'arsenal de molécules actives présentes dans la salive de tique. Ainsi, ces molécules modulent l'activité des lymphocytes T (SALP15), du complément (ISAC, Salp20), des macrophages, des neutrophiles et celle des lymphocytes B. L'infection et la dissémination chez l'hôte mammifère en sont alors facilitées (Kazimírová and Štibrániová 2013).

La transmission de *B. burgdorferi* s.l. par co-feeding

La transmission par co-feeding a été mise en évidence pour la première fois pour deux virus : le virus *Thogoto* (Jones et al. 1987) et le virus de l'encéphalite à tique (Labuda and Nuttall 2004). Ces deux arbovirus peuvent être transmis à d'autres tiques, sans qu'aucune virémie ne soit détectée dans le sang des rongeurs hôtes (Jones et al. 1987; Labuda and Nuttall 2004).

Le maintien du cycle naturel de la maladie de Lyme dépend le plus souvent d'une transmission par voie systémique des bactéries. Cependant, la transmission des spirochètes entre tiques par co-feeding a également été mise en évidence (Gern and Rais 1996; Ogden et al. 1997; Voordouw 2015).

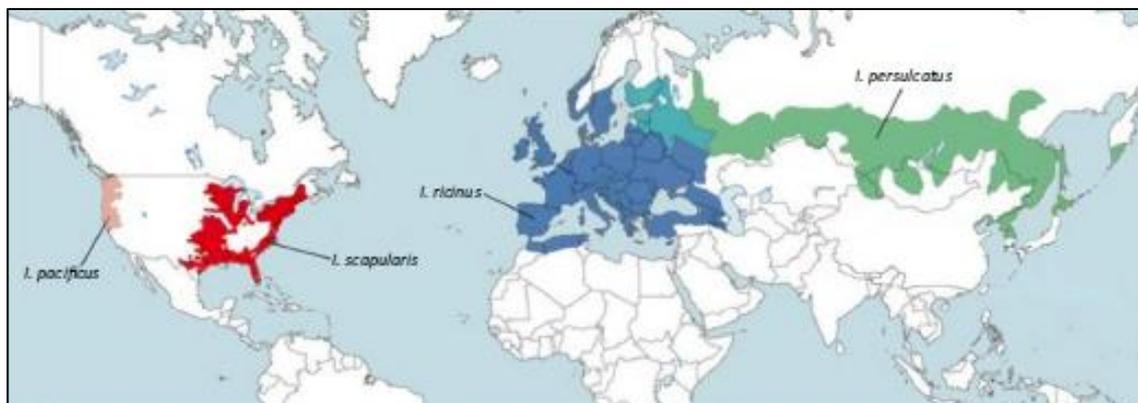
Beaucoup d'espèces du complexe *B. burgdorferi* s.l. ont démontré leur capacité à être transmise par co-feeding : *B. burgdorferi* ss (Gern and Rais 1996), *B. afzelii* (Richter et al. 2002), *B. garinii* (Sato and Nakao 1997) et *B. valaisiana* (Hua et al. 2003). Grâce à des modèles réalisés en laboratoire, la durée de l'infectivité, la densité et la distance entre les tiques au moment du co-feeding, ont été démontrées comme des facteurs impliqués dans l'efficacité de la transmission des spirochètes entre tiques (Richter et al. 2003). Ainsi pour le modèle *I. ricinus* – *B. afzelii*, la transmission par co-feeding augmente de 0 à 55,3 % (pourcentage de tiques infectées après gorgement) lorsque la durée d'attachement de la nymphe infectée passe de 0 à 3 jours (Richter et al. 2003). Cependant, la transmission par co-feeding peut aussi s'opérer lorsque les tiques ne se gorgent pas en même temps sur l'hôte, une période allant jusqu'à 14 jours, a été observée (Gern and Rais 1996).

Nous l'avons vu, l'interaction étroite entre la tique et son hôte mammifère (parfois l'Homme) au niveau de la peau est un élément déterminant dans le cycle de la maladie de Lyme, et donc dans son épidémiologie. Cependant, au niveau macroscopique, c'est à la fois la répartition du vecteur ainsi que la propension de la population à fréquenter ses habitats qui sont alors les facteurs primordiaux dans la compréhension de l'épidémiologie de la pathologie.

(E) Répartition du vecteur

I. ricinus est présente de l'Ouest de l'Europe à l'Oural, ainsi qu'en Afrique du Nord. Elle est présente en Eurasie, approximativement du 10° Ouest (Irlande) au 45° Est (Montagne de l'Oural, Russie) et du 60° Nord (Suède) au 30° Sud (Egypte) (Randolph et al. 2002; Diuk-Wasser et al. 2016).

Figure 9. Cartographie de la distribution globale du complexe d'espèces *I. ricinus* (d'après Diuk-Wasser et al., 2016)



Sa répartition géographique est large et hétérogène à travers l'Europe. Les espèces *I. pacificus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus* ne sont ainsi pas présentes dans nos contrées. (Figure 8)

Les tiques *I. ricinus* colonisent des territoires aux caractéristiques très diverses. Quels sont les éléments déjà connus nécessaires à la survie de ces tiques ? Ceux-ci sont classés en deux catégories, nommés facteurs abiotiques ou biotiques.

1) Les facteurs abiotiques

Les tiques peuvent être classées en tiques endophiles* ou exophiles*. Cette distinction revêt une importance du point de vue de l'éco-épidémiologie des tiques et de leur impact en tant que vecteur de pathogènes.

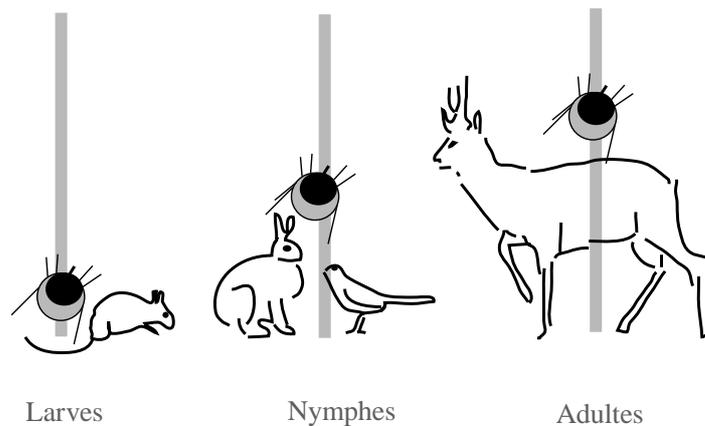
Les tiques endophiles* restent cachées et proches du nid ou des terriers de leur hôte et s'attachent seulement à l'hôte à son arrivée. Les tiques exophiles* comme *I. ricinus* cherchent l'hôte en montant sur la végétation, attendant le passage d'un hôte potentiel (Pfäffle et al. 2013).

Au sein des tiques exophiles*, ce comportement de recherche d'hôtes par affût est à distinguer de celui de chasse de certains genres comme *Hyalomma* spp., lequel se déplace activement vers sa cible (Degeilh 2007). Le caractère endophile ou exophile de la tique a son implication au moment de la collecte. Les espèces exclusivement endophiles ne sont que peu prélevées par la technique du drag ou du flag -que nous détaillerons par la suite - et ne contribuent donc que de façon infime au risque de transmission de *Borrelia* du fait de la très faible interaction avec l'hôte accidentel qu'est l'Homme (Faulde et al. 2014). Parmi ces espèces endophiles, citons *I. hexagonus*, un vecteur compétent pour *B. burgdorferi* s.l, capable de transmettre le pathogène de façon trans-stadiale et trans-ovarienne. *I. hexagonus* pique l'Homme

de façon occasionnelle; mais vu son comportement endophile, une étude de l'abondance d'*I. hexagonous* ne peut pas se réaliser par à la technique du drapeau. Dans le cas d'*I. ricinus*, celle-ci a un comportement exophile et attend ses hôtes sur la végétation (Farkas et al. 2013).

La tique *Ixodes ricinus* passe plus de 99% de sa vie hors phase parasitaire (Pfäffle et al. 2013). Lorsqu'elle est à l'affût à la recherche de son hôte, elle attend sa cible sur la végétation à des hauteurs différentes selon sa stase (Figure 10), selon la végétation ou selon la localisation géographique (Gern 2004).

Figure 10. Hauteurs de quête* des différents stades* d'*I. ricinus* sur la végétation basse (D'après Gern, 2004)



Nous l'avons vu, *I. ricinus* est présente dans l'hémisphère Nord, c'est-à-dire dans des régions à climat tempéré. Compte tenu de sa physiologie (présence d'une cuticule*, parfois sans pores respiratoires pour le stade larvaire) et de son cycle de vie – elle passe la majeure partie de son temps « en dehors de l'hôte » - cette espèce de tique ne peut survivre que dans des environnements adaptés possédant des caractéristiques de température et d'hygrométrie précises. Les facteurs microclimatiques comme la température, l'humidité relative (qui sont affectées par le relief, la couverture neigeuse, la végétation...) peuvent être cruciaux dans la détermination de la distribution des niches spécifiques pour la survie des tiques au sein d'un écosystème.

La température et l'humidité relative sont deux facteurs essentiels pour la survie de la tique. Ces facteurs sont dits « abiotiques * » c'est-à-dire relatif au climat (Estrada-Peña et al. 2013a). Les paramètres (température et humidité) ont été très étudiés (Vail and Smith 1998; Vassallo et al. 2000a; Perret et al. 2000; Estrada-Peña et al. 2004, 2013a; Knap et al. 2009; Tagliapietra et al. 2011; Hancock et al. 2011; Herrmann and Gern 2013; Jore et al. 2014; Daniel et al. 2015; Burtis et al. 2016; MacDonald et al. 2017)- en particulier sur *I. scapularis*.

a) La température

La température est un élément important qui régule d'une part le cycle de vie de la tique et, d'autre part, détermine les sites d'établissement des tiques (Randolph 1997; Ogden et al. 2004; Gray 2008; Gray et al. 2009; Daniel et al. 2015; Tsatsaris et al. 2016).

Le début de l'activité des tiques au printemps et la présence d'un pic automnal sont reliés à la température. Perret et al. (2000) ainsi que Randolph et al. (2002) ont observé une corrélation entre les températures cumulées de l'été et le moment de l'émergence des tiques en automne. Ils ont montré également que la durée nécessaire au développement d'une stase en une autre était inversement reliée à la température (Perret et al. 2000; Randolph et al. 2002; Gray 2008).

Aussi, l'activité de quête d'hôte des *Ixodes* n'est possible qu'à partir d'un certain seuil de température. En-dessous de celui-ci, l'activité est ralentie ou arrêtée (diapause) et ceci quel que soit la stase de la tique. Par exemple, pendant la période hivernale, la diapause (ou pause d'hibernation) se met en place pour les stases pré-imaginales et pour les adultes à jeun. De même, ce même arrêt de développement intervient pour les œufs ou la production des œufs par les adultes femelles gorgées à cette même période. Les tiques du genre *I. ricinus*, en France débutent une activité de chasse à l'affût à des températures autour de 15°C (Tomkins et al. 2014).

Les études sur le comportement des tiques ont aussi démontré le géotropisme de celles-ci lorsque la température atteint 24°C (MacLeod 1935). Après les étés chauds, la plus grande part d'activité de recherche d'hôte d'*I. ricinus* se déroule à la fin de l'automne et dans une moindre mesure s'étend à l'hiver, avec une forte activité de nouveau au printemps. Au printemps, la reprise de l'activité des tiques ne s'amorce que lorsque la température maximale hebdomadaire dépasse les 7°C (MacLeod 1936; Perret et al. 2000).

L'effet de la sécheresse sur les tiques a été étudié par Jones et Kitron aux Etats-Unis (Illinois). Ils ont observé qu'après deux années de sécheresse, l'abondance d'*I. scapularis* diminue fortement (Jones and Kitron 2000). Les endroits d'établissement d'*Ixodes* comme le démontre les études de modèle de distribution spatiale de l'espèce aux Etats-Unis sont aussi dépendants de la température (Brownstein et al. 2003). De même, sur le pourtour méditerranéen, *I. ricinus* a aussi quasiment disparu du fait de la chaleur et du manque d'humidité.

Les tiques, de par leurs caractéristiques physiologiques –cuticule* composée de chitine- sont résistantes aux très basses températures. Elles peuvent survivre à des températures inférieures à - 14,4°C pendant 24h. Un effet létal sur les tiques à jeun ou les larves et les nymphes gorgées en diapause* n'est observé que lorsqu'un cumul de 30 jours à - 10°C est atteint (Gray et al. 2009), de même, des nymphes non gorgées restent en vie plusieurs jours dans un congélateur à -5°C (Herrmann and Gern 2013).

Le cumul des températures froides est délétère pour les nymphes et les larves gorgées en diapause* (Gray 1981; Knülle and Dautel 1997). A l'opposé, des températures supérieures à 35°C pendant deux semaines tuent l'ensemble des stases d'*I. ricinus*.

Ces données doivent aussi être mises en perspective avec le fait que la tolérance au froid est supérieure lorsque la tique est infectée, ou qu'elle présente des stock en lipides. De plus en période de mue, la tique est plus vulnérable à la dessiccation (Herrmann and Gern 2013; Herrmann et al. 2013). Si les températures de l'été ne sont pas suffisamment élevées pour finaliser le développement avant le début de l'hiver, les tiques survivront moins facilement à des périodes de gel modéré (Stafford 1994). Par ailleurs, l'effet létal des variations de température est aussi modulé selon la stase de la tique et son stock en lipides.

L'effet de la température est essentiel et montre une complexité très importante. Ainsi, la température prend part au contrôle de la phénologie* de la tique et à sa répartition mondiale. Mais ces effets sur la tique dépendent de la stase et des réserves en lipides.

Au total, l'implication de la température dans le cycle de vie et de comportement de la tique est manifeste. Pourtant celle-ci n'est sans doute pas l'unique paramètre. Ainsi, l'humidité relative de l'air, et par là même, son caractère dessiccant, joue également un rôle primordial.

b) L'humidité relative

I. ricinus est vulnérable à la dessiccation et ne sera pas rencontrée dans les endroits arides ou sans végétation (Obsomer et al. 2013). Le déficit de saturation en eau dans l'air*, corolaire de l'humidité relative de l'air, est souvent étudié (Perret et al. 2000, 2003; Morán Cadenas et al. 2007; Tagliapietra et al. 2011; Alonso-Carné et al. 2015; Brugger et al. 2016).

Pour comprendre la notion de déficit de saturation en eau dans l'air, il est utile d'introduire auparavant quelques notions :

- La pression de vapeur (e) qui est la densité en vapeur d'eau dans l'air,
- La pression de vapeur saturante (e_s) est la limite de densité en vapeur d'eau que l'air peut contenir à une température T ,
- L'humidité relative qui est égal au rapport e/e_s ,
- Le déficit de saturation en eau dans l'air ($e_s - e$) est la vapeur d'eau qui peut être ajoutée à celle déjà présente à une température T donnée. (www.mona.uwi.edu/geoggeol/courses/News%20Folder/4.%20Evaporation.pdf)

Le déficit de saturation en eau dans l'air affecte la balance hydrique en induisant une perte d'eau chez la tique (Estrada-Peña et al. 2013a). Pour maintenir leur balance hydrique, les tiques peuvent absorber activement de l'eau de l'atmosphère à l'aide de tissus spécialisés présents dans leur hypostome tant que

l'humidité relative ne dépasse pas une certaine valeur critique de 80-85%, comme cela a été mis en évidence chez *Amblyomma variegatum* (Gaede and Knülle 1997).

Randolph et Storey (1999) ont montré que le déficit de saturation en eau dans l'air (SD) - exprimé en mm de Hg : $SD = (1 - RH/100) * 4.9463 * \exp(0.0621 * T)$ où RH représente l'humidité relative moyenne journalière en % et T représente la température moyenne du jour en degré Celsius- est un facteur important pour les tiques. Des valeurs élevées de déficit de saturation en eau dans l'air stimule le mouvement des tiques et augmente leur perte d'énergie. En effet, pour maintenir leur balance hydrique, les tiques quittent leur lieu d'embuscade et retournent vers le couvert végétal afin de restaurer leur humidité (Perret et al. 2003; Gern 2008). Les déficits de saturation élevés ont ainsi un effet sur la survie des tiques et plus particulièrement sur les nymphes par rapport aux adultes. Si les tiques doivent fréquemment quitter leur lieu d'embuscade pour retrouver le sol et se réhydrater, elles vont perdre rapidement de l'énergie avant de trouver un hôte et vont mourir (Gern 2008).

Perret *et al.* (2000) ont montré que des déficits de saturation en eau élevés raccourcissent la durée de recherche d'hôte et augmente la mortalité des tiques. Aussi, lorsque le déficit de saturation en eau est élevé, la densité en tique est moindre (Perret et al. 2000).

En Suisse, il a été rapporté une diminution de l'activité des nymphes et des adultes d'*I. ricinus* lors d'un déficit en saturation (Gern 2008). Cependant, des données irlandaises montrent que toutes les stases actives d'*I. ricinus* recherchent l'hôte même lorsque le temps est chaud et sec dès lors que la végétation est appropriée c'est-à-dire qu'elle permet la réhydratation des tiques (Gray 2008). Il n'est donc pas incompatible d'observer des tiques à l'affût lors des périodes chaudes et sèches. Cependant, il est clair qu'en contrepartie la tique doit disposer d'un microclimat très adapté c'est-à-dire, comme nous l'avons vu, d'un couvert végétal pourvoyeur d'humidité.

Les études se sont aussi penchées sur le couple hygrométrie-température favorable aux tiques. Ainsi, il faudrait, pour la survie de la tique, pas moins de 80% d'hygrométrie pendant une période de temps étendue (Kahl and Knülle 1988). De même, il a été établi, qu'il lui faut pour sa survie au moins 70 % d'hygrométrie si la température est supérieure à 15°C (Ostfeld and Brunner 2015).

c) La photopériode*

L'existence de cellules photosensibles a été suspectée dès 1972 pour plusieurs espèces de tiques avec, parmi elles, *I. holocyclus* par Binnington (Binnington 1972). Pour *I. ricinus*, dans l'étude de Perret *et al.* (2003), les auteurs décrivent sur le côté dorso-latéral, derrière la coxa*- qui correspond à la hanche chez les *Ixodidae*- des larves, nymphes et adultes, la présence d'une vingtaine de cellules contenant des rhabdomères. Ces cellules joueraient un rôle dans la perception des changements d'intensité lumineuse qui déterminent les mouvements

des tiques durant la pénombre : l'activité de recherche d'hôte s'interrompant le plus souvent à l'obscurité (Perret et al. 2003).

La photopériode agit aussi sur la mue. Elle influence sa réalisation en la stimulant ou la ralentissant selon les conditions extérieures (Belozarov, 1982; Agustín Estrada-Peña, Gray, Kahl, Lane, & Nijhof, 2013).

Dans les régions tempérées froides, la température ainsi que la photopériode jouerait probablement un rôle très important dans l'émergence des tiques contrairement aux zones plus sèches où la disponibilité en eau serait là un facteur clé (Belozarov 1982; Estrada-Peña and de la Fuente 2014).

Par opposition, on regroupe sous le terme de « biotiques » d'autres facteurs importants pour le cycle et la vie de la tique. Ces facteurs sont la végétation, les hôtes (tels les micromammifères ou les cervidés), les prédateurs et les parasites de tiques.

2) Les facteurs biotiques

a) Les types de forêt

Les études de terrain ayant pour objet de déterminer une végétation plus appropriée pour les tiques ne parviennent pas toutes aux mêmes conclusions. Cependant, il est clairement montré de façon homogène qu' *I. ricinus* est principalement associée aux forêts d'arbustes et d'arbres caduques ainsi qu'aux forêts mixtes (Estrada-Peña 2001; Tack et al. 2012; Rizzoli et al. 2014; Bogovic and Strle 2015; Brugger et al. 2016).

Lindström, en Suède démontre une différence significative entre les forêts de hêtres versus les forêts de pins vis à vis de l'abondance en nymphes. Cette différence n'existerait pas entre les forêts mixtes, les forêts de chênes ou les forêts d'aulnes (Lindström and Jaenson 2003). Néanmoins, dans les aires avec de fortes pluies, *I. ricinus* peut aussi être présente à forte densité dans les forêts de conifères et dans les espaces ouverts comme les prairies (Boyard 2007).

Le type de forêt est vraisemblablement, au vu des résultats des études, un facteur difficile à considérer dans son influence sur la présence des tiques.

b) Les stades d'évolution de la forêt et la canopée

Durant une étude sur trois ans en Allemagne, Lauterbach a étudié sur plusieurs forêts les densités en nymphes à l'affût. Il en ressort que les forêts à arbres

jeunes sont plus à même de présenter de fortes densités en tiques que les forêts avec de grands arbres (Lauterbach et al. 2013). Ceci est opposé à ce que met en évidence Estrada-Peña en 2001. Dans son étude, l'abondance en tiques est déterminée comme dépendante de la canopée, laquelle serait plus importante dans les forêts de vieux arbres (Estrada-Peña 2001).

Les études récentes sur l'épidémiologie des tiques ne s'attardent plus beaucoup à détailler la végétation pour en déterminer si certaines espèces sont plus propices à l'établissement des tiques. De nouvelles approches (notamment basée sur les « remote sensing* data » tel le NVDI : Normalized Vegetation Difference Index) sont actuellement investiguées (Kalluri et al. 2007; Alonso-Carné et al. 2016; Estrada-Peña et al. 2016). Le NVDI est une mesure de l'activité photosynthétique d'une aire géographique (Ozdenerol 2015).

Intrinsèquement associée au type d'arbre, la litière est elle aussi un élément à considérer dans l'évaluation de l'abondance en tiques.

c) La litière/l'humus

La litière*, première couche du sol, composées de débris organiques, est influencée dans sa composition par les types d'arbres d'une forêt. Elle joue également un rôle important dans l'établissement des tiques sur un site (Hubálek et al. 2006). Elle est capitale pour la survie de celles-ci par la protection qu'elle leur octroie contre trois nuisances principales.

Les deux premières actions de la litière sont relatives à la protection contre le dessèchement. En effet, durant la recherche d'hôte –aussi dénommée « questing » ou quête- les tiques perdent de l'eau (Lees 1946). Cette eau, les tiques la récupèrent en redescendant par intervalles réguliers dans la litière (Lees 1946; Milne 1950; Lees and Milne 1951) où elles réabsorbent activement l'eau présente dans l'air (Rudolph and Knülle 1979; Kahl and Alidousti 1997). L'eau est donc un élément important pour la survie de la tique par cet aspect.

De plus, la litière peut jouer un rôle d'écran vis-à-vis des rayons du soleil. Elle peut donc être plus ou moins adaptée à l'établissement d'un microclimat propice aux tiques.

Le troisième effet de protection est relatif au froid. Au moment de la diapause* -ou pause d'hibernation-, les tiques restent dans la litière de feuilles ou dans les couches supérieures du sol (de 5-7 cm de profondeur) là où la température est plus clémente en comparaison de celle sur la végétation (Daniel, Cerny, & Dusbábek, 1972; Dusbábek, Daniel, & Cerný, 1971, Gigon, 1985).

La litière est donc un élément déterminant pour les tiques. De façon à mieux étudier ce facteur biotique et sa relation avec ces acariens, nous nous sommes penchés sur les caractéristiques de l'humus. (Article 1) Ainsi, nous allons détailler

ci-dessous des généralités sur la genèse du sol et sur les différents types d'humus qui existent.

(i) Généralités sur l'humus: principe de sa formation et description

Les feuilles et les autres organes aériens des arbres sont des sources de matière organique destinées à être transformés sous l'action de consommateurs présents dans le sol, tels les vers de terre, les arthropodes, les champignons et les bactéries. Ces organismes ont des actions dont les résultats peuvent être classés en trois grands types : la fragmentation, la digestion et l'incorporation.

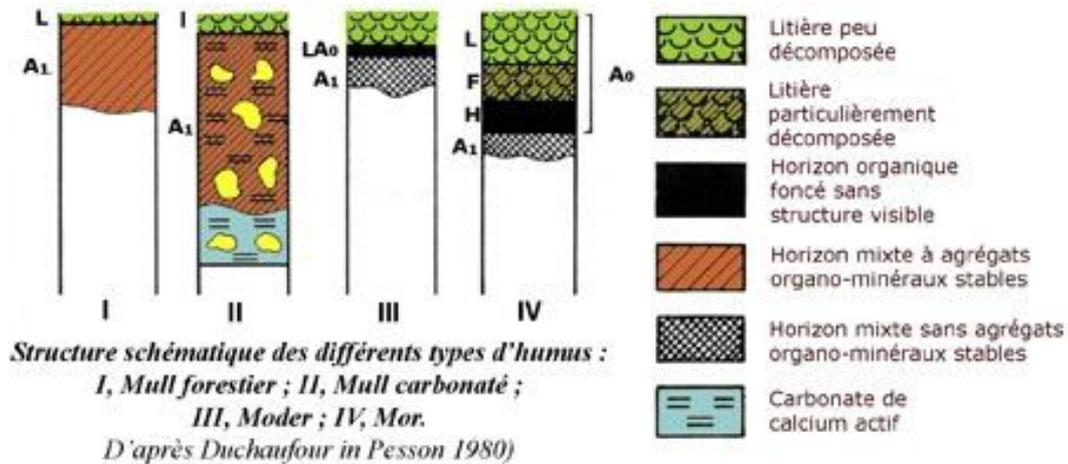
Le résultat de ces actions induit la transformation morphologique des retombées, c'est à dire des feuilles et des éléments aériens des arbres. *In fine*, des couches appelées « horizons* » s'individualisent sous l'action des différents organismes décomposeurs du sol. Leur succession définit les formes d'humus. L'humus d'un lieu est défini par globalement deux horizons : l'horizon O et l'horizon A. L'horizon O est un horizon holorganique formé de matières organiques plus ou moins transformées : c'est la litière. L'horizon A est organo-minéral, c'est à dire à matières organiques incorporées aux matières minérales. Ces matières minérales se forment à la surface du sol ou en dessous des horizons O (Jabiol et al. 2007).

(ii) Les différentes formes d'humus

Le mull est un type d'humus composé d'une couche de feuilles intactes (OL) au-dessus de l'horizon A. Le moder est un type d'humus caractérisé par une couche de feuilles fragmentées (OF) qui séparent l'horizon OL de l'horizon A (Figure 10) (Jabiol et al. 2007).

D'autres types d'humus existent comme le Mor (Figure 11). Ceux-ci n'ont pas été retrouvés au cours de notre étude de terrain. Ils sont caractéristiques des tourbières et présentent une activité biologique très intense.

Figure 11. Structure schématique des différents types d'humus. (D'après Duchaufour, 1980).



Dans l'article n°2, nous avons étudié ce facteur biotique et son association éventuelle avec la densité en nymphes sachant que celui-ci a déjà été investigué. Les études sur le sujet sont encore éparses, surtout en France (Tack et al. 2013; Vourc'h et al. 2016). Ceci renforce donc l'intérêt de s'y pencher.

(iii) La texture* du sol

Les nymphes d'*I. ricinus* sont capables de se déplacer de son lieu de quête d'hôte pour trouver un abri dans la litière ou dans les fentes du sol (Aeschlimann 1972). Lorsque l'on observe le sol sur lequel des prélèvements de tiques sont effectués, on retrouve ces acariens sur des types très variés : sols limoneux avec du calcaire, sols argileux* avec du calcaire ou du schiste, sols sableux faiblement acides, etc ... (Obsomer et al. 2013). Les sols à texture* sableuse* ou sablo-limoneuse sur des roches sédimentaires seraient associés à la présence des tiques (*I. scapularis* selon l'étude de Guerra dans le Wisconsin, Etats-Unis) (Guerra et al. 2002), alors que dans l'étude de Vourc'h et coll. en 2016 (*I. ricinus* en forêt de Sénart, France) , ce sont les textures argileuse et limoneuse qui sont statistiquement associées à la densité en nymphes (Vourc'h et al. 2016).

d) Les animaux-hôtes

Sur l'ensemble de son aire de répartition, *I. ricinus* a été observée sur plus de 300 espèces animales différentes (Anderson 1991). Ces animaux peuvent être à sang chaud ou à sang froid (Swart et al. 2014). On inclut les lézards, les passereaux, les petits rongeurs et les mammifères plus grands comme les écureuils, les lagomorphes, les hérissons, les sangliers sauvages, les chevreuils et le bétail.

Les stases immatures sont retrouvés sur des animaux de toute taille, des mammifères aux oiseaux, en passant par les ongulés, alors que les stases adultes se nourrissent presque exclusivement sur les grands mammifères tels les chevreuils ou le bétail (Mannelli et al. 2011; Obsomer et al. 2013).

Les hôtes de maintien de la population de tiques sont des animaux servant de ressource alimentaire pour les tiques : ce sont sur eux que se gorgent les différentes stases de la tique. Il s'agit des cervidés et des micromammifères.

(i) La notion de réservoir*

La notion de réservoir est importante mais est à différencier de celle d'hôte de gorgement. Ainsi, tout hôte permet le gorgement de la tique, mais les éventuelles bactéries injectées au moment de la piqûre ne survivront pas forcément au sein de l'hôte. En effet, pour être un réservoir pour le complexe bactérien *B. burgdorferi* sl, une espèce animale doit posséder quatre caractéristiques :

- (1) Nourrir des tiques (parfois occasionnellement et donc être au moins un hôte occasionnel),
- (2) Acquérir l'agent infectieux au moment de la piqûre de tique,
- (3) Laisser se multiplier le pathogène et que sa survie soit possible dans le réservoir,
- (4) A partir de l'hôte, le pathogène doit infecter des tiques naïves (Kahl et al. 2002; Pichon et al. 2006).

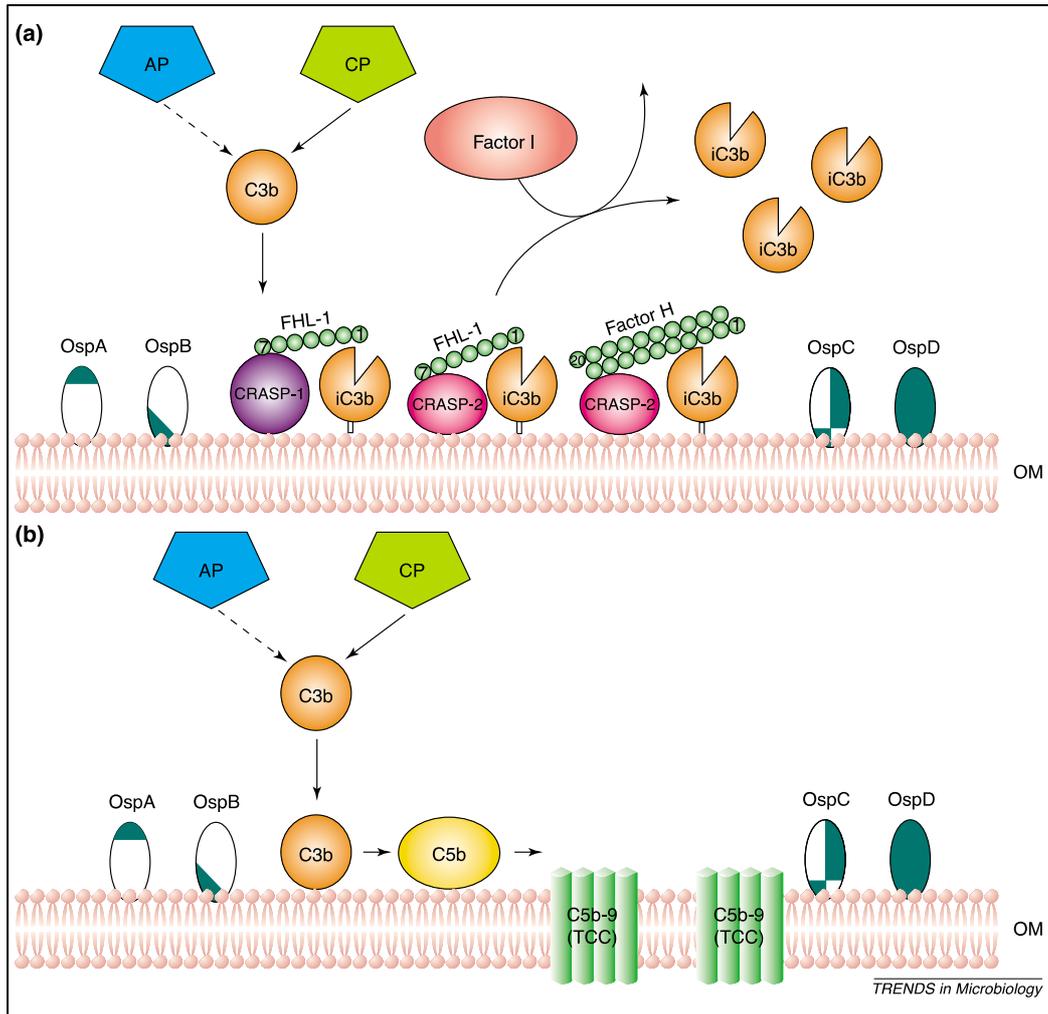
Pour mettre en évidence la possibilité du passage de *B. burgdorferi* d'un hôte à une tique lors d'un gorgement de celle-ci, le xénodiagnostic est une technique intéressante à réaliser. Il s'agit de prendre un animal infecté par *B. burgdorferi* sl, de laisser des larves se gorger sur lui et de tester l'infection des nymphes issues de la mue* de la larve par *B. burgdorferi* sl. Si celles-ci portent le pathogène, l'hôte sera alors considéré comme un réservoir du pathogène. Ainsi, la notion de réservoir et la notion de compétence* pour *B. burgdorferi* sl. sont étroitement liées (Ostfeld et al. 2014). Un hôte est dit compétent lorsque le système du complément n'est pas borrelécide.

La tique peut même être considérée comme le réservoir principal pour certains pathogènes –par exemple pour les *Babesia* spp. (Chauvin et al. 2009) au contraire de *B. burgdorferi* ou d'*Anaplasma phagocytophilum*. En effet, lorsqu'une transmission transovarienne* a lieu, alors la tique permet, à elle seule, le maintien du pathogène dans l'environnement. Or, pour *B. burgdorferi*, la transmission transovarienne* est faible (Piesman et al. 1986; Patrican 1997) ; la tique n'en est donc pas le réservoir principal.

(ii) Réservoir* animal et immunité : l'activité borricide du complément

L'activité lytique du complément sur *B. burgdorferi* est liée à la voie alterne. Bien que les différentes espèces de *B. burgdorferi* lient le fragment C3, la résistance et la sensibilité des souches diffèrent au niveau de la fixation du C5b-C9. La résistance au complément est médiée par la fixation de deux molécules de contrôle du complément : le facteur H et le facteur H1 like/reconnectine factor. De plus, cinq molécules de surface des *B. burgdorferi* ont été décrites comme liant des molécules de contrôle du complément, empêchant la création du complexe d'attaque membranaire (Kurtenbach et al. 2002). (Figure 12)

Figure 12. Schéma de l'activation du complément par *Borrelia burgdorferi* sl (Kurtenbach *et al.* 2002)



(a). Les souches résistantes au complément expriment une protéine de surface de régulation du complément (appelée CRASP : Complement -Resistant Acquiring Surface Protein) qui lie spécifiquement le facteur FHL-1 et le facteur H d'une espèce animale. Ce mécanisme prévient la lyse par la voie alterne du complément (AP).

(b). Les souches sensibles ne fixent pas la protéine de surface de régulation du complément et sont lysées par le complexe terminal du complément.

OM : outer membrane ; TCC : terminal complement complex ; AP : Alternative Pathway ; CP : classical pathway

De nombreuses études éco-épidémiologiques ont eu pour sujet les réservoirs des espèces du complexe bactérien *B. burgdorferi* sl. Le rôle de réservoir pour *B. burgdorferi* a été mis en évidence chez moins de 50 espèces animales (Gern *et al.* 1998).

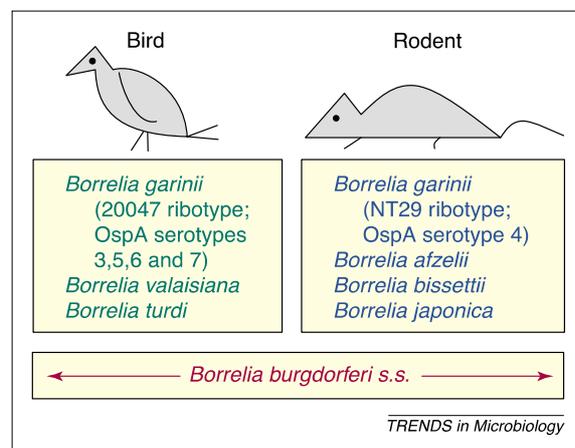
Selon l'espèce, du fait de l'activité possiblement borricide du complément envers certaines souches, il existe une association entre le type de réservoir et l'espèce de *Borrelia burgdorferi* sl qui lui est principalement associé (Figure 13).

Les rongeurs sont des hôtes compétents notamment pour *B. afzelii* (Hanincová et al. 2003; Degeilh 2007); *B. burgdorferi* ss semble avoir également pour réservoir les rongeurs, mais aussi les oiseaux, et serait donc plus ubiquiste (Kurtenbach et al. 2002). Parmi les lagomorphes, le lièvre (*Lepus* spp.) est un bon réservoir à l'inverse du lapin commun (ou lapin de Garenne : *Oryctolagus cuniculi*) (Matuschka et al. 2000).

Les cervidés (de même que le bétail) ne sont pas des hôtes compétents pour *B. burgdorferi* sl, alors qu'ils contribuent significativement –comme nous le verrons plus loin- à la multiplication de la population vectorielle (Telford et al. 1988; Matuschka et al. 1993; Kurtenbach et al. 2002).

Les oiseaux sont considérés comme le réservoir principal de *B. garinii* or en Europe, *B. garinii* est la seconde espèce induisant des borrélioses de Lyme après *B. afzelii* (Wilske 2003). Leur système du complément est borrelicide pour certaines espèces de *B. burgdorferi* sl mais faiblement pour *B. garinii*, *B. valaisiana* et *B. turdi*, qui sont peu ou non pathogènes pour l'Homme. De plus, leur température corporelle –plus élevée que les autres animaux- serait propice préférentiellement au développement de *B. garinii* (Kurtenbach et al. 2002; Comstedt et al. 2011; Heylen et al. 2013).

Figure 13. Schéma synthétique des spécificités d'hôte selon les espèces de *B. burgdorferi* sl (Kurtenbach et al. 2002)



(iii) Les micromammifères

Les micromammifères regroupent les espèces ayant en commun leur petite taille. On retrouve principalement les rongeurs (mulots, campagnols) et les insectivores (musaraignes et hérissons). On y inclut aussi les lagomorphes.

Parmi les rongeurs, on compte en premier lieu le campagnol (*Myodes glareolus*) et les mulots sylvestres et à collier (*Apodemus sylvaticus* et *A. flavicollis*) (Humair et al. 1993) et l'écureuil roux (*Sciurus vulgaris*) qui sont des hôtes fréquents

des tiques (Humair and Gern 1998). Les hérissons (*Erinaceus*) et les musaraignes (*Sorex*, *Neomys*), comptent parmi les hôtes réservoirs de *B. burgdorferi* (Humair and Gern 1998). Dans le tableau ci-dessous sont synthétisés (Tableau II) les compétences* des micro-mammifères pour *B. burgdorferi* sl.

Tableau II. Les animaux et leur rôle dans l'écologie de *B. burgdorferi* sensu lato

	Nom latin	Compétence	Source
Mammifères			
Le lapin européen	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Incompétent	(Matuschka et al. 2000)
Les mulots du groupe <i>Apodemus</i>	<i>A. sylvaticus</i> , <i>A. flavicollis</i> , <i>A. agravius</i>	Réservoir	(Matuschka et al. 1992; De Boer et al. 1993; Humair et al. 1993; Gern et al. 1994)
Le campagnol roussâtre	<i>Myodes glareolus</i>		
Les écureuils	<i>Sciurus carolinensis</i> <i>Sciurus vulgaris</i>		
Le loir	<i>Glis glis</i>		
Le lérot	<i>Eliomys quercinus</i>		
Les lièvres	<i>Lepus europaeus</i> <i>Lepus timidus</i>		
Les musaraignes	<i>Sorex minutus</i> <i>Sorex araneus</i> <i>Neomys fodiens</i>		
L'hérisson	<i>Erinaceus</i> spp.		
Oiseaux			
Le merle	<i>Turdus</i> spp.	Réservoir	(Humair et al. 1998)
Le rouge-gorge	<i>Erithacus rubecula</i>		
Le faisan	<i>Phasianus colchicus</i>		

Les populations de rongeurs peuvent donc impacter les taux d'infection et l'abondance en tiques. Ce faisant, les fluctuations dans les densités en rongeurs sont des facteurs importants pour le risque de maladie de Lyme (Heyman et al. 2010).

(iv) Les ongulés

Les ongulés qui comptent les cervidés, les ovins, les ruminants, les caprins et les porcins, sont des hôtes nourrissant de grandes quantités de tiques dans la nature. En effet, les ongulés représentent l'hôte principal ainsi que le plus productif pour les tiques adultes (Anderson 1988). La population d'animaux à bois-appartenant à la famille des ongulés- est donc un élément essentiel au maintien de la population de tiques. En effet, le gorgement des adultes s'effectue principalement sur ces hôtes or ce dernier va rendre possible la ponte des œufs et permettre l'amplification de la population vectorielle (Lane et al. 1991).

La population en gibier est étudiée du fait de deux éléments : son impact sur la présence des tiques et son influence sur la prévalence de *Borrelia*. L'impact du grand gibier a été étudié et mis en évidence lors des essais de diminution ou d'éradication de la quantité de cervidés (Daniels et al. 1993; Ginsberg et al. 2004; Rand et al. 2004). Plusieurs stratégies ont été testées. L'éradication ainsi, a été réalisée sur certains territoires. Par exemple, sur une île isolée de la côte du Maine (Etats-Unis), l'éradication des cerfs a été pratiquée et a été suivie d'une diminution de la quantité d'adultes et de nymphes d'*I. scapularis* (Rand et al. 2004). Clôturer un périmètre est aussi un moyen de préserver un lieu des cervidés et d'en étudier l'effet sur la population de tiques (Gilbert et al. 2012).

L'exclusion des ongulés tels le chevreuil (*Capreolus capreolus*) et le cerf (*Cervus elaphus*) influe sur l'abondance, en particulier des nymphes mais aussi celle des larves et des adultes (Deblinger et al. 1993; Stafford et al. 2003; Ruiz-Fons and Gilbert 2010). La population de nos forêts en ongulés et plus particulièrement celle en cervidés, est un élément à prendre en compte dans la gestion du risque acarologique* (Piesman 2006). Cependant, il est intéressant de noter que l'effet de l'exclusion des cervidés d'un espace influe soit positivement, soit négativement la quantité en tiques, ceci étant « échelle-dépendant » (Perkins et al. 2006), dépendant du niveau d'exclusion des cervidés ou des circonstances. Ainsi, des modélisations des populations en tiques suggéreraient que l'augmentation de la densité en cervidés lorsque celle-ci est à un niveau faible, diminuerait la population de tiques à l'affût car celles-ci trouveraient un hôte plus facilement (Dobson and Randolph 2011). Cependant, d'autres modèles concluent que la densité en cervidés n'a pas d'influence sur le contrôle des populations de tiques dans la plupart des circonstances (Buskirk and Ostfeld 1995; Ostfeld et al. 2006a).

Nous l'avons déjà indiqué, les cervidés ne sont pas des hôtes compétents pour *B. burgdorferi* sl (Telford et al. 1988; Matuschka et al. 1993; Kurtenbach et al. 2002). Ainsi, la prévalence de *B. burgdorferi* sl chez les tiques est liée négativement à la

densité en cervidés. Cette dernière aurait tendance à la diminuer (Perkins et al. 2006; Rosef et al. 2009). De ce fait, un effet de dilution du pathogène dans l'environnement du fait de la présence de cervidés a été suggéré. A partir d'un certain seuil de densité en hôte non compétent, ces hôtes incompétents que sont les cervidés pourraient jouer un rôle dans la transmission de la borréliose de Lyme (Mannelli et al. 2011).

In fine, les associations entre l'incidence des cas de borréliose de Lyme et la population en cervidés ont aussi été investiguées. Tout comme les études sur les densités en tiques ou sur la prévalence de *Borrelia* chez les tiques, celles relatives aux densités en cervidés et aux cas de maladie de Lyme, apportent des arguments contraires quant à l'effet de la réduction de la population en cervidés. Ainsi, deux études, celles de Garnett et Levi établissent une non-corrélation entre l'incidence de la borréliose de Lyme et la réduction de la population en cervidés (Garnett J.M, Neeta P. Connally, Kirby C. Stafford, III 2011; Levi et al. 2012). Le risque de borréliose de Lyme serait, de façon majoritaire, relié aux fluctuations des populations de petits mammifères (Levi et al. 2012).

L'observation opposée a été faite par Kilpatrick et coll. D'après son étude publiée en 2014, il y a vraisemblablement association entre la densité en cervidés, l'abondance des tiques et les cas humains de borréliose de Lyme sur une période de 13 ans : le nombre de cas reportés de borréliose de Lyme était fortement corrélé à la densité en cervidés, la réduction par la chasse de 80 % des cervidés induisent une réduction des cas de borréliose de Lyme (Kilpatrick et al. 2014).

(v) Les oiseaux

Parmi les oiseaux, plusieurs espèces ont été identifiées comme impliquées dans l'écologie de la maladie de Lyme dans des études entreprises au Nord de l'Europe et en Suisse. Les espèces qui semblent jouer un rôle important sont principalement le merle (*Turdus merula*), la grive musicienne (*Turdus philomelos*) et le rouge-gorge (*Erythacus rubeca*). Ces oiseaux sont régulièrement infestés par des nymphes d' *I. ricinus* et possèdent un rôle démontré dans le maintien de la bactérie (*B. valaisiana*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*) (Poupon et al. 2006; Taragel'ová et al. 2008; Marsot et al. 2012). Les oiseaux migrateurs, quant à eux, sont des disséminateurs des tiques et du pathogènes sur de longues distances (Hildebrandt et al. 2010).

Les tiques sont présentes sur Terre depuis des millions d'années. Peu de facteurs affectent significativement leur survie. Parmi les menaces potentielles que les tiques peuvent rencontrer, nous allons développer celle de leurs prédateurs. Leur connaissance est en effet un élément pouvant entrer en jeu dans une stratégie

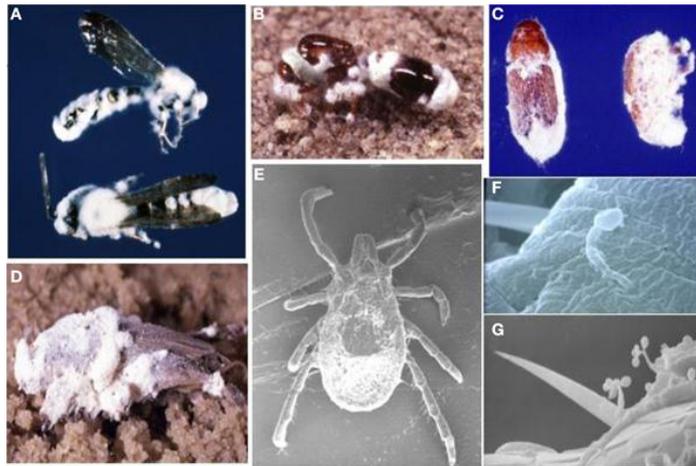
d'une lutte anti-vectorielle. Tout en gardant à l'esprit que certaines ne resteront, sans doute, qu'à un stade très expérimental.

e) Les prédateurs

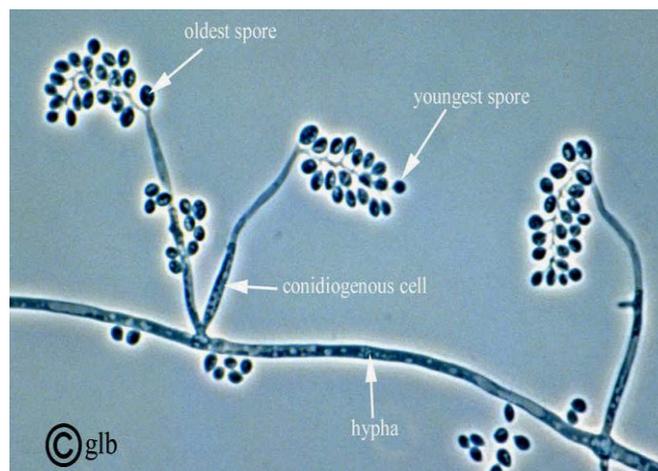
L'écologie des tiques est aussi déterminée par la présence de prédateurs ou de parasites de tiques. L'impact global des prédateurs et des parasites sur la mortalité des tiques est peu connu. En général, on considère que les autres causes de mortalité (habitat peu favorable, non-rencontre avec l'hôte) sont prépondérantes, même s'il n'existe pas d'étude précise sur le sujet. Les ennemis traditionnels des tiques incluent les oiseaux insectivores (tel l'oiseau africain *Buphagus* spp.), les guêpes parasitoïdes (*Ixodiphagus hookeri*), les nématodes, les bactéries comme *Bacillus thuringensis* et les champignons Deutéromycètes (*Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*) (Zhioua et al. 1999; Ramos et al. 2015)- On retrouve *Ixodiphagus hookeri* en Europe, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* sont de distribution large. De plus, les mammifères et les oiseaux, typiquement, consomment des tiques durant leur toilette (c'est à dire pendant le « grooming »). C'est un facteur de diminution significative de la charge en tiques qui dépend du comportement animal (Keesing et al. 2009).

Plusieurs approches ont été testées pour utiliser ces agents biologiques afin de contrôler l'abondance des tiques. Le premier moyen pour éradiquer les tiques au sein d'un environnement est l'épandage d'insecticides-acaricides. Ceux traditionnellement utilisés sont hautement létaux pour les tiques. De plus, l'épandage est généralement assez efficace pour réduire le nombre de tiques (Ostfeld et al. 2006b). L'usage de ces produits présente l'inconvénient d'être nocif pour d'autres espèces et aussi pour l'Homme par la pollution des sols et des eaux. D'autres approches ont été testées pour éradiquer les tiques. Par exemple, il est envisagé d'utiliser les champignons entomopathogènes cités plus haut afin de contrôler l'abondance des tiques. Leur recours permettrait de réduire la consommation d'agents chimiques insecticides (carbamates, organophosphorés et pyréthroïdes) ainsi que leur épandage dans l'environnement (Benjamin et al. 2002)

Figure 14. Aspects macroscopiques et microscopiques de *Beauveria bassiana*



B. bassiana a une exceptionnelle étendue d'hôtes qui comprend la classe des arthropodes, incluant les insectes ; les guêpes (A), les fourmis de feu (B), les scolytes (C), les criquets (D) aux arachnides comme les mites et les tiques (E). La pénétration de la cuticule (F) ainsi que la conidiogénèse à partir des cadavres d'hôtes (G) sont aussi montrés ci-dessus. (Images courtesy of D. Boucias and N. O. Keyhani).



Aspect microscopique de *Beauveria bassiana*

Source <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>

L'ensemble de ces facteurs biotiques* et abiotiques* a un impact sur l'abondance des tiques et sur la prévalence de *B. burgdorferi* sl (ou d'autres pathogènes).

f) La notion de biodiversité

L'intrication et la multitude des différentes espèces vivantes au sein d'une unité spatiale sont le reflet de sa biodiversité.* Plusieurs modèles mathématiques considèrent qu'il y a une relation entre biodiversité et risque de borréliose de Lyme. L'un d'eux établit que l'addition d'hôtes non compétents à une communauté

théorique de base peut réduire la transmission de la borréliose de Lyme (Buskirk and Ostfeld 1995). De même, une autre étude basée sur un modèle mathématique à partir de données empiriques a montré que le taux d'infection des nymphes diminue à mesure que le nombre d'espèces d'hôtes non compétents augmente (LoGiudice et al. 2003; Ostfeld 2009). La biodiversité est donc souvent mise en avant comme un facteur favorable de dilution du pathogène *B. burgdorferi* sl dans l'environnement (Wood and Lafferty 2013).

Cette notion de biodiversité peut être complétée par la notion de fragmentation*. En effet, la fragmentation* de la forêt est souvent affirmée comme étant négativement corrélée avec la biodiversité (LoGiudice et al. 2003).

g) La fragmentation du paysage

La modification du paysage, en particulier sa fragmentation* a été décrite (notamment aux Etats-Unis) comme un facteur d'augmentation du risque de borréliose de Lyme (Estrada-Pena 2003; Brownstein et al. 2005). Par exemple, aux Etats-Unis, l'extension de zones urbaines très peuplées au contact de forêts semble être une cause de l'émergence de celle-ci (Spielman et al. 1985; Allan et al. 2003). Le développement de l'activité humaine crée un nombre important de parcelles de forêts entrecoupées d'îlots résidentiels. Ceci induit, selon ces études, une augmentation de l'exposition humaine à la piqûre de tique et donc du risque acarologique* (Brownstein et al. 2005). Plus précisément, la corrélation entre la modification du paysage urbain et l'augmentation de l'incidence des cas de borréliose de Lyme est sous-tendue par plusieurs hypothèses explicatives :

-Premièrement, la fragmentation* du paysage induit une forte densité de cervidés -en particulier le grand Cerf de Virginie aux Etats-Unis (*Odocoileus virginianus*). Ces espèces profitent de la proximité des habitations. La fragmentation est, en effet, pourvoyeuse d'écotones* c'est à dire de zones de transition géographique entre deux écosystèmes, qui elles-mêmes sont sources de fourrage adapté pour les cervidés (présence de plantes ornementales qui correspondent à une nourriture pour les cervidés en période hivernale (Barbour and Fish 1993; Frank et al. 1998). De plus, la fragmentation réduit la pression de chasse. Elle est donc un élément favorable à l'amplification de la densité en tiques, par la promotion de l'hôte privilégié pour le repas sanguin de l'adulte femelle.

- La deuxième explication à cette corrélation est l'augmentation de la prévalence en tiques infectées consécutive à la réduction de la diversité des espèces de mammifères et d'oiseaux (Andren 1994) et à son effet de système de transmission fermé induit. La fragmentation* peut augmenter la circulation du pathogène dans les populations de réservoir* et de tiques au sein des populations concentrées dans des îlots. Il y a mise en place d'un système que l'on peut assimiler

à une boucle auto-entretenu dans laquelle la prévalence peut être élevée (Estrada-Peña and de la Fuente 2014).

Des indices de fragmentation du paysage ont donc été élaborés. Parmi eux, la taille des parcelles ou des indices d'isolement ont montré un lien positif avec la densité en tiques et la prévalence de l'infection (Allan et al. 2003).

L'abondance de la population en tique n'est qu'un élément du risque de contracter une borréliose de Lyme.

La prévalence du pathogène chez ce vecteur*est le deuxième aspect capital dans l'évaluation du risque de borréliose de Lyme.

III) La tique comme vecteur de pathogènes

Un vecteur est un être vivant qui, à l'occasion de relations écologiques, acquiert un pathogène sur un hôte vivant et le transmet ensuite à un autre hôte (Toma et al. 1991). En entomologie médicale, le vecteur se définit comme un arthropode, insecte ou acarien, transmettant de façon active un pathogène, le plus souvent par piqûre hématophage*.

La tique acquiert ses pathogènes au cours du repas sanguin. Ceux-ci se retrouvent en premier lieu dans l'intestin de la tique, puis peuvent migrer dans différents organes. Pour que la tique opère son rôle de vecteur, le pathogène ingéré doit subsister après la transformation transstadiale (c'est à dire la mue). La transmission du pathogène à partir de la tique se fait ensuite par transmission salivaire (cas de *Borrelia*).

En Europe, *I. ricinus* est le vecteur de plusieurs agents de zoonoses*, incluant la borreliose de Lyme, le virus de l'encéphalite à tique, l'anaplasmose due à *Anaplasma phagocytophilum*, et des bactéries du genre *Rickettsia* (causant la fièvre boutonneuse méditerranéenne) (Brouqui et al. 1995; Ferquel et al. 2006; Heyman et al. 2010). *I. ricinus* transmet aussi *Babesia divergens* (l'agent causal de la babésiose chez le bétail et d'une infection engageant le pronostic vital chez les splénectomisés), *B. microti*, *B. venatorum* (Wielinga et al. 2009), la tularémie due à *Francisella tularensis* et le virus louping ill (Piesman and Eisen 2008; Coipan et al. 2013; Reye et al. 2013).

(A) Les agents pathogènes de la borreliose de Lyme : *Borrelia burgdorferi* sl

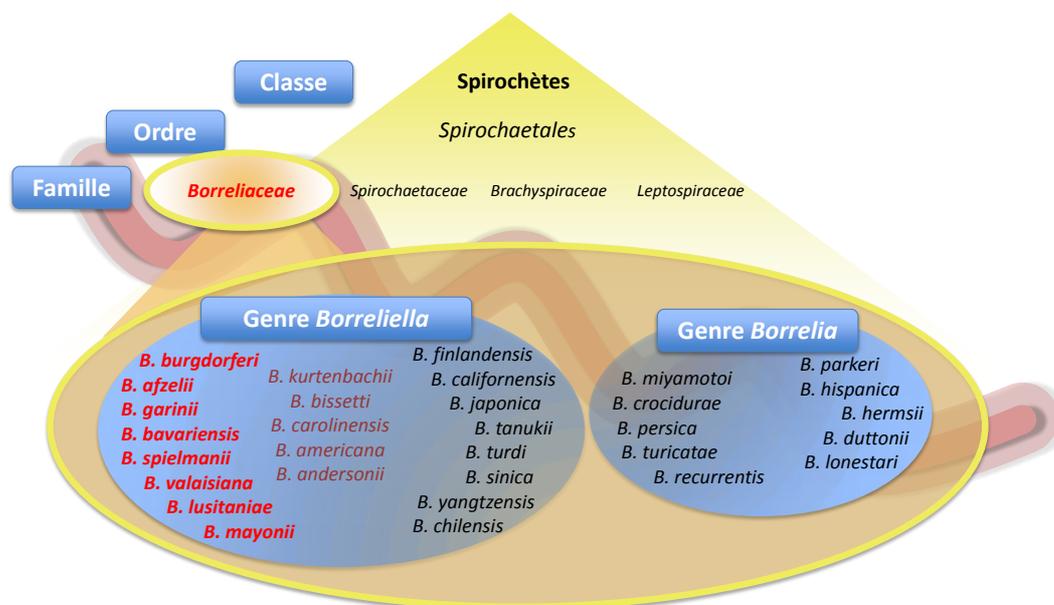
Les bactéries responsables de la borreliose de Lyme appartiennent au complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl). Ce complexe appartient à l'ordre des

Spirochaetales, la famille des *Spirochataceae*. Cet ordre comprend aussi la famille des *Leptospiraceae*, celle des *Brachyspiraceae* et celle des *Spirochaetaceae*. Dans la famille des *Spirochaetaceae*, on distingue le genre *Treponema* et le genre *Borrelia* (Schramm et al. 2013).

Chez *Borrelia*, on distingue celles associées à des fièvres récurrentes, et celles associées à la borréliose de Lyme.

En 2014, un changement taxonomique du genre *Borrelia* a été proposé par Adeolu et Gupta. Se basant sur des marqueurs moléculaires, des analyses sur l'identité de nucléotides du génome de *Borrelia* et sur la phylogénie des espèces basée sur les séquences d'ARN 16S, les auteurs proposèrent de séparer le genre *Borrelia* en deux genres : le genre *Borrelia*, pour les agents des fièvres récurrentes et *Borreliella*, nouveau genre contenant les agents causals de la borréliose de Lyme (Adeolu and Gupta 2014).

Figure 15. Position taxonomique des espèces du genre *Borrelia* modifié adapté d'après (Schramm et al. 2013)



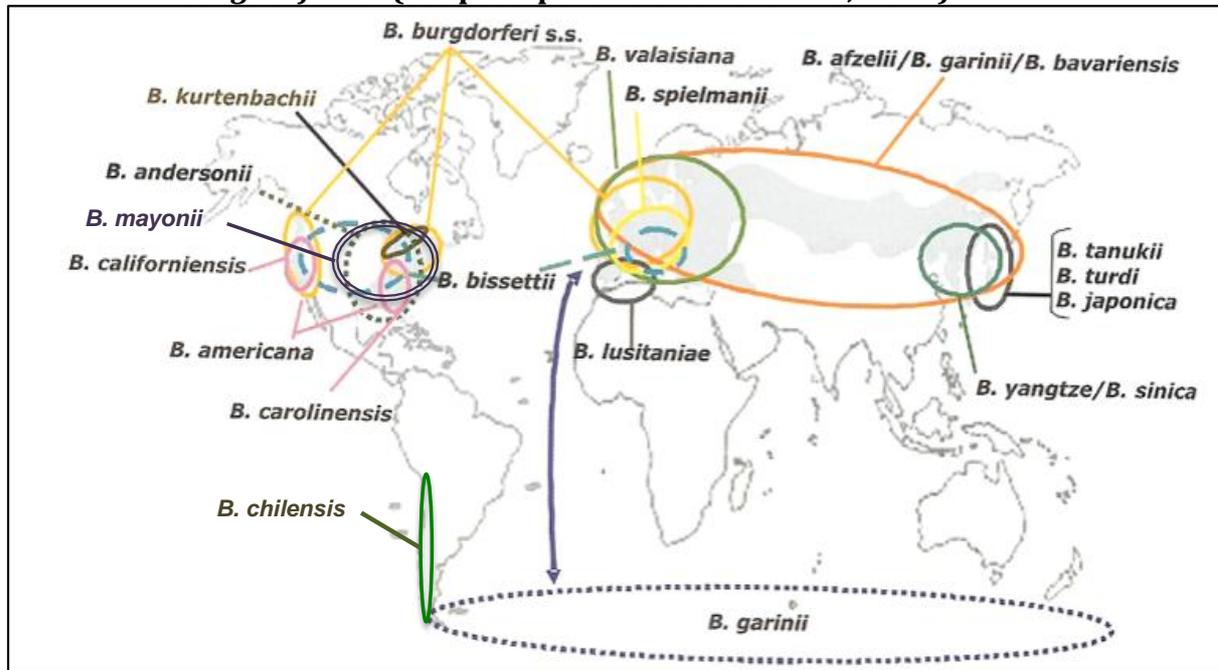
NB: Les espèces en rouge sont celles pour lesquelles des infections humaines ont été actuellement rapportées.

Parmi les espèces incluses dans le complexe *B. burgdorferi* sl, on distingue actuellement vingt-deux espèces (Margos et al. 2011; Ivanova et al. 2014; Pritt et al. 2016a). Ces espèces peuvent être divisées en deux groupes :

- le premier comprend les espèces n'ayant pas été actuellement isolées chez l'Homme : ce sont *B. americana*, *B. andersoni*, *B. californensis*, *B. carolinensis*, *B. japonica*, *B. tanuki*, *B. turdi*, *B. yangtze*, *B. chilensis* (Rudenko et al. 2011; Ivanova et al. 2014).

-les autres espèces par contre, qui incluent *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. burgdorferi* ss, *B. bavariensis*, *B. valaisiana*, *B. bisettii*, *B. lusitaniae*, *B. finlandensis*, *B. kurtenbachii*, et *B. mayonii* ont montré un potentiel de pathogénicité (Mannelli et al. 2011; Rudenko et al. 2011; Pritt et al. 2016b).

Figure 16. Répartition mondiale des espèces du complexe bactérien *Borrelia burgdorferi* sl (adapté à partir de Sonenshine, 2014)



Les bactéries du complexe *B. burgdorferi* sl sont présentes dans l'intestin des tiques lorsque celles-ci attendent leur hôte sur la végétation. La présence des *Borrelia* dans l'intestin a longtemps fait penser que leur transmission à l'hôte avait lieu par régurgitation du contenu intestinal. On sait que ce n'est pas le cas. En effet, dès que la tique a enfoncé son rostre dans son hôte et qu'elle débute son repas, les bactéries commencent à migrer de l'intestin de la tique vers les glandes salivaires, d'où elles seront transmises à l'hôte par la salive. Chez *I. ricinus*, cette migration va prendre quelques heures ce qui explique que la tique ne transmette pas immédiatement les bactéries lorsqu'elle commence son repas sanguin (Gern 2004; Boulanger 2009; Cook 2015). En Europe, Kahl *et al.* (1998) ont montré que la tique ne transmettait *Borrelia* que 16 heures après avoir commencé son repas ; ceci n'a cependant été mis en évidence que chez les gerbilles (Kahl et al. 1998). On considère donc que la transmission s'effectue fréquemment en moins de 24h (Cook 2015). Crippa *et al.* (2002) ont montré que ce laps de temps dépend aussi de l'espèce bactérienne infectant la tique. Ainsi, *B. afzelii* est transmise pendant les 24 premières heures du repas alors qu'il faut plus de 48 heures à *B. burgdorferi* ss pour être transmise (Crippa et al. 2002).

1) Le génome de *B. burgdorferi* sl, transmission et interactions

Le génome de *Borrelia burgdorferi* sl est long d'environ $1,5 \cdot 10^6$ paires de bases (Fraser et al. 1997) et comprend un chromosome linéaire et 21 plasmides linéaires ou circulaires, l'ensemble contenant 1780 gènes (Barbour 1988; Casjens et al. 2000). Les plasmides représentent 40 % du génome. Le génome de *Borrelia* présente deux singularités. Elle possède à la fois un chromosome linéaire et des plasmides linéaires - alors que la majorité des espèces bactériennes ont un chromosome circulaire et ne possède pas de chromosome linéaire. *B. burgdorferi* sl est l'espèce au sein du règne bactérien qui présente le plus grand nombre de plasmide (> 20 plasmides pour la souche B31) (Casjens et al. 2000; Stewart et al. 2005).

Une autre partie du chromosome linéaire code pour des protéines impliquées dans des processus fondamentaux comme la réplication, la transcription, le métabolisme énergétique. 40 % des gènes du chromosome linéaire de *Borrelia* n'ont pas de fonction biologique connue. Chez *Borrelia*, les gènes codant pour des voies de biosynthèses (cycle de Krebs, phosphorylation oxydative) sont absents (Casjens 2000).

Seul 8 % des gènes portés par les plasmides codent des protéines dont la fonction biologique est connue. Ce sont des protéines de surfaces.

Plusieurs protéines de *Borrelia* ont été identifiées comme réalisant des interactions entre des ligands soit de l'hôte, soit de la tique (Guo et al. 1995; Pal et al. 2000; Hellwage et al. 2001; Kraiczy et al. 2001; Neelakanta et al. 2007). Ainsi, *B. burgdorferi* sl a développé des stratégies pour survivre à la fois chez l'arthropode vecteur et chez le réservoir hôte. Les spirochètes expriment certains gènes en fonction de leur environnement. Certains de ces gènes produits réalisent une interaction directe avec les protéines de la tique, alors que d'autres se lient ou interagissent avec les protéines de l'hôte (Hovius et al. 2007).

2) Les protéines de *Borrelia burgdorferi* sl

Les protéines de surfaces de *Borrelia* peuvent jouer le rôle d'adhésine en se liant à la matrice extra-cellulaire. Il s'agit de BBK32 et RevA/RevB (capable de lier la fibronectine), de ErpX et Bmps (capable de lier les laminines), P66 (capable de lier la sous-unité $\beta 3$ des intégrines) ou encore les decorin-binding protein DbpA et DbpB (capable de se lier directement avec les fibres de collagène par leur interaction avec la décorine) (Coburn et al. 2013).

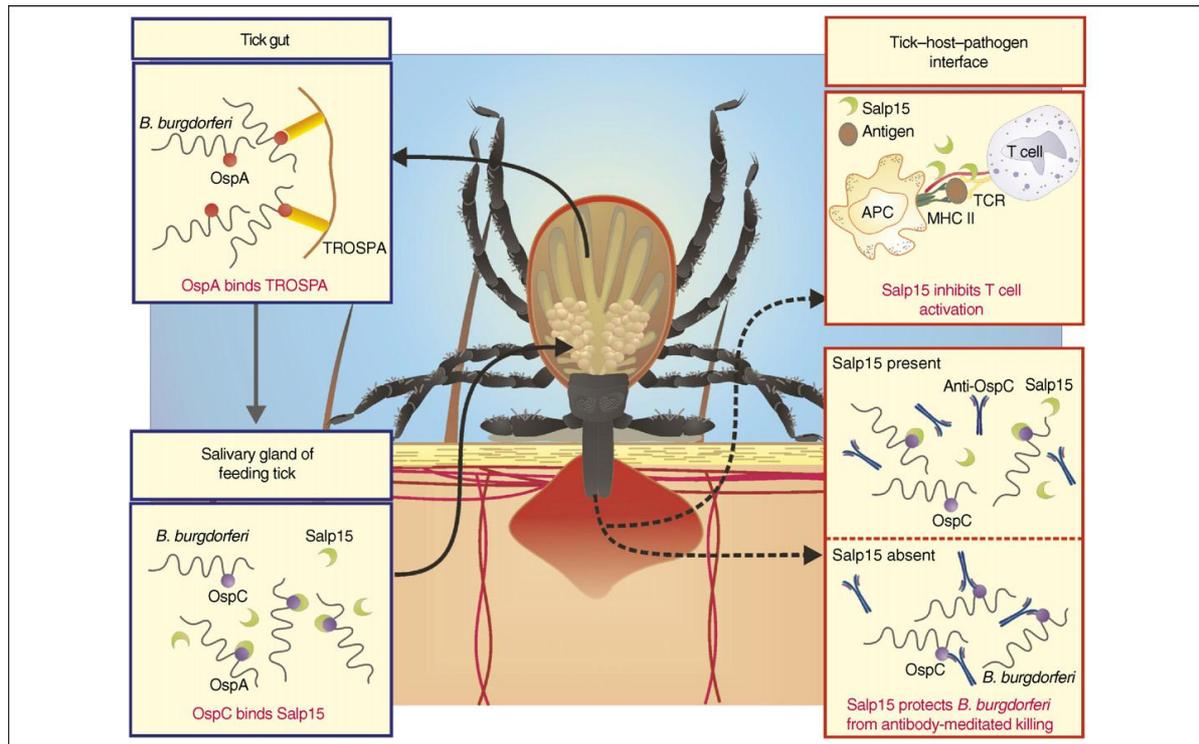
Pendant le gorgement d'*Ixodes* spp., la composition antigénique de *B. burgdorferi* sl change de façon drastique. Osp A et B sont produites lorsque le spirochète réside dans l'intestin de la tique. Un récepteur de la protéine Osp A (désigné Tick Receptor Osp A : TROSPA) a justement été identifié dans l'intestin de

la tique par Pal et coll. en 2004 (Pal et al. 2004a). Durant la migration de l'intestin de la tique vers les glandes salivaires, l'expression du gène codant pour la protéine Osp A est réprimée au contraire du gène codant pour la protéine Osp C. Pareillement, Pal *et al.*, ont montré que Osp C interagit avec des extraits de glandes salivaires de tique : lieu de résidence finale du spirochète chez la tique (Pal et al. 2004b). Osp C constitue également un antigène puissant ciblé par une forte réponse immunitaire spécifique. La protéine Osp C étant initialement masquée par la protéine Salp 15, les spirochètes sont localement et temporairement protégés de l'action bactéricide de ces anticorps. De plus, *Borrelia* induit aussi par exemple une augmentation de l'expression augmentée de certains gènes de la tique, parmi lesquels le gène codant pour la protéine Salp 15. Salp 15 est une protéine inhibant l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Elle a donc un rôle modulateur de la réponse immunitaire acquise de l'hôte comme beaucoup de molécules présentes dans la salive de tique (Garg et al. 2006). (Figure 17)

Lorsque la pression immunitaire humorale vient s'exercer sur *Borrelia*, la bactérie cesse d'exprimer cette protéine fortement immunogène (Liang et al. 2002). A l'inhibition de la production d'Osp C s'ajoute la surexpression de la protéine Vlse, protéine présentant de nombreuses variations antigéniques permettant ainsi un échappement immunitaire (Palmer et al. 2009).

La synthèse d'une protéine immunosuppressive de tique induite spécifiquement par *Borrelia*, est un bel exemple des interactions fines mises en place dans ce couple pathogène-vecteur et du caractère optimal de leur association qui vise à perpétuer le pathogène.

Figure 17. Principales interactions entre la tique, l'hôte et le pathogène dans la maladie de Lyme (D'après Hovius, 2007)



Au-delà des interactions fines entre pathogène et vecteur mises en lumière par la recherche en physiopathologie, nous allons maintenant détailler les aspects de ces interactions à l'échelle des populations.

3) Epidémiologie des différentes espèces de *B. burgdorferi* si

De façon globale, en Europe, les données sur les taux d'infection des tiques *I. ricinus* selon leur stase* sont de 1,9 % pour les larves (étendue : 0-11%), de 10,8% pour les nymphes (étendue : 2-43%) et 17,4 % pour les adultes (étendue : 3-58%) (Gray et al. 1998; Hubálek and Halouzka 1998; Rauter and Hartung 2005).

Au niveau mondial, la prévalence de l'infection chez les nymphes du genre *Ixodes* spp. va d'un minimum de 2 % dans les îles britanniques à plus de 50% dans le Nord-Est des Etats-Unis. On considère qu'en moyenne, en Europe, un peu plus de 10% (10,8 %) des nymphes sont infectées (Rauter and Hartung 2005; Kurtenbach et al. 2006; Kaiser 2008; Nelder et al. 2016; Strnad et al. 2017).

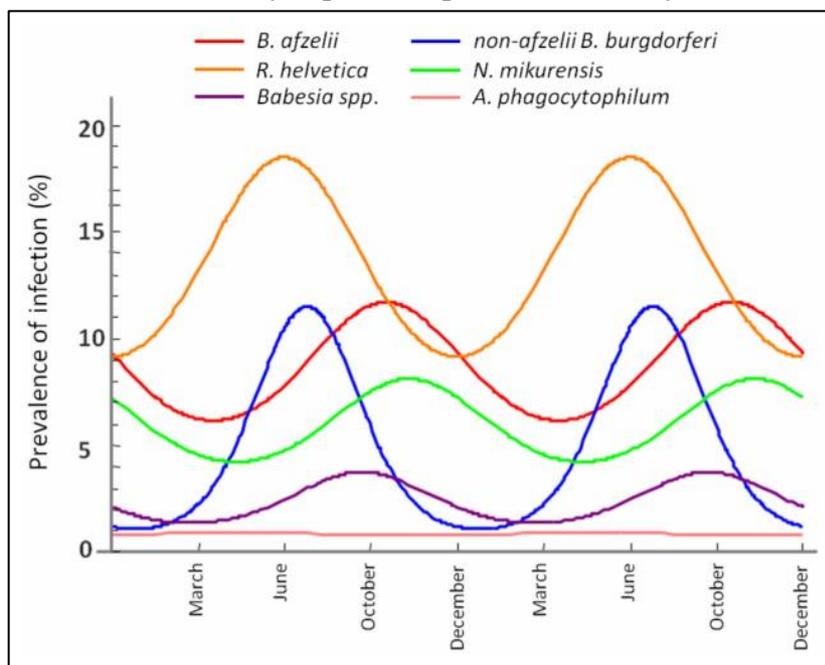
Dans le tableau ci-dessous (Tableau III), sont répertoriées les zones où la borréliose de Lyme a été décrite. Ce tableau met également en regard les caractéristiques temporelles, génétiques, vectorielles, biotiques et phénologiques de la pathologie selon ces régions.

Tableau III. Synthèse des différentes régions du monde où circulent *B. burgdorferi* s.l et les caractéristiques de son écologie en lien avec l'hôte (d'après Kurtenbach *et al.*, 2006)

Région	Stabilité temporelle	Richesse en espèces de <i>B. burgdorferi</i> s.l	Tique vectrice	Prévalence de l'infection chez les nymphes à l'affût	Réservoir des <i>B. burgdorferi</i> s.l.	Phénologie de la tique en quête d'hôte
Nord-Est des Etats-Unis	Epizootique/épidémique	1	<i>Ixodes scapularis</i>	25-35%	Plusieurs espèces de mammifères et d'oiseaux	asynchrone
Europe continentale	Enzootique/endémique	7	<i>Ixodes ricinus</i>	≈10%	plusieurs espèces de mammifères et d'oiseaux	synchrone, unimodale dans la partie ouest et bimodale dans la partie centrale
Iles britanniques	Enzootique/endémique	4	<i>Ixodes ricinus</i>	2-10%	plusieurs espèces d'écureuils	synchrone et à la fois unimodale et bimodale
Les systèmes pélagiques	Enzootique/cryptique	2	<i>Ixodes uriae</i>	2-10%	les oiseaux de mer	synchrone

Nous l'avons vu, le taux d'infection des tiques varie donc en fonction du stade de la tique. Il dépend aussi de la saison, comme le montre la figure ci-dessous (Figure 18) et de la disponibilité en hôtes comme nous allons le détailler ci-après (LoGiudice *et al.* 2003; Coipan *et al.* 2013; Medlock *et al.* 2013).

Figure 18. Taux d'infection pour différents pathogènes chez les nymphes d'*I. ricinus* aux Pays-Bas en fonction du mois de l'année (D'après Coipan *et al.*, 2013)

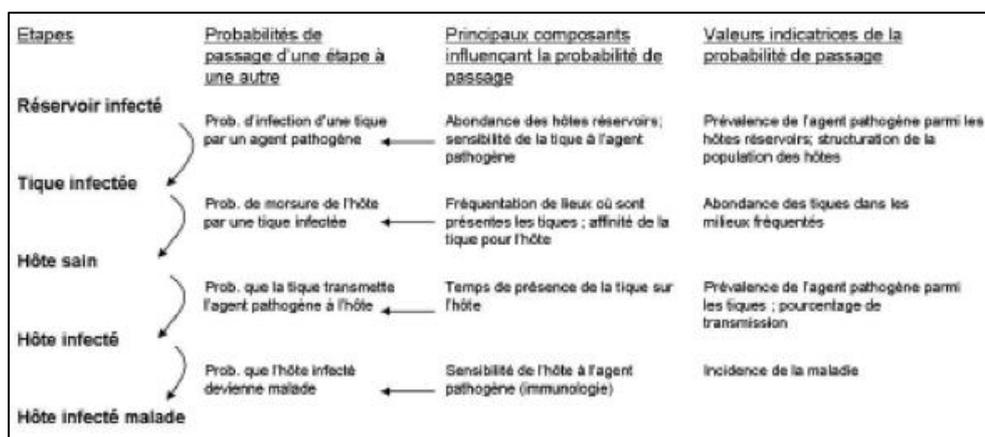


En Europe, les méta-analyses d'études européennes ont montré que *B. garinii* et *B. afzelii* étaient les espèces les plus communes et que la prévalence de l'infection la plus élevée se trouvait dans les pays d'Europe centrale (Rauter and Hartung 2005; Strnad et al. 2017).

Notons que l'espèce *B. lusitaniae* possède une répartition géographique bien particulière. Ainsi, elle peut être l'espèce fortement dominante, voire exclusive, dans des régions comme dans certaines régions du Portugal (De Michelis et al. 2000), en Tunisie (Younsi et al. 2001) et au Maroc (Sarih et al. 2003) où les autres espèces de *Borrelia* sont rarissimes. A l'inverse, dans certaines régions, les autres espèces sont fortement dominantes, et *B. lusitaniae* est nettement plus rare, comme c'est le cas dans certaines régions de Suisse (Jouda et al. 2004).

Le vecteur *I. ricinus* de par son comportement exophile*, son éventail large d'hôte et son portage de pathogènes est à même de transmettre les bactéries du complexe *B. burgdorferi* sl à l'Homme. Celui-ci, de son côté, de par ses habitudes et son mode de vie, peut favoriser son contact avec le vecteur et ainsi augmenter sa probabilité de rencontre avec *Ixodes* spp. et par là même avec les spirochètes. Ainsi, les activités humaines sont des éléments à prendre en compte dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme, puisque l'interaction entre la population et le vecteur est un des maillons de la chaîne de contamination par *B. burgdorferi* sl (Figure 19).

Figure 19. Schéma des étapes menant à la maladie de Lyme chez l'Homme à partir d'une piqûre de tique infectée (D'après Boyard, 2007)



Des dimensions sociologiques et géographiques sont ainsi à ajouter dans la compréhension de l'épidémiologie de la maladie de Lyme.

La fréquentation de l'espace forestier ou des espaces verts urbains est aussi un élément favorable à la contamination et à notre connaissance aucune étude ne renseigne encore précisément sur cet aspect. Cependant, les activités d'extérieur

comme la marche à pied, le jogging, le cyclisme, la cueillette de champignons sont susceptibles de faire varier le niveau d'exposition au vecteur (Mulder et al. 2013; Wilking and Stark 2014). On constate avec les données de Santé Publique France (anciennement Institut Nationale de Veille Sanitaire, InVS) que la moyenne d'âge des patients ayant présenté une maladie de Lyme est de 49 ans et que la classe d'âge la plus représentée est celle des 30-59 dans l'étude épidémiologique alsacienne de 2001-2003. La part des retraités dans le pourcentage des cas de maladie de Lyme est de surcroit la plus importante (30%).

La borréliose de Lyme n'est pas une maladie à déclaration obligatoire, mais depuis 1988 elle est reconnue comme maladie professionnelle chez les personnes particulièrement exposées (les bûcherons, le personnel forestier...). En effet, les travaux d'épidémiologie ont montré que la séroprévalence de *Borrelia* dans ces catégories de population était plus importante (Cinco et al. 2004; Kaya et al. 2008; Rigaud et al. 2016).

La stase* la plus à risque pour l'Homme est la stase nymphale (Falco et al. 1999). Par sa petite taille, celle-ci, de façon inaperçue, pique et se gorge jusqu'à réplétion*, laissant ainsi toute latitude à une transmission passant inaperçue des *Borrelia* présentes dans la tique.

De plus, les premiers symptômes de la maladie de Lyme (en priorité l'érythème migrant) ont la caractéristique de pouvoir passer inaperçus chez le sujet contaminé. D'autres peuvent, par contre, mimer ceux d'autres affections neurologiques ou articulaires.

IV) La borréliose de Lyme : ses formes cliniques, son diagnostic, sa prise en charge

La borréliose de Lyme est une affection multi-systémique qui présente plusieurs stades et dont les symptômes peuvent mimer d'autres affections (Stanek et al. 2012). Suite à la piqûre de tique, la pathologie évolue classiquement en trois stades : la phase localisée précoce, la phase disséminée précoce, la phase disséminée tardive (Stanek et al. 2012).

(A) Les formes cliniques

1) La phase localisée précoce

La phase localisée précoce est caractérisée par l'érythème migrant (EM). C'est une macule ou une papule érythémateuse annulaire, avec ou sans centre clair d'évolution centrifuge avechaussement périphérique. Par définition, son diamètre

doit être d'au moins 5 cm de diamètre. (Définition de L'European Concerted Action on Lyme Borreliosis, EUCALB, disponible en Annexe 1).

L'érythème migrant (Figure 20) n'est habituellement pas prurigineux mais peut être associé à des adénopathies ou à des manifestations générales (arthromyalgies fugaces, fébricule, céphalées). Il débute dans un délai variable de quelques jours à plusieurs semaines après l'inoculation par la tique et, en absence de traitement, persiste en moyenne trois à quatre semaines voire plusieurs mois.

Les localisations de l'érythème migrant se situent en général au niveau des membres inférieurs, en particulier chez les enfants, mais peuvent aussi apparaître au niveau du tronc, des membres supérieurs ou du cuir chevelu (Hengge et al. 2003). Entre 2006 et 2009, au Centre National de Référence* des *Borrelia*, parmi les 1 222 cas d'infection étudiées, 85% des cas étaient des EM (HCSP 2014).

Figure 20. Photographie d'un érythème migrant (Hengge et al. 2003)



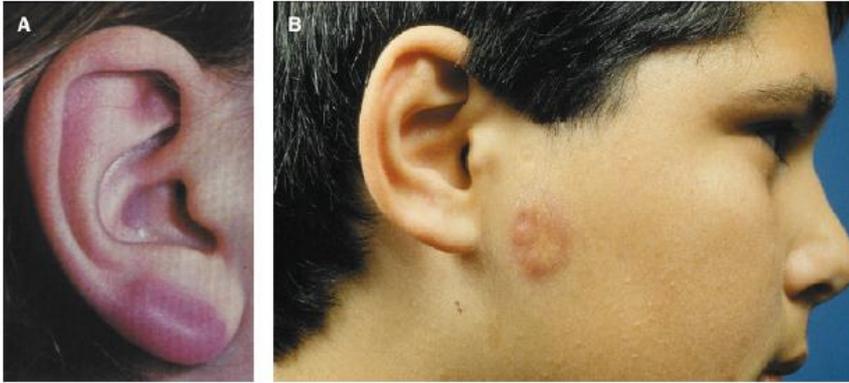
La bactérie peut ensuite envahir d'autres localisations, donnant ainsi des formes cliniques disséminées qui peuvent être précoces ou tardives selon le délai d'apparition des symptômes avec la piqûre de tique.

2) La phase disséminée précoce

Elle peut se manifester par une neuroborréliose, le plus fréquemment de type méningoradiculite chez l'adulte et plus souvent par une paralysie faciale chez l'enfant), de type méningite, et plus rarement de type encéphalite ou myélite.

A cette phase, le patient peut aussi présenter une mono- ou oligo-arthrite subaiguë, touchant les grosses articulations comme le genou (arthrite de Lyme). Des érythèmes multiples ou un lymphocytome, celui-ci étant le plus souvent localisé au niveau du lobe ou de l'hélix de l'oreille, de l'auréole mammaire ou des organes génitaux.

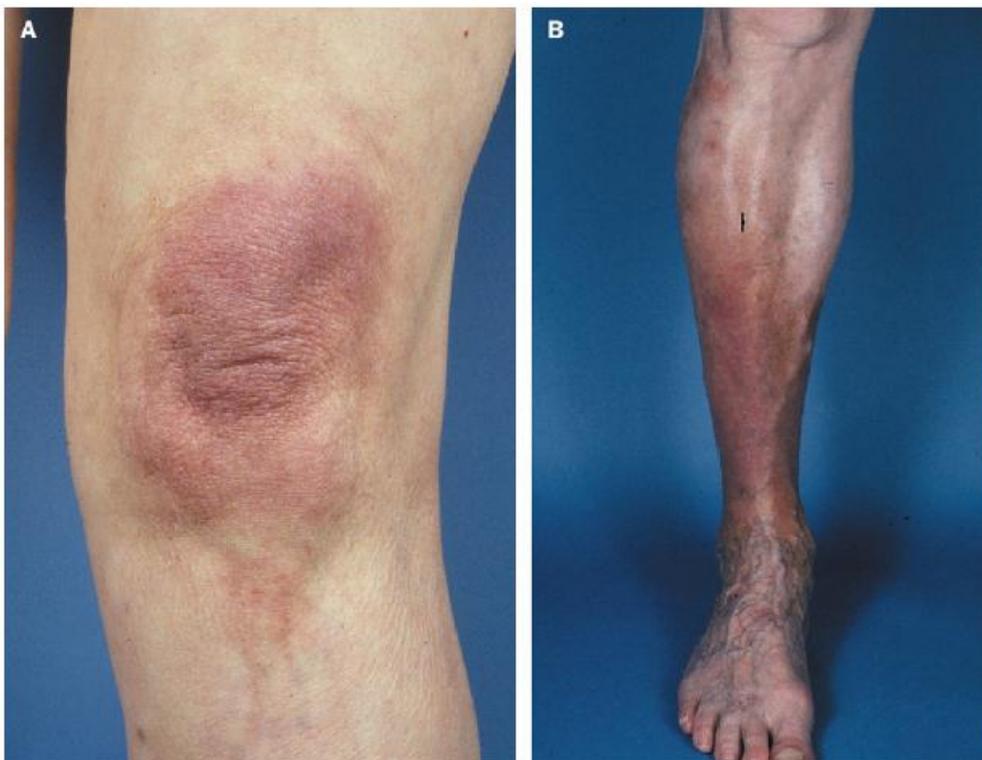
Figure 21. Photographie de lymphocytomes cutanés :
A : sur le lobe de l'oreille ; B : sur la joue (Hengge et al. 2003)



3) La phase disséminée tardive

On l'appelle phase tardive car les manifestations surviennent plusieurs mois ou années après la piqûre. Il peut s'agir d'arthrites chroniques (c'est à dire durant plus de 6 mois), d'acrodermatite chronique atrophiante (c'est à dire un placard discrètement inflammatoire avec infiltration cutanée localisée aux extrémités ou en regard des surfaces articulaires, unilatérale, d'évolution atrophique) ou de manifestations neurologiques (encéphalomyélites chroniques ayant des tableaux cliniques polymorphes ; ainsi que, parfois, des polyneuropathies axonales).

Figure 22. Photographies d'acrodermatite chronique atrophiante :
A : sur le genou ; B : sur le tibia (Hengge et al. 2003)



D'autres atteintes, moins fréquentes, peuvent être observées. On répertorie des atteintes cardiaques (troubles de la conduction auriculo-ventriculaire: Bloc Auriculo-Ventriculaire I-III, parfois endocardite, myocardite, péricardite), mais aussi des atteintes oculaires (conjonctivite, uvéite, œdème papillaire, épisclérite, kératite) (Stanek et al. 2011).

Les signes cliniques sont prédominants dans la démarche diagnostique au stade de l'érythème migrant. Pour les phases disséminées, l'appui des tests diagnostiques est nécessaire car ils permettent de confirmer le diagnostic si la suspicion de maladie de Lyme est forte.

Des symptômes subjectifs à type de fatigue, de troubles cognitifs, d'irritabilité, de troubles du sommeil sont parfois rapportés par les patients après un traitement approprié contre des manifestations bien documentées de la borréliose de Lyme. Ceci est appelé le PLDS (« Post Lyme Disease Syndrome »)(Bujak et al. 1996). Pour l'instant, il n'y a aucune preuve que la présence de ce syndrome soit due à la persistance d'une infection par *B. burgdorferi* (Marques 2008), ceci étant appuyé par l'analyse du transcriptome* qui montre la non-différence d'expression de gène entre les patients ayant totalement guéri de la pathologie et ceux présentant un PLDS (Bouquet et al. 2016).

Dans le même temps, une étude sur l'efficacité d'un traitement antibiotique prolongé chez les patients européens présentant un PLDS, en vue d'éradiquer ces symptômes, a montré qu'il n'y a aucune amélioration de la qualité de vie entre le groupe placebo, le groupe recevant un traitement classique par doxycycline et le groupe recevant un traitement alternatif par de la clarithromycine + de l'hydroxychloroquine (Berende et al. 2016). Pour ces patients présentant un PLDS, une prise en charge spécifique et un traitement symptomatique est donc requis (Feder et al. 2007).

(B) Le diagnostic biologique

Le diagnostic lors de la phase précoce (érythème migrant) repose uniquement sur la clinique.

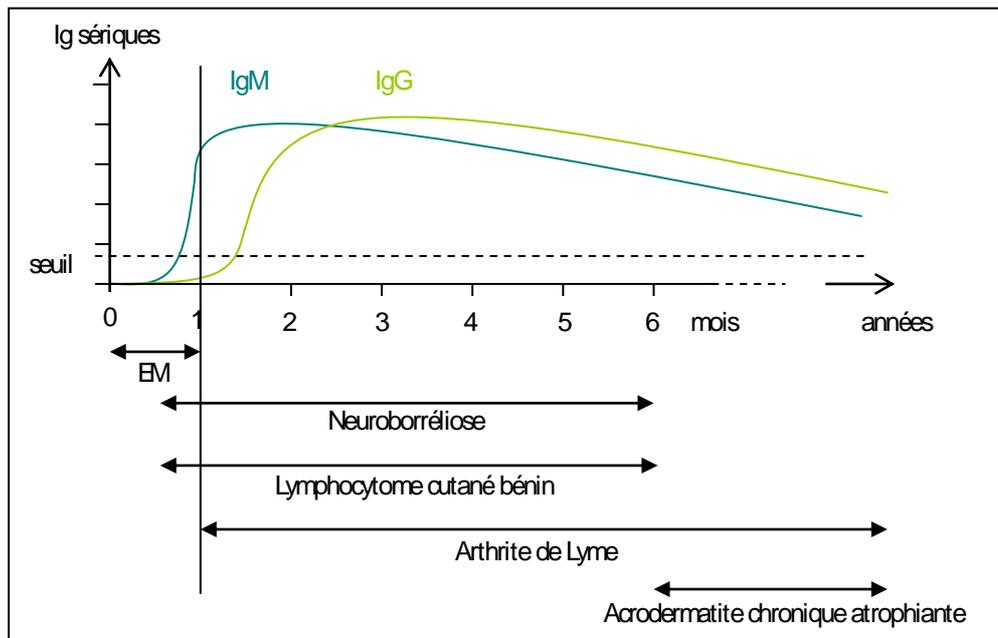
Hors phase précoce localisée, le diagnostic s'appuie sur le diagnostic indirect (sérologie) ou sur le diagnostic direct (culture ou PCR).

Le test diagnostique de première intention pour les phases disséminées précoces et tardives se base le plus souvent sur une sérologie. Une sérologie est considérée comme positive lorsque le résultat de l'ELISA (Enzyme-Like Immunosorbent Assay) IgM et/ou IgG est positif ou douteux et qu'il est ensuite confirmé par un Western-Blot (Schramm et al. 2013).

Les IgM spécifiques apparaissent entre 3 et 4 semaines après la piqûre de tique. Leur taux sérique présente un pic entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine et diminuent

en 4 à 6 mois. Les IgG spécifiques apparaissent entre 6 et 8 semaines après la piqûre puis diminuent lentement, ou persistent des années. (Figure 23)

Figure 23. Graphique représentant l'évolution du taux des anticorps (IgM et IgG) en fonction du temps (D'après la Brochure médicale disponible sur <http://www.invs.sante.fr/Regions-et-territoires/L-InVS-dans-votre-region/Lorraine-Alsace/Etude-reseau-ALSA-CE-TIQUE-2014-2015>)



En cas de symptomatologie neurologique dans la phase disséminée, la sérologie est fréquemment positive (sauf au tout début des neuroborrélioses aiguës où la sérologie sanguine peut être négative) et doit être couplée à la recherche d'anticorps dans le LCR et la détermination, en cas de positivité, de l'index de synthèse intra-thécale des Ig (SIT).

Dans les phases disséminées précoces et tardives, un diagnostic par culture ou PCR peut être effectué. La culture des *Borrelia* à partir des biopsies cutanées, synoviales ou du LCR est très lente (plusieurs semaines et de faible rendement -au maximum 10 %- sauf au stade d'EM). La recherche de l'ADN spécifique de *Borrelia* par PCR est elle rapide et nettement sensible au stade tardif. (Stanek et al. 2011).

(C) La prise en charge

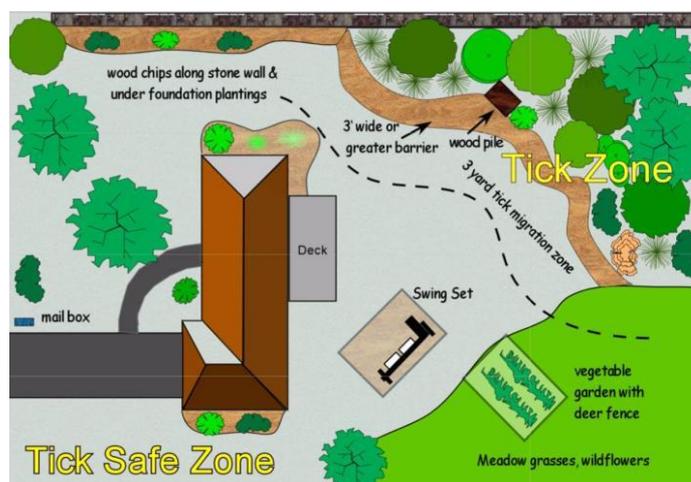
1) La prévention primaire

Plusieurs moyens peuvent être employés pour se prémunir de la piqûre de tiques et/ou de la maladie de Lyme. On peut en dénombrer cinq grands types.

On peut :

- Restreindre et éviter le contact direct avec les tiques. Ceci inclus, l'évitement des aires boisées présentant de l'herbe et de la litière* de feuille. On recommandera aussi aux marcheurs de se déplacer au milieu du chemin (CDC 2015).
- Modifier (ou adapter) le paysage, entretenir les zones d'accueil du public ou de son jardin. Entretenir les espaces verts et jardins en bord de forêt ou non avec les principes suivants, permet de minimiser la population en tiques dans ces espaces. Ainsi, on suggère de favoriser un aménagement paysager favorisant la pénétration de la lumière et la chaleur qui augmente le dessèchement des tiques. Ceci instaure un environnement peu favorable à la survie des tiques. De plus, les tiques sont, nous l'avons évoqué, très présentes au niveau des écotones* (zone de transition entre deux écosystèmes). De ce fait, la création d'une allée en gravier, en paillis d'écorce d'arbre ou en copeaux, entre une aire de gazon (le jardin) et une forêt, instaure une frontière entre une zone à risque et le public comme l'illustre le schéma ci-dessous (Stafford III 2007).

Figure 24. Schéma d'aménagement paysager adapté à la prévention du risque acarologique* (D'après Tick management handbook, <http://www.ct.gov/caes/lib/caes/documents/publications/bulletins/b1010.pdf>)



- Réaliser un examen minutieux de tout son corps est le premier réflexe à adopter. Prendre un bain ou une douche deux heures après une excursion extérieure aide aussi à prévenir la piqûre de tique et réduit le risque de borréliose de Lyme (Connally et al. 2009)
- Utiliser des répulsifs* cutanés validés contre les *Ixodes* spp. comme le DEET (à 20% ; N,N-diethyl-3-methylbenzamide), l'EBAAP (l'IR 3535 ou le 3-[N-butyl-N-acetyl]-aminopropionique acide, ethyl ester) ou l'icaridin (le KBR3023 ou le 2-(2-hydroxyethyl)-1-piperidencarboxylic acide 1-méthylpropyl ester)) ou le Citriodiol (p-menthane-3,8-diol). Ils permettent de se protéger durant plusieurs heures (environ 4 heures voire 8 heures pour l'icaridin chez *I. ricinus*) (Dautel et al. 2013; Pages et al. 2014; Büchel et al. 2015).

Des produits d'origine naturelle ont aussi été évoqués à visée répulsive. Ces produits sont des huiles essentielles*. Elles contiennent des terpènes, molécules actives comme répulsifs (Bissinger and Roe 2010). Les plantes les plus souvent mentionnées sont : la citronnelle (*Cymbopogon nardus*, *C. excavatus martini*), le cèdre (*Chamaecyparis nootkatensis*, *Juniper virginiana*), l'eucalyptus (*Eucalyptus maculata*), le géranium (*Pelargonium reniforme*), la lavande (*Lavandula angustifolia*), le soja (*Neonotonia wightii*), la tomate sauvage (*Lycopersicon hirsutum*) (Choochote et al. 2007; Strickman 2009; Bissinger and Roe 2010). Cependant, l'efficacité de ces produits n'a pas été à ce jour testée grâce à des études fiables. De ce fait, il persiste un scepticisme quant à leur pouvoir répulsif (Pages et al. 2014)

- Imprégner les vêtements d'acaricides (produits dans le commerce contenant, par exemple, de la perméthrine à 0,5 %). Cette imprégnation perdure et résiste à plusieurs lavages (nombre de lavages différent selon les formulations). Le nettoyage à sec, par contre, est complètement délétère quant à l'efficacité de l'imprégnation (Faulde et al. 2003, 2006; Faulde and Uedelhoven 2006).

L'efficacité de l'auto-contrôle après exposition ainsi que l'usage de répulsif (sur les vêtements ou sur la peau) ont été étudiés. Ces deux mesures ne montrent pas d'efficacité stable (Vázquez et al. 2008; Connally et al. 2009). Cependant, l'observance à ses mesures n'a pas été mesurée, ce qui relativise la validité de cette évaluation.

- Placer les vêtements dans le sèche-linge pendant une heure. Ceci a un effet létal démontré sur les tiques (Carroll 2003).

On peut évoquer également la vaccination ainsi que l'antibioprophylaxie. Il n'y a, à l'heure actuelle, plus aucun vaccin disponible sur le marché pour l'Homme. Un vaccin a été retiré du marché par la FDA en 1998 (Steere et al. 1998). Ce produit (Lymerix®), pourtant efficace, ne présentait pas de ventes importantes sur le marché. Ainsi, les inconvénients suivants sont sans doute à l'origine de ce faible intérêt envers ce produit : la nécessité de se re-vacciner fréquemment, le coût important et sa stigmatisation dans la survenue potentielle d'arthrites auto-immunes chez des patients avec un haplotype particulier d'HLA (Antigène d'Histocompatibilité) (Trollmo et al. 2001; Clark and Hu 2008).

A ce jour, le laboratoire Valneva® a lancé un essai clinique de phase 1 sur un nouveau vaccin contre la maladie de Lyme (Comstedt et al. 2014).

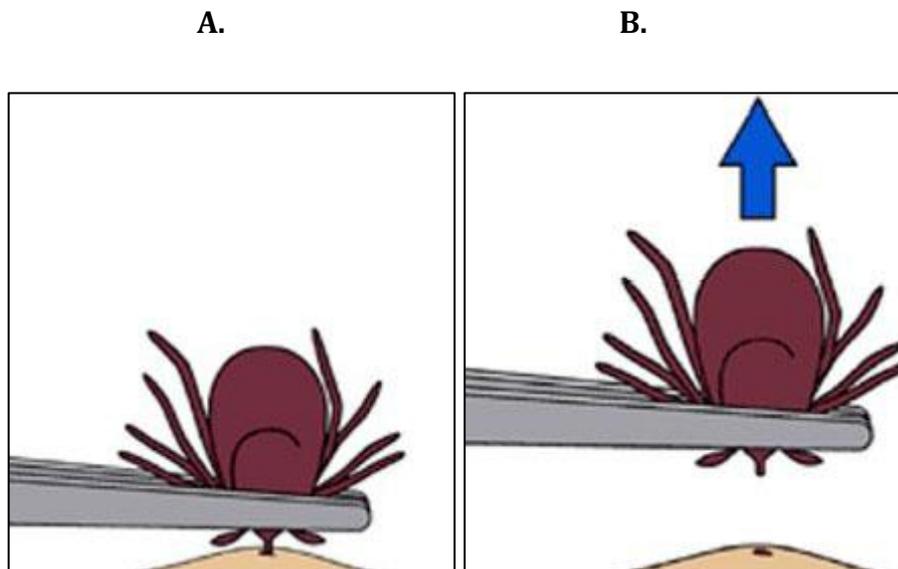
L'antibioprophylaxie, quant à elle, n'est ni recommandée en France ni aux Etats-Unis (Clark and Hu 2008) sauf chez la femme enceinte exposée via des piqûres de tiques multiples (Haut Conseil de la Santé Publique 2017).

2) Le retrait de la tique

Suite à une piqûre de tique, le retrait rapide de la tique est le premier réflexe à adopter. Ce retrait doit être le plus précoce possible car le risque de transmission augmente avec la durée d'attachement de la tique (Cook 2015).

Des pincettes ou un tire-tique permettent d'enlever aisément la tique en opérant au plus près des pièces piqueuses par un mouvement de traction en sens inverse de la piqûre de tique pour les pincettes soit par un mouvement de rotation pour le tire-tique. (Figure 25 et Annexe 2)

Figures 25. Schéma du processus de retrait de la tique avec une pince à épiler
[<http://www.cdc.gov/lyme/removal/index.html>]



Une désinfection au niveau du point de piqûre est ensuite recommandée. Par contre, l'antibioprophylaxie systématique après piqûre de tique ne fait pas partie des recommandations françaises (Société de Pathologies Infectieuses de Langues Françaises : SPILF. 2006 Conférence de consensus) et n'est pas recommandée en Europe (Stanek et al. 2011). Le site anatomique de piqûre de tique doit ensuite être surveillé pendant 4 semaines pour dépister l'apparition possible d'un érythème migrant.

3) Le traitement de la borréliose de Lyme

Les familles d'antibiotiques actifs *in vitro* sur les *Borrelia* sont les β -lactamines, les cyclines et les macrolides (Hansmann 2009). Ci-dessous sont synthétisées les recommandations françaises pour la prise en charge de la phase primaire de la borréliose de Lyme. (Tableau IV)

Tableau IV : Recommandations françaises pour la prise en charge de la phase primaire de la borréliose de Lyme : Traitement par voie orale (d'après les recommandations de 2006 de la Société de Pathologies Infectieuses de Langue Française)

Contexte	Antibiotique	Posologie	Durée
Adulte			
1 ^{ère} ligne	Amoxicilline	1 g x 3/j	14-21 jours
	Doxycycline	100 mg x 2/j	14-21 jours
2 ^{ème} ligne	Céfuroxime-axétil	500mg x 2/j	14-21 jours
3 ^{ème} ligne si CI 1 ^{ère} et 2 ^{ème} lignes ou allergie	Azithromycine	500 mg x 1/j	10 jours
Enfant			
1 ^{ère} ligne (> 8 ans)	Amoxicilline	50 mg/kg/j	14-21 jours
	Amoxicilline	50 mg/kg/j en trois prises	14-21 jours
	Doxycycline	4 mg/kg/j en deux prises, max 100 mg/prise	14-21 jours
2 ^{ème} ligne	Céfuroxime-axétil	30 mg/kg/j en deux prises, max 500 mg/ prise	14-21 jours
3 ^{ème} ligne si CI 1 ^{ère} et 2 ^{ème} lignes ou allergie	Azithromycine	20 mg/kg/j en une prise, max 500 mg/prise	10 jours
Femme enceinte ou allaitante			
1 ^{ère} ligne	Amoxicilline	1g x 3/j	14-21 jours
2 ^{ème} ligne	Céfuroxime-axétil	500 mg x 2/j	14-21 jours
3 ^{ème} ligne si CI 1 ^{ère} et 2 ^{ème} lignes ou allergie	Azithromycine	500 mg x 1/j	10 jours

Ce traitement est administré en vue de la résolution complète des symptômes en relation avec l'infection à *Borrelia* et en vue de la prévention d'une progression vers une forme tardive de la maladie.

Pour notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés principalement à une seule « maladie à tiques » : la borréliose de Lyme. Cependant, les tiques *Ixodes* en Alsace et comme ailleurs dans le monde, peuvent être vectrices d'un vaste éventail de micro-organismes, comme nous allons rapidement le ré- évoquer ci-dessous.

VI) Les autres micor-organismes portées par les tiques autres que *Borrelia burgdorferi* sl.

Les tiques sont les plus importants vecteurs de pathogènes affectant les humains et les animaux de part le monde. Elles portent des pathogènes connus comme *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* etc.... A côté de ces microorganismes pathogènes, les tiques peuvent également héberger des microorganismes non pathogènes pour l'Homme ou des symbiotes*. (Bonnet et al. 2017)

Les effets des endosymbiotes ne sont pas encore complètement connus. Ils peuvent avoir un rôle important pour la nutrition, la reproduction, le développement (Bonnet et al. 2017). Cependant, il semble que certains influencent la colonisation par d'autres microorganismes dont *Borrelia* (Narasimhan et al. 2014).

(A) Les bactéries

Anaplasma phagocytophilum

La famille des *Anaplasmataceae* inclut six genres dont *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Aegyptianella*, *Wolbachia*, *Neorickettsia* et « *Candidatus Neoehrlichia* » (Dunning Hotopp et al. 2006). La famille des *Anaplasmataceae* regroupe des bactéries intracellulaires obligatoires principalement transmises par les arthropodes. Ces bactéries peuvent infecter des cellules hôtes spécifiques telles les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, les plaquettes, les érythrocytes ou les cellules endothéliales. Quatre espèces sont impliquées en pathologie humaine et animale : *A. maginale*, *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. rumiantium*. *Wolbachia* spp. est lui un exemple d'*Anaplasmataceae* non pathogène (Pruneau et al. 2014).

A. phagocytophilum infecte les tiques (nymphe et adultes) *I. ricinus* en Europe à un pourcentage selon les études réalisées dans chaque pays variant de 0,3 % à 23,6 % (panel d'études réalisées entre 1996 et 2012) (Stuenkel et al. 2013). Elle est connue pour causer des pathologies chez les animaux domestiques et sauvages (Foley et al. 1999) et même la mort chez les moutons, le bétail, les chevaux, les cervidés, les souris, les chiens et les Hommes (Jenkins et al. 2001; Stuenkel 2003; Franzen et al. 2007; Heine et al. 2007).

L'anaplasmose granulocytaire humaine n'est connue chez l'Homme que depuis 1994. Avant cela, ce germe n'était répertorié que comme agent d'ehrlichiose chez les ruminants et chez les équidés. Les manifestations cliniques humaines vont des symptômes grippaux (fièvre, maux de tête, myalgies et malaise) au décès (Bakken 1994). De plus, on constate une thrombocytopénie,

une leucopénie, une anémie et une élévation des aspartame aminotransférases (ASAT) et alanine aminotransférases (ALAT) (Bakken and Dumler 2008).

***Rickettsia* spp.**

Les *Rickettsia* transmises par les tiques sont des bactéries intracellulaires obligatoires.

Les espèces du genre *Rickettsia* (famille des *Rickettsiaceae* ; ordre des *Rickettsiales*) peuvent être classés en quatre groupes :

- le groupe des *Rickettsia*, agents des fièvres boutonneuses (Spotted Fever Group : SFG : *R. conorii*, *R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. aechlimanii*, *R. massiliae*). Ces zoonoses* sont les plus anciennement connues. Les tiques appartenant au groupe des *Ixodidae* (et donc des tiques dures) peuvent jouer le rôle de vecteur, réservoir* et amplificateur des *Rickettsia* du groupe des SFG (Parola et al. 2005). Elles infectent 2% des tiques en France (Aubry et al. 2016).

- le groupe des *Rickettsia* agent des lymphangites associées aux rickettsioses (*R. sibirica*, *R. mongolitimonae*)

- le groupe des espèces responsables de TIBOLA/DEBONEL/SENLAT (Tick-borne lymphadenopathy/Dermacentor-Borne-Necrosis_Erythema-Lymphadenopathy/Scalp Eschar Neck Lymphadenopathy) : *R. slovaca*, *R. raoultii*, *Candidatus Rickettsia rioja*. Ces rickettsies sont transmises par *Dermacentor* spp.

- le groupe des *Rickettsia*, agents de typhus : *R. typhi*, transmise principalement par la puce du rat (*Xenopsylla cheopis*), *R. prowazekii* transmise par le pou de corps

 - *Rickettsia bellii*,

 - le groupe des *Rickettsia canadensis* (Merhej and Raoult 2011).

Le syndrome de la fièvre boutonneuse est causé par au moins une quinzaine d'espèces de *Rickettsia* différentes dont certaines sont transmises par *I. ricinus* (Heyman et al. 2010). Les *Rickettsia* présentent dans les tiques en Europe les plus fréquemment impliquées sont *R. conorii* (vecteur : *Rhipicephalus sanguineus*) et *R. monacensis* (vecteur : *I. ricinus*) (Heyman et al. 2010; Portillo et al. 2015).

R. monacensis a été détectée dans les tiques *I. ricinus* en Espagne, au Portugal, Italie, Turquie, Suisse, Luxembourg et Allemagne (Fernández-Soto et al. 2006; Jado et al. 2007; Reye et al. 2010, 2013; Gargili et al. 2012; Madeddu et al. 2012; Maioli et al. 2012; Rymaszewska and Piotrowski 2013). La prévalence de *R. monacensis* dans les tiques varie entre 1 % en Allemagne et 57 % en Italie (Radulović et al. 2011; Gargili et al. 2012). En 2005, *R. monacensis* a été identifiée comme pathogène chez deux patients en Espagne et chez un patient en Sardaigne ; un rash généralisé incluant les paumes des mains et la plante des pieds n'a été observé que chez un des patients espagnols (Jado et al. 2007; Madeddu et al. 2012).

R. helvetica a été détectée chez *I. ricinus* dans au moins 24 pays européens. Le caractère pathogène de *R. helvetica* reste encore discuté (Svendsen 2011). Les infections humaines par *R. helvetica* sont surtout basées sur un diagnostic sérologique et parfois sur des outils moléculaires ont été décrites en Autriche, France, Danemark, Suisse et Slovaquie (Parola et al. 2005; Nilsson 2009; Sekeyova et al. 2012). Les patients ont en effet présenté des symptômes de gravité moyenne associant maux de tête, myalgies et parfois des rashes et/ou des escarres (Parola et al. 2005).

D'autres agents : Francisella tularensis, Bartonella spp., Coxiella burnettii

F. tularensis engendre de la fièvre ainsi que des lymphadénopathies ulcératives. A côté de la transmission classique par contact, ces bactéries peuvent être transmises par les tiques (Boone et al. 2015; Rigaud et al. 2016).

La prévalence de *F. tularensis* chez les tiques est basse (1%) voire nulle (Reis et al. 2011; Mancini et al. 2014).

Le rôle d'*I. ricinus* dans l'infection humaine par différentes espèces de *Bartonella* (comme *B. quintana* ou *B. henselae*) est à ce jour suspecté mais non prouvée (Socolovschi et al. 2009; Hai et al. 2014).

C. burnettii, agent de la fièvre Q, a également été détecté chez *I. ricinus*, mais le rôle de la tique dans l'épidémiologie humaine est probablement peu significatif (Socolovschi et al. 2009; Hai et al. 2014).

Borrelia miyamotoi

Borrelia miyamotoi représente phylogénétiquement un cluster à part parmi le groupe des *Borrelia* agent des fièvres récurrentes. Elle est la seule espèce de ce groupe à être véhiculée par une tique dure. En effet, les tiques molles du genre *Ornithodoros* sont les vecteurs principaux des spirochètes agents des fièvres récurrentes. Ces spirochètes engendrent les fièvres récurrentes à pou ou à tique (TRBF : Tick-Borne Relapsing Fever) dont l'agent principal aux Etats-Unis est *Borrelia hermsii* (Krause et al. 2015; Wagemakers et al. 2015). Une série de cas en Russie, a montré que *B. miyamotoi* induit des symptômes pseudo-grippaux et que peu de patients présentent des récurrences fébriles (Platonov et al. 2011). Deux cas de méningo-encéphalites ont été imputés à *B. miyamotoi* chez des patients immunodéprimés en 2013 aux Pays-Bas et en Allemagne en 2015 (Hovius et al. 2013; Boden et al. 2016).

Candidatus Neoehrlichia mikurensis

Une nouvelle espèce dans la famille des *Anaplasmataceae*, « *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* », a été détectée au Japon en premier chez *Ixodes ovatus* et chez le rat de Norvège (*Rattus Norvegicus*) au Japon (Kawahara et al. 2004). Ce pathogène intracellulaire obligatoire possède un tropisme pour les cellules épithéliales (Richter and Matuschka 2012). Les symptômes observés chez certains des patients atteints : anévrismes, complications thromboemboliques, hémorragies sous-cutanées, rashes érythémateux, sont évocateurs de ce tropisme. Plusieurs cas humains d'infections sévères ont été décrites en Europe dont la majorité sont survenus chez des patients immunodéprimés (Fehr et al. 2010; von Loewenich et al. 2010; Welinder-Olsson et al. 2010; Pekova et al. 2011).

Candidatus Neoehrlichia mikurensis peut être considérée comme une zoonose* émergente puisque avant 2010 (date du premier cas humain), cette bactérie était considérée comme non pathogène (Jahfari et al. 2012; Moniuszko et al. 2015).

(B) Les virus

Le virus de l'encéphalite à tique (TBE)

Depuis les dernières décennies, le TBE est devenu un problème de santé publique croissant en Europe et en Asie. C'est la maladie virale à tique la plus fréquente en Europe (Estrada-Peña and de la Fuente 2014). Ce virus neurotrope appartient au genre *Flavivirus* (famille des *Flaviviridae*) (Zilber 1939). Il existe trois sous-types dénommés : européen, sibérien et extrême-oriental (Mansfield et al. 2009).

L'incidence des cas reportés de TBE a augmenté ces dernières décennies (Suss 2008). Cette augmentation serait imputable à des facteurs écologiques et sociaux, mais aussi à la prise de conscience de cette maladie et aux progrès diagnostiques dans le monde médical (Randolph 2010). Comme la plupart des arboviroses, la majorité des infections à TBE restent asymptomatiques. Le tableau clinique de l'infection à TBE est décrit souvent en deux phases. La phase initiale se caractérise par des symptômes non spécifiques tels la fièvre, fatigue, maux de tête, malaise général (Lindquist and Vapalahti 2008). Puis, c'est à la seconde phase que le patient peut développer une méningite (chez 50% des cas adultes), une méningo-encéphalite (40% des cas) ou une ménigo-encéphalo-myélite (10 % des cas) (Kaiser 2008). L'incidence en France est de 29 cas entre 2000 et 2006. La région la plus à risque est l'Alsace (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - Health Communication Unit - Eurosurveillance editorial 2012)

D'autres virus sont évoqués pour leur importance en santé publique, comme le virus Omsk, le virus de la fièvre hémorragique Crimée-Congo, qui, à la différence

du TBE, ne sont pas transmis par la piqûre d'*I. ricinus*, mais via deux autres tiques dures : *Dermacentor reticulatus* ou *Hyalomma* spp. respectivement (Lani et al. 2014).

D'autres virus sont aussi transmis par *I. ricinus*. C'est le cas du virus louping ill qui circule en Grande Bretagne, en Espagne, en Turquie et en Grèce (Charrel et al. 2004). Il appartient également au genre *Flavivirus*. Il cause principalement des encéphalites chez le mouton, mais il peut aussi toucher les Hommes lors d'activités professionnelles directement en contact avec les animaux (les vétérinaires, les éleveurs d'ovins). La transmission par *Ixodes* est rare, mais a déjà été rapportée (Davidson et al. 1991). Le tableau clinique est similaire à celui de la souche européenne du virus de l'encéphalite à tique à savoir biphasique (Charrel et al. 2004).

Le virus Powassan

Le virus Powassan est aussi un membre des *Flaviviridae*, identifié en 1958 pour la première fois à Powassan (Ontario, Etats-Unis). Ce virus, inoculé via la piqûre des tiques *I. cookei*, *marxi* et *scapularis*, a une importance en épidémiologie humaine. Il possède deux lignées (Powassan 1 et 2), chacune pouvant causer des méningoencéphalites (fatale pour 10% des cas). Le plus souvent, les infections causées sont asymptomatiques. Les cas sont répartis entre le Nord des Etats-Unis et la Russie (Brackney and Armstrong 2016; Pastula et al. 2016).

(C) Les parasites

***Babesia* spp.**

Le premier cas humain de babésiose a été identifié en 1957 à Zagreb (Croatie) (Skrabalo et al. 1957). Initialement diagnostiquée en Europe et en Amérique du Nord, la babésiose humaine est maintenant décrite partout dans le monde (Vannier et al. 2008).

Babesia spp. appartient au phylum des *Apicomplexa* tout comme d'autres parasites tels *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium* spp. (Perkins 1992).

Aux Etats-Unis, *Babesia microtii* est la cause la plus fréquente de babésiose humaine. Depuis 50 ans, l'épidémiologie de la babésiose humaine est passée de quelques cas isolés à l'établissement de zones endémiques au sud de la Nouvelle Angleterre ou à New York par exemple.

En Europe, *B. divergens*, *B. microtii* et *B. venatorum* (anciennement *Babesia* sp. EU 1) ont causé des babésioses chez les individus qui ont été transmis par *I. ricinus* (Gorenflot et al. 1998; Foppa et al. 2002; Herwaldt et al. 2003; Meer-Scherrer et al. 2004; Hildebrandt et al. 2007). En Europe, c'est l'espèce *B. divergens* qui est l'agent principal des babésioses humaines (Akel and Mobarakai 2017). Le nombre de cas de babésioses est faible. En effet en 2011, le nombre de cas de

babésioses humaines étaient de moins d'une cinquantaine de cas depuis 1957, date de mise en évidence du 1^{er} cas humain (Martinot et al. 2011).

La plupart des cas de babésiose se résument à des symptômes modérés à type de malaise graduel, de fatigue suivie de fièvre avec un ou plusieurs parmi les symptômes suivants : frissons, sueur, maux de têtes, etc... (Ruebush et al. 1977; Krause et al. 1996; White et al. 1998; Hatcher et al. 2001). Des infections plus sévères surviennent généralement chez des patients avec un terrain sous-jacent d'immunodépression induit par une infection à VIH, une tumeur, un traitement immunosuppresseur ou une splénectomie (Benezra et al. 1987; Froberg et al. 2004; Krause et al. 2008).

Partie II

Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* par le Centre National de Référence des *Borrelia* à partir de 2012

I) Contexte de la surveillance

La surveillance épidémiologique se définit comme « un processus systématique de collecte, d'analyse et d'interprétation de données sur des événements de santé spécifiques importants pour la planification, la mise en œuvre, et l'évaluation des pratiques en santé publique, étroitement associées à leur juste diffusion à ceux qui ont besoin d'être informés » (Langmuir 1963).

Les systèmes de surveillance épidémiologique sont des outils d'aide à la décision en vue du contrôle et de la prévention des maladies. Ils reposent le plus souvent sur un ensemble de personnes et/ou d'institutions organisées entre elles en réseau (réseau de surveillance épidémiologique) pour effectuer la surveillance d'une ou de plusieurs maladies (Dufour et al. 2006).

La surveillance épidémiologique, en France, se fait par deux voies. On distingue les systèmes actifs et les systèmes passifs.

Dans les systèmes passifs, le recueil de données est en général encadré par la loi et prend source dans les bases de données existantes. Parmi ces systèmes de surveillance passifs, on compte les Centres Nationaux de Référence (CNR), les maladies à déclaration obligatoire, les certificats de décès.

Le système actif, lui, est engagé de façon volontaire. On y inclut donc les études épidémiologiques mises en place de façon plus ponctuelles.

Dans le cas de la borréliose de Lyme, cette surveillance s'appuie à la fois sur le Réseau *Sentinelles* et sur le Centre National de Référence* (CNR) des *Borrelia*, mis en place en 2002 (Santé publique France, 2002).

Le Réseau *Sentinelles* est un système de collectes de données basé sur les médecins généralistes de France métropolitaine. Le réseau *Sentinelles* est un réseau de 1300 médecins généralistes libéraux (Sentiweb.fr)

En ce qui concerne la borréliose de Lyme, celle-ci bénéficie des deux modalités de surveillance au niveau national.

En France, elle a été classée en 2006 par l'INVS parmi les 11 zoonoses* non alimentaires prioritaires en termes de surveillance. L'intérêt porté à cette pathologie s'explique par sa fréquence et par le risque potentiel de séquelles handicapantes (Capek et al. 2006).

La surveillance vectorielle (densité et taux d'infection des tiques) est une des missions du CNR. En effet, l'établissement du diagnostic de la borréliose de Lyme repose sur un ensemble d'arguments comprenant la symptomatologie clinique, la biologie et la notion de risque d'exposition (notion de piqûre de tique, taux d'infestation des tiques dans la région, saison). Il est donc important de connaître le risque acarologique* (c'est à dire la densité en nymphes infectées) sur notre territoire (SPILF, 2006). Des études antérieures ont en effet montré que le risque de pathologies transmises par les tiques dépend principalement de la densité en tiques infectées (Glass et al. 1994; Nicholson and Mather 1996; Dister et al. 1997; Kitron and Kazmierczak 1997).

Depuis sa création en 2002, le CNR réalise des enquêtes annuelles sur la population du vecteur *I. ricinus* dans différentes régions françaises.

II) Données d'épidémiologie nationale

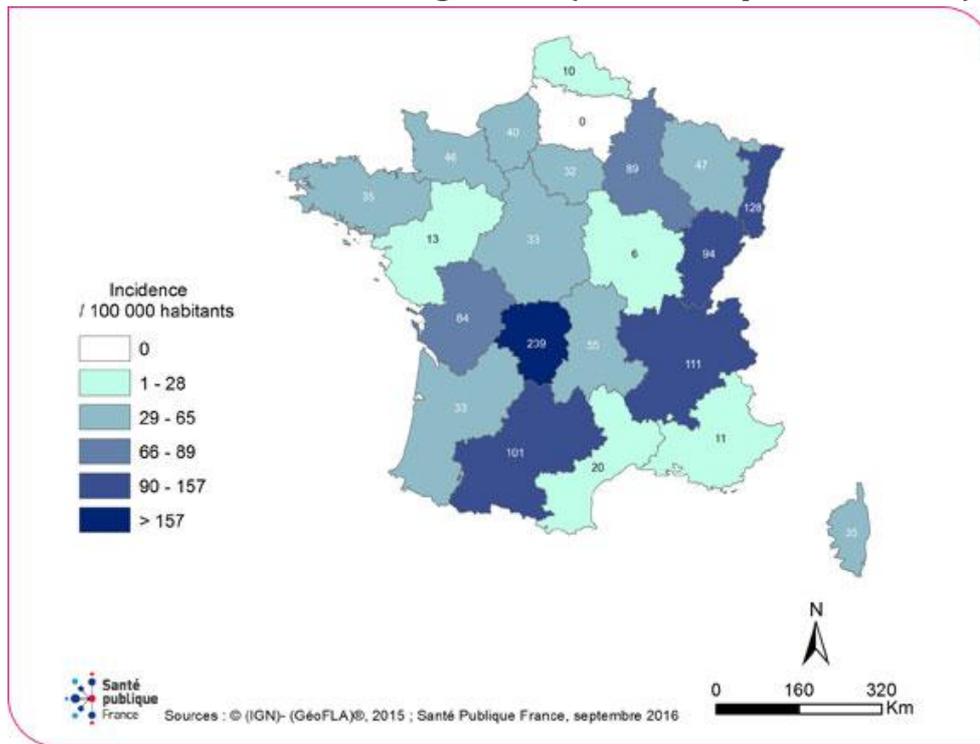
Les données les plus récentes d'incidence de la maladie de Lyme sont issues des enquêtes réalisées par le réseau Sentinelle entre 2009 et 2016. Celle-ci estime une incidence annuel des cas de borréliose de Lyme en consultations de médecine générale de 42 à 84 cas/100 000 habitants selon les années (Santé Publique France 2015). Cette incidence est globalement stable de 2009 à 2015 (42 à 55 cas /100 000 habitants). Le taux d'incidence en 2016 montre une nette augmentation (84 cas /100 000 habitants) (Vandenesch et al. 2014).

III) Données d'épidémiologie régionale

Les données du réseau Sentinelle, entre 2009 et 2016, ont mis en évidence les fortes disparités régionales : de 0/100 000 habitants à 617 cas/100 000 habitants. Les plus fortes incidences se trouvent dans l'Est (Alsace : 128 cas pour 100 000 habitants) et le centre de la France (Limousin : 617 cas/100 000 habitants en 2016). La plus basse est en Pays de la Loire et la Bourgogne avec respectivement 0 et 6 cas pour 100 000 habitants. (Figure 25 représentant les données de 2015)

L'Alsace est considérée comme une région endémique en France pour la borréliose de Lyme car elle possède une des incidences de cas les plus élevées (cas certains et possibles selon la définition de l'EUCALB de 1996). Un cas certain selon la définition de l'EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis) se définit ainsi: tout érythème migrant vu et diagnostiqué par un médecin dans les trois mois après piqûre de tique ou après les débuts des signes cliniques ou arthrite/atteinte cardiaque/cutanée secondaires avec sérologie ELISA positive ou atteinte neurologique avec sérologie positive dans le sang ou dans le LCR et/ou lymphocytose dans le LCR ou SIT (Synthèse Intra-thécale d'immunoglobulines) (INVS : <http://www.invs.sante.fr/%20fr/layout/set/print/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Borreliose-de-lyme/Enquetes-et-etudes>).

Figure 26. Carte représentant les taux d'incidence annuels estimés en France en 2010-2015, données régionales (Santé Publique France 2017)



L'Alsace, de par sa forte incidence de cas, a fait partie, depuis la création du CNR en 2002, des régions investiguées, que se soit du point de vue de l'épidémiologie humaine ou de l'épidémiologie vectorielle.

Le CNR des *Borrelia* avait précédemment réalisé en 2003 et 2004 une étude de la prévalence de l'infection à *B. burgdorferi* sI et à *Anaplasma phagocytophilum* chez les nymphes *I. ricinus* en Alsace (Ferquel et al. 2006) et une étude d'incidence chez les Hommes.

IV) Surveillance vectorielle

Le stade nymphal est considéré comme, épidémiologiquement, le facteur le plus à risque de transmission de la maladie de Lyme pour l'Homme (Arsnoe et al. 2015).

Pour déterminer le risque acarologique* sur un territoire, nous devons connaître la densité en nymphes et le taux d'infection à *B. burgdorferi* sI des nymphes collectées. Pour estimer cette densité en nymphes, qui est donc le reflet de l'abondance en tiques, il est nécessaire de les prélever sur le terrain.

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour évaluer la quantité de tiques dans un lieu donné. On distingue quatre grandes techniques (Gray 1985).

- la collecte au drapeau (flag ou drag) (Macleod 1932; Vassallo et al. 2000b)

Cette méthode utilise un morceau de tissu qui est passé sur la végétation. La collecte se fait sur des « transects »- c'est à dire des tronçons de x m de long- et les prélèvements en tiques se font à intervalle régulier (tous les 10m par exemple).

- la collecte sur les vêtements des marcheurs

Celle-ci utilise des promeneurs portant des vêtements blancs -ou de couleur claire- et marchant sur un chemin. Pareillement, à la première méthode, le retrait des tiques se fait à intervalle de distance régulier.

- la collecte grâce à un attractant

L'attractant utilisé est le CO₂. Les puits de carbone (boîtes remplies de carboglace) diffusent du CO₂. Les tiques sont attirées par l'émission de gaz carbonique et sont piégées par un ruban adhésif disposé à l'approche de la source de carbone. Par cette technique, les nymphes présentes sur un rayon maximal de 1 m sont attirées par ce piège (Gray 1985).

- la collecte sur les mammifères-hôtes (Ginsberg and Ewing 1989).

La collecte via les mammifères hôtes utilise la capacité des tiques à trouver un hôte adapté incluant les animaux sauvages, le bétail présent dans les prés ou les animaux de compagnie.

A ces principales techniques, on peut ajouter les prélèvements en tiques via des échantillons d'humus ou l'échantillonnage à vue- ce dernier n'étant valable que pour les adultes uniquement (Schulze et al. 1997a).

Plusieurs études ont examiné ses différents moyens de collecte (Solberg et al. 1992; Schulze et al. 1997b; Petry et al. 2010; Gherman et al. 2012). Chacune de ces méthodes présente une efficacité qui peut être variable selon plusieurs facteurs : l'espèce de tiques, le stade de développement, le type d'habitat, le climat, etc... (Gherman et al. 2012; Dantas-Torres et al. 2013)

Schulze et al. en 1997 a mis en évidence les biais associés à chacune des méthodes. Il en ressort que :

- la collecte sur les vêtements des marcheurs, où les tiques sont récupérées au moyen de guêtres, est plus efficace pour la collecte des adultes *I. scapularis* que la méthode du drapeau (Schulze et al. 1997b),
- la collecte via le piège à CO₂ permet de récolter toutes les stases*. Elle possède de plus, l'avantage d'être indépendante du substrat (c'est à dire du couvert végétal du site investigué) (Gray 1985).
- l'échantillonnage d'humus (prélèvement de la couche superficielle du sol) qui présente l'inconvénient de ne récolter qu'un très faible nombre de tiques et qui ne permet pas de distinguer les tiques à l'affût de celles en réhydratation (Schulze et al. 1997b)
- L'échantillonnage à vu (on opère ici un repérage des individus qui sont à l'affût sur la végétation) qui, du fait de son manque de reproductibilité, n'est intéressante qu'à des fins de collection et pour le stade adulte uniquement.

Caractéristiques précises de la méthode employée par le CNR : la collecte au drapeau

Cette méthode utilise une pièce de tissu éponge clair accrochée à une latte de bois munie d'une corde. Ce drapeau d'1 m², est tiré par un préleveur marchant d'un pas régulier sur la surface d'intérêt (litière, feuillage, bordure de chemin, etc ...). Le drap fait office de leurre et ainsi les tiques à l'affût s'y accrochent (Aeschlimann 1972).

A intervalles de distance réguliers (10 m pour le CNR, ce qui correspond à un « tir de drapeau »), le drapeau est relevé et le collecteur opère à un comptage et au retrait des nymphes ou adultes recueillies. Au final, on obtient un nombre de nymphes par m². Le tout est ramené à une surface de 100 m².

Au sein même de la méthode de la collecte au drapeau, on distingue deux techniques : le « flag-sampling » et le « drag-sampling ». Le « drag-sampling » consiste à traîner le drap éponge sur la litière*, tandis que le « flag-sampling » procède à un prélèvement des tiques plus en hauteur, sur la végétation en tenant le drap à bout de bras. On effleure ainsi la végétation. (Figure 27)

Figure 27. Photographie d'un tir de drapeau en « drag-sampling »



Des travaux ont cherché à comparer ces méthodes de collecte. Il en ressort que les deux techniques communément utilisées pour collecter les tiques à l'affût, la collecte sur les vêtements des marcheurs versus celle au drapeau, donnent des résultats comparables en terme de nombre de tiques (Ginsberg and Ewing 1989). Il faut noter que ces études ont porté sur les espèces *I. scapularis* et *Amblyomma americanum*.

D'autres travaux ont évalué les deux techniques de collecte au drapeau : le « drag-sampling » versus le « flag-sampling ». Aucune différence significative n'a été observée entre la technique du « flag » et celle du « drag » en ce qui concerne l'efficacité de prélèvement des nymphes (exprimée en nombre d'individus collectés/heures) appartenant à l'espèce *I. ricinus*. On notera tout de même que

pour le prélèvement des adultes, le « flag » est plus efficace que le « drag » (Dantas-Torres et al. 2013).

La technique du drapeau est intéressante car elle donne une indication sur le risque d'être piqué par une tique. Néanmoins, la technique du « flag » ou du « drag » ne stimule que les récepteurs sensibles aux mouvements, or d'autres facteurs sont attractifs pour les tiques comme le CO₂ ou la température (Gherman et al. 2012) . Cette méthode possède donc des biais et ne reflète que de façon imparfaite l'abondance des tiques sur le couvert végétal. Le prélèvement effectif maximum n'est que d'environ de 10 % des nymphes présentes au sol, comme l'a étudié Daniels et coll. en 2000 sur l'espèce *I. scapularis*. Ce rendement est donc faible : toutes les tiques ne sont pas à l'affût en même temps et celles accrochées peuvent aussi se décrocher du drap. De plus, l'efficacité de cette technique dépend du couvert végétal. Posé sur la végétation, le drag est plus facilement en contact avec une couche épaisse de végétation de sous-bois que sur des ronces hautes et denses, ceci affectant la qualité de la collecte des tiques (Ginsberg and Ewing 1989; Estrada-Peña et al. 2013b).

Le CNR a opté pour la technique du drapeau pour mesurer l'abondance en tiques à l'affût – c'est à dire susceptible de piquer l'hôte - sur le couvert végétal. Cette technique est largement répandue en Europe et aux Etats-Unis (Piesman 2006; Diuk-Wasser et al. 2012; Salkeld et al. 2014). En effet, celle-ci a par ailleurs été utilisée par le CNR *Borrelia* dès 2002 et en particulier pendant l'étude de Ferquel *et al.* (en 2003 et 2004). Le choix s'est donc tourné vers cette technique de façon à pouvoir comparer avec des données déjà obtenues.

Les collecteurs :

Deux collecteurs au minimum participent aux prélèvements. Ils sont habillés de blanc – de façon à mieux repérer d'éventuelles tiques sur eux-mêmes - et portent des guêtres en toile éponge. Les collecteurs ne s'imprègnent pas de répulsifs cutanés ou vestimentaires.

Pour nos études, nous nous intéressons exclusivement aux nymphes (nombre de nymphes/ 100m²), car elles représentent la stase la plus à risque de transmission de pathogènes pour l'Homme du fait de sa petite taille, de son taux d'infection (environ 10%), de son abondance dans l'environnement et du caractère plus furtif de son gorgement (Kurtenbach et al. 2006).

V) Méthode de détection de la bactérie *B. burgdorferi* sl dans les tiques

Méthode d'extraction des ADN des pathogènes présents dans la tique

L'ensemble des tiques a été traité selon le protocole employé également par le CNR des *Borrelia* suisse (Guy and Stanek 1991; Rijpkema et al. 1996). La technique se base sur un chauffage individuel des tiques dans une solution d'hydroxyde d'ammonium. Ceci permet la formation de pores dans la cuticule* de la tique. Nous disposons donc d'échantillons individuels contenant les ADN des différents pathogènes véhiculés par les tiques (*Anaplasma*, *Borrelia*, ou *Rickettsia* par exemple).

Protocole de détection

Nous avons choisi, pour détecter la présence de l'ADN de *B. burgdorferi* sl, d'amplifier le gène *fla B* (gène codant une protéine majeure du flagelle) par technologie de PCR en temps réel, le gène *fla B* étant une cible commune à toutes les espèces de *B. burgdorferi* sl.

Détection par SYBR Green du gène *fla B* :

- séquence des amorces : FlaBbsl2a : TCTTGCAGGTTTTTCACTCTC ; FlaBbsl4c : GAATTAACTCCACCTTGAGIAGG
- matériel : ABI 7500
- cycle : 50°C (2min), 95°C (10 min), 50 cycles (95°C – 15s et 53°C- 45s)
- à la fin de chaque cycle: réalisation d'une courbe de dissociation (diminution de 0.1°C/s- température de départ : 95°C)
- 2 µl d'extrait d'ADN dans 23 µl de mix

Méthode d'identification des espèces : le typage

Pour déterminer les espèces de *Borrelia* présentes dans les nymphes en Alsace, nous avons réalisé l'identification pour chaque échantillon positif lors de la PCR SYBR Green.

Le typage des espèces de *Borrelia* a été réalisé par une deuxième PCR utilisant des sondes d'hybridation fluorescentes spécifiques pour chaque espèce de *B. burgdorferi* sl (cible = *fla B*). Onze sondes d'espèces ont actuellement été mises au point par le CNR (10 sondes de FRET et une sonde TaqMan) pour *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissetii*, *B. spielmanii*, *B. andersonii*, *B. japonica*, *B. turdae* et *B. tanukii*.

PARTIE III

Description du projet

La composante spatiale dans la transmission de la maladie de Lyme a été étudiée très tôt après la découverte de l'origine vectorielle de la transmission. Ainsi, Nicholson en 1996 décrit, par exemple, que le risque de contracter une maladie de Lyme est plus fréquent dans les zones péri-domestiques. Il y démontre l'association entre la maladie de Lyme chez les Hommes et l'importance à la fois de la population de tiques et son taux d'infection à *B. burgdorferi*. De plus, il mentionne également l'absence de caractère prédictif des communautés d'espèces végétales comme marqueur de la présence des tiques (Nicholson and Mather 1996). Depuis, les études cherchant à découvrir les déterminants environnementaux de la présence/abondance de la tique se sont multipliées (Dister et al. 1997; Guerra et al. 2002; Randolph et al. 2002; Barandika et al. 2006; Gern et al. 2008; Levi et al. 2012; Ruiz-Fons et al. 2012; Estrada-Peña et al. 2013a; Swart et al. 2014; Boehnke et al. 2015).

Au delà de l'intérêt purement scientifique, la connaissance de cette composante spatiale dans cette maladie a un intérêt notable en santé publique. En effet, celle-ci est un élément clé pour la prévention primaire de la maladie de Lyme - et plus largement des « maladies à tiques ».

La prévention primaire de la borréliose de Lyme est une priorité de santé publique et, le CNR des *Borrelia* joue y un rôle prépondérant. De façon à honorer cette mission, le CNR a engagé ce projet de thèse. Ainsi, la planification quinquennale 2012-2016 du CNR *Borrelia* a souhaité investiguer les questions d'épidémiologie suivantes :

- Y a-t-il eu évolution de la densité de tiques en Alsace en 10 ans ?
- Y a-t-il eu évolution du taux de tiques infectées en Alsace en 10 ans ?
- Quelle est la variation de la densité de tiques et du taux de tiques infectées au cours d'une année sur un même site géographique ?
- La densité de tiques et le taux de tiques infectées sur une année est-elle la même dans différents biotopes* d'une même région?
- Quels paramètres peuvent être associés à ces éventuelles variations : type de végétation, température, hygrométrie par exemple ?

Chacune de ces questions s'inscrit, nous le verrons, dans les interrogations actuelles relative à la maladie de Lyme. Par conséquent, de façon à essayer de répondre à ces questions, nous avons engagé deux études limitées aux objectifs suivants :

- évaluer, 10 ans après une première étude, les densités en nymphes en zone d'endémie **(Article n°1 soumis à *Applied Environmental Microbiology*)**
- mettre en évidence sur les sites collectés en Alsace, des facteurs capables de nous orienter sur l'abondance des nymphes **(Article n°2 soumis à *Ticks and Tick-borne Diseases*)**
- évaluer de façon globale le risque de borréliose de Lyme en Alsace au travers de l'évaluation des densités en nymphes infectées.

Etude à dix ans des densités en nymphes dans une zone d'endémie*

I) Contexte de l'étude

La tique *Ixodes* est un parasite ectotherme, son bien-être est influencé, en particulier, par la température (Macleod 1932). D'autres facteurs (biotiques* ou abiotiques*), nous l'avons vu, jouent sur la répartition géographique des tiques. Des modifications du biotope*, telles une modification du paysage ou des populations en hôtes de gorgement*, sont des éléments qui influent la dynamique des populations de tiques (Buskirk and Ostfeld 1995; LoGiudice et al. 2003; Keesing et al. 2009; Bouchard et al. 2013; Jore et al. 2014).

L'actualité environnementale met en avant un changement climatique au niveau mondial avec une augmentation des températures. Ainsi, nous pouvons citer le 4^{ème} rapport intergouvernemental sur le changement climatique qui prévoit une augmentation des températures au Nord de l'Europe entre 1,5 et 2,5°C dans les prochaines décennies (Christensen JH, Hewitson B, Busuioc A, Chen A Gao X, Held I, Jones R, Kolli RK, Kwon WT, Laprise R, Magana Rueda L, Mearns L, Menendez CG, Raisanen J, Rinke A, Sarr A 2007). Ces modifications climatiques vont potentiellement impacter les densités en tiques, modifier la distribution et l'activité saisonnière des tiques (Medlock et al. 2013).

D'autres hypothèses peuvent être avancées pour expliquer une potentielle augmentation de la densité en tiques et/ou de la prévalence de *Borrelia* chez les nymphes au niveau local et/ou mondial. Ainsi, nous pouvons proposer que des changements du biotope* et/ou une modification des réservoirs animaux peuvent influencer la présence et le développement de la population de tique.

Pour ce projet de recherche, notre zone géographique d'investigation se borne à l'Alsace. Nous explorons donc la possibilité d'une augmentation de l'abondance des tiques au travers de l'évaluation de la densité en nymphes dans ce périmètre, 10 ans après une première étude.

Nous l'avons souligné, le pas de temps pour cette étude est une décennie. Celui-ci a été déterminé par le fait qu'une étude cherchant à déterminer la densité en nymphes dans certains lieux d'Alsace avait été conduite en 2003 et 2004 (Ferquel et al. 2006). Nous avons donc réitéré cette étude 10 ans après celle-ci.

II) Matériel et méthode statistique

L'étude de 2003 et 2004 a été réalisée par le CNR *Borrelia* situé à l'époque à l'Institut Pasteur de Paris pour la partie entomologique. La partie concernant l'épidémiologie humaine (B. Jaulhac, laboratoire associé au CNR *Borrelia*) était déjà localisé à Strasbourg à l'époque.

En 2013, nous avons demandé la coopération du Dr. Ferquel (responsable du CNR des *Borrelia* en 2003 et 2004) pour le repérage des coordonnées exactes. Nous les avons localisés grâce à un GPS (Garmin®).

A partir du mois d'avril (inclus) et jusqu'au mois d'octobre, nous avons collecté tous les sites chaque mois, les nymphes et les adultes sur les mêmes sites que ceux de 2003/2004. Nous avons respecté quatre semaines d'intervalle entre chaque sortie dès lors que les conditions météorologiques le permettaient.

Méthodologie statistique de l'étude de 2003-2004 :

En 2003-2004, le CNR Pasteur a sélectionné les lieux de collecte grâce à un sondage aléatoire stratifié à deux niveaux (Ferquel et al. 2006). Le site d'échantillonnage constitue le premier niveau et la distance de 10 m de long le second niveau. Ces deux paramètres ont été sélectionnés au hasard. La densité des tiques a été estimée à partir du nombre total de tiques collectées dans chaque forêt.

Au total, huit points de collecte répartis sur trois sites ont été investigués en 2003 et 2004 sur lesquels 16 tirs de 10m ont été effectués. Les trois sites considérés sont Dannemarie, Guebwiller et Munster. Trois densités ont donc été déterminées mensuellement pour 2003, 2004, 2013 et 2014. Les intervalles de confiance à 95 % des densités en nymphes en 2003 et 2004 ont été fournis grâce à la formule suivante :

$$d = \frac{1}{S} \hat{t}_y = \frac{1}{S} \frac{M}{m} \sum_{i=1}^m \frac{N_i}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}$$

Dans cette formule :
 S est la surface de la forêt,
 t est le nombre total de nymphes estimé,
 M est le nombre total de sites échantillonnés,
 m le nombre de sites sélectionnés de façon aléatoire,
 n_i le nombre de sous-échantillons sélectionnés de façon randomisée sur un site,
 N_i le nombre total de sous-échantillons dans un site,
 y_{ij} le nombre total de nymphes collectées dans le sous-échantillon j du site sélectionné i.

Nous avons opté pour la stratégie suivante.

- Densités obtenues en 2013 et 2014 avec la formule de Ferquel *et al.* en 2006 :

Les densités en 2013 et 2014 pour chaque mois et pour chaque site ont été calculées à l'aide de la formule ci-dessus. Puis ces densités ont été comparées avec celles obtenues en 2003 et 2004 au moyen d'une régression logistique multinomiale. Les variables d'intérêt testées sont l'année de collecte, le mois et le site). Les résultats sont présentés ci-dessous.

Tableau V. Résultats de l'analyse multivariée sur les densités de 2003, 2004, 2013 et 2014.

Variable	β	SE	z	p
Intercept	6.1	0.17	36.0	***
SITE				
Murbach	Reference			
Dannemarie	-1.8	0.13	-14.4	***
Munster	-0.6	0.13	-4.5	***
MONTH				
April	-0.39	0.18	-2.2	*
May	Reference			
June	-0.18	0.17	-1.1	0.3
July	-0.51	0.17	-3.0	**
August	-1.20	0.2	-5.6	***
September	-2.2	0.18	-11.5	***
October	-2.8	0.2	-13.2	***
YEAR				
2003	-0.2	0.17	-1.3	0.19
2004	Reference			
2013	-1.1	0.16	-6.9	***
2014	-2.1	0.17	-12.4	***

p<0.001 *** ; p<0.01** ; p<0.5*

Les résultats ci-dessus nous permettent d'affirmer que les années 2013 et 2014 possèdent des densités statistiquement inférieures à celle de 2003 et 2004 (p<0.001). De plus, les sites de Dannemarie et de Munster possèdent des densités statistiquement inférieures au site de Murbach. Le mois de mai et le mois de juin restent les mois de plus forte densité en nymphes.

- Méthodologie statistique réalisée par le CNR à partir de 2012 :

Les densités ont aussi été calculées à partir de 2013 via le calcul suivant :

$$D = \sum ni/t$$

n correspond au nombre de nymphes totales prélevées sur le lieu de collecte i, et t : le nombre de tirs effectués. La densité D est rapportée à une surface de 100 m².

Plusieurs éléments ne nous permettent pas d'utiliser les formules habituelles pour établir les bornes de l'intervalle de confiance à 95% pour chaque estimation de la densité. En effet, d'une part, les densités en nymphes sont des mesures qui ne suivent pas une loi Normale. D'autre part, nous ne bénéficions parfois que d'une seule mesure (ex : une mesure par mois à Dannemarie), nous empêchant ainsi d'avoir une estimation de la variabilité sur ces points.

Les particularités statistiques à prendre en compte en épidémiologie vectorielle

La revue de la littérature nous apprend qu'en écologie, l'hyperdispersion est observée régulièrement (Taylor 1961). Aussi, par exemple, hormis quelques exceptions, les macroparasites (helminthes et arthropodes) sont agrégés au sein de leur population d'hôtes, avec la plupart des individus hébergeant un faible nombre d'individus mais quelques individus portant un nombre élevé de parasites (Wilson 2001).

Notre contexte (nymphes sur le couvert végétal) est différent, cependant, nous avons également observé cette hyperdispersion dans nos données- comme nous allons le voir ci-dessous.

Les causes biologiques de l'agrégation des données:

L'agrégation initiale des œufs issus d'une ponte -et donc des larves- conditionne l'agrégation de stases ultérieures.

Les capacités de déplacement des stases immatures (larves et nymphes) sont limitées (Falco and Fish 1991; Perret et al. 2003; Crooks and Randolph 2006; Medlock et al. 2013). Celles-ci n'ont pas une grande capacité de déplacement horizontal. A l'inverse, les adultes peuvent être transportés sur de plus grandes distances grâce au portage par les cervidés notamment-ce qui peut aussi être le cas pour les nymphes. Classiquement, on dit aussi que les larves et les nymphes sont agrégées en « pocket ».

Les tiques « libres » (c'est à dire non attachées sur un hôte), sont retrouvées en particulier dans des microhabitats- et donc typiquement « en cluster ». Il apparaît donc d'emblée une répartition non aléatoire (ou non uniforme) des tiques (Sonenshine and Mather 1993). De plus, la distribution spatiale des tiques est fortement agrégée et ceci même dans les sites où les conditions météorologiques et la végétation apparaissent comme homogènes (Estrada-Peña et al. 2013b).

Par ailleurs, cette hyperdispersion des données a déjà été mise en évidence au niveau du couvert végétal au travers de travaux de modélisation du risque acarologique réalisés aux Etats-Unis (Diuk-Wasser et al. 2010). Elle est donc un élément à prendre en compte pour notre démarche calculatoire.

Nous effectuons un comptage du nombre de nymphes par drapeau : notre distribution sera donc modélisée par une loi de Poisson.

Du fait de l'agrégation biologique des nymphes, nous devons investiguer l'hyperdispersion des données- défini comme un écart-type supérieur à la moyenne. Elle peut l'être par un test statistique : le test de Dean (Dean 1992; Yang et al. 2007). L'hyperdispersion des données est fréquente selon Ver Hoef et Boveng (2007) et c'est la raison pour laquelle plusieurs modèles ont été développés pour modéliser cette configuration de données (Ver Hoef and Boveng 2007). Ce sont les modèles basés sur la loi binomiale négative et le modèle dit de quasi-Poisson (Wedderburn 1974).

La littérature nous montre que les données de densité en nymphes sont bien modélisées par une loi de quasi-Poisson ou une loi binomiale négative (Ruiz-Fons et al. 2012).

Du point de vue de notre problématique, considérer l'hyperdispersion est un point important. En effet, si elle n'est pas prise en compte alors qu'elle est présente, l'hyperdispersion induit une mauvaise estimation des paramètres du modèle.

Dans nos analyses, nous avons eu recours au test d'hyperdispersion, disponible dans la librairie AER du logiciel R. La fonction correspondante est : `dispersiontest()` (R core team 2013).

Au final, nous utilisons un modèle linéaire généralisé pour une distribution négative binomiale (famille exponentielle) et un lien logarithmique. L'équation de notre modèle linéaire généralisé a donc la forme suivante : $E(Y) = \exp(\mu + \alpha X_1 + \beta X_2 + \gamma X_3 \dots)$.

Le modèle à générer est un modèle expliquant une variable quantitative discrète expliquée par deux variables qualitatives, le mois et le lieu. Nous sommes donc dans le cas de figure de l'utilisation d'un modèle linéaire généralisé multivarié: la régression multivariée de Poisson.

Les modèles linéaires généralisés :

Les modèles linéaires généralisés sont des outils généraux dans la modélisation en comparaison aux modèles linéaires simples. Dans la régression linéaire simple, une variable Y est exprimée en fonction d'une seule variable X et suit une loi Normale. L'erreur epsilon (appelée également « résidu aléatoire ») suit une loi Normale, est non corrélée linéairement à X et a une espérance $E(\epsilon)=0$.

Elle s'exprime sous la forme : $Y = \alpha + \beta X + \epsilon$

L'extension de ce modèle est le modèle linéaire général qui met en relation l'espérance de Y avec les valeurs prises par une ou plusieurs p co-variables avec comme fonction de lien une autre loi que la loi Normale.

Dans un modèle linéaire généralisé, on met en relation l'espérance d'une variable dépendante Y avec un ensemble de co-variables X_j . Et ceci sous certaines conditions:

- la fonction de distribution de la variable Y appartient à la famille exponentielle
- l'espérance de Y est reliée à un paramètre par l'intermédiaire d'une fonction de lien qui est monotone, différentiable et le prédicteur linéaire s'exprime comme une combinaison linéaire des co-variables.

La famille exponentielle est un ensemble de lois dont l'écriture est résumée par une formule unique. Celle-ci prend en compte un paramètre dit « naturel » de la famille exponentielle appelé paramètre « canonique » et un paramètre de dispersion. Chaque famille exponentielle est déterminée par un paramètre de dispersion, une fonction de lien, une fonction de variance, etc ...). Ici, dans notre cas, la fonction de lien de notre modèle final est une fonction logarithmique.

Les solutions au modèle de Poisson dans le cas d'une hyperdispersion

En cas d'hyperdispersion, les paramètres du modèle ne sont pas correctement estimés si celle-ci n'est pas prise en compte. En cas d'hyperdispersion, deux modèles peuvent être employés : le modèle de quasi-Poisson et le modèle négatif binomial (Ver Hoef and Boveng 2007).

III) Résultats et article

Les résultats des densités en nymphes obtenues en 2003, 2004, 2013 et 2014 avec leur intervalle de confiance à 95 % sont résumés dans le tableau VI.

Tableau VI. Densités en nymphes en 2003, 2004, 2013 et 2014

Nymph densities										
Month	Site	2003*	IC*	2004*	IC*	2013	IC	2014	IC	Source*
April	Dannemarie	NC	NC	40	[29-51]	11	[3-18]	1	[0-2]	Ferquel et al. AEM 2006
	Guebwiller	NC	NC	308	[156-459]	82	[47-116]	27	[11-43]	
	Munster	51	[34-69]	246	[38-455]	74	[41-107]	46	[29-63]	
May	Dannemarie	NC	NC	41	[24-58]	18	[10-25]	6	[2-10]	
	Guebwiller	248	[54-442]	488	[303-673]	301	[220-381]	102	[46-160]	
	Munster	103	[78-129]	398	[26-771]	89	[62-116]	29	[16-42]	
June	Dannemarie	NC	NC	35	[19-51]	1	[0-4]	16	[5-28]	
	Guebwiller	308	[53-563]	238	[101-375]	299	[117-482]	56	[0-118]	
	Munster	110	[56-164]	177	[0-384]	94	[7-181]	15	[12-18]	
July	Dannemarie	29	[28-31]	34	[21-47]	12	[2-22]	9	[1-16]	
	Guebwiller	203	[97-308]	255	[63-447]	77	[0-165]	52	[9-95]	
	Munster	117	[84-150]	215	[0-471]	22	[4-40]	6	[1-12]	
August	Dannemarie	NC	NC	NC	NC	6	[1-11]	3	[0-6]	
	Guebwiller	NC	NC	NC	NC	59	[0-123]	17	[5-29]	
	Munster	NC	NC	NC	NC	26	[1-51]	2	[1-3]	
September	Dannemarie	6	[5-8]	21	[12-31]	3	[0-5]	0	[0-5]	
	Guebwiller	39	[20-58]	59	[10-107]	26	[9-43]	9	[1-17]	
	Munster	31	[4-58]	34	[3-65]	6	[3-10]	2	[1-3]	
October	Dannemarie	NC	NC	NC	NC	3	[0-5]	0	[0-2]	
	Guebwiller	53	[9-97]	16	[0-31]	7	[3-11]	7	[4-10]	
	Munster	30	[24-35]	14	[0-28]	1	[0-2]	2	[0-6]	

NC : not collected ; * Data from the Ferquel et al. study in 2003/2004 (38)

- Similarités des résultats de densités obtenues entre les deux méthodes :

Nous avons cherché à évaluer la similarité des résultats des densités sur les trois sites (Dannemarie, Guebwiller et Munster) obtenus grâce aux deux méthodes successives (CNR Pasteur et CNR de Strasbourg).

Nous avons analysé les corrélations entre les mesures pour un même site pour le même mois (test de corrélation de Spearman) selon chaque des méthodes. Le coefficient de corrélation obtenu est de 0.98 avec un risque alpha inférieur à $2,2 * 10^{-16}$. Les estimations sont donc parfaitement similaires.

De plus, nous avons réalisé un test pour déterminer si les densités via la formule utilisée par l'institut Pasteur et selon notre méthode étaient statistiquement différentes ou non. Nous avons réalisé un test non paramétrique apparié (test de Wilcoxon). Notre p étant égal à 0,18, nous avons pu accepter notre hypothèse d'égalité des densités.

ARTICLE N° 1 (soumis à APPLIED and ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY)

Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum*, density and species distribution in the *Ixodes ricinus* tick: a ten year follow-up study in Alsace, an endemic region in France

Valérie Goldstein^a, Nathalie Boulanger^{a,b}, A. Grillon^a, Laurence Zilliox^b, Mickäel Schaeffer^c, Elisabeth Ferquel^d, Danièle Napolitano^b, Jean-Claude George^b, Benoît Jaulhac^{a,b*}

Early Bacterial Virulence: Lyme borreliosis Group, Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg,

Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, VBP EA 7290, F-67000 Strasbourg, France^a

French National Reference Center for Borrelia, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France^b

Département de santé publique, Centre hospitalier universitaire, Strasbourg, France^c

Unité Environnement et Risques infectieux, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr. Roux 75024 Paris Cedex 15 France^d

*Corresponding author: jaulhac@unistra.fr

Abbreviations: LB, PCR, *fla* B, CI, HGA

Keywords: Lyme borreliosis, *Ixodes* sp, *Borrelia burgdorferi*, risk, prevalence, *Anaplasma* spp.

Abstract

Lyme borreliosis is the most frequent vector-borne disease occurring in the Northern hemisphere, and the numbers of humans affected have been increasing in some parts of the world. The main vector of this disease in Europe is the hard tick *Ixodes ricinus*. In France, Lyme borreliosis is endemic to several regions including the Alsace region, where the densities of infected *Ixodes ricinus* ticks and pathogens were studied in 2003 and 2004. The aim of the present study, which focused on the nymph densities and the prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks at the same collection sites, was to determine whether the acarological risk to humans has increased in the Alsace region. These sites were investigated every month between April and October in both 2013 and 2014. We also studied the distribution of *B. burgdorferi* s.l. complex species between collection sites in Alsace. The 4,278 nymphs collected were analyzed by real-time PCR. The nymph densities showed no statistically significant increase ten years after the first study. No significant increase in the prevalence of either *B. burgdorferi* s.l. or that of *A. phagocytophilum* was observed in these nymphs in 2013/2014 in comparison with 2003/2004. No increase in the acarological risk can therefore be said to have occurred ten years after the previous study. In this part of France, where *I. ricinus* has long been established, global warming does not seem to have impacted the patterns of nymph density over the last ten years.

Introduction

Lyme borreliosis is the most frequent vector-borne disease occurring in the Northern hemisphere (1). This disease is caused by a spirochete bacterium which is inoculated into humans via tick bites (2). The hard tick *Ixodes* spp. is the main vector responsible for transmitting *Borrelia burgdorferi* s.l. to humans (1–3). *B. burgdorferi* s.l. complex currently includes at least 20 species (4, 5). An association is known to exist in Europe between the various *Borrelia* species and their host species: small mammals are known to be a good reservoir for *B. afzelii*, whereas birds are mostly infected with *B. garinii* and *B. valaisiana* (6, 7). The main species involved in the human clinical cases of Lyme borreliosis occurring in Europe are *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* and *B. burgdorferi* sensu stricto (ss). Some preferential associations have been described between neurological symptoms and *B. garinii* and *B. bavariensis*, Lyme arthritis and *B. burgdorferi* ss, and acrodermatitis chronica atrophicans and *B. afzelii* (8–12). Other species, such as *B. valaisiana*, *B. bissettii*, *B. lusitaniae* and *B. spielmanii*, have rarely been detected in human samples (13–16).

Ixodes spp. are also involved in the transmission of other bacterial pathogens such as *Anaplasma phagocytophilum*, an obligate intracellular bacterium belonging to the *Anaplasmatacea* family, which is pathogenic to both humans and animals (17, 18). Human granulocytic anaplasmosis was first described in 1994 in the northern United States, and the first European case was reported in Slovenia in 1997 (19, 20). The first case of human granulocytic anaplasmosis (HGA) in France was reported in 1999 (21). Since 1999, the year the disease became notifiable in the USA, the number of cases of HGA reported has been increasing steadily every year in this country (22).

Ixodes spp. is a three life-stage (larvae, nymphs and adults) hematophagous arthropod which is heterogeneously distributed around the world (23). Apart from the Baltic countries and Finland, where *I. persulcatus* is also present (24), *I. ricinus* is the only species present in Europe performing questing activities and carrying *B. burgdorferi* s.l (25). Spirochetes reside in the ticks' midgut and migrate to the salivary glands during the ingestion of blood meals (26) before being injected into the host's skin (27–29). Since the nymphs are too small to be easily detected, they constitute the highest risk to humans of being infected by *B. burgdorferi* s.l spirochetes: they are involved in 90 % of all cases of tick-borne disease in humans (19, 20, 30). Since *I. ricinus* ticks are ectoparasites which spend most of their lives off-host, temperature and humidity are the main environmental factors on which the distribution of *Ixodes* spp. depends (31). The height at which the ticks quest depends on their stage (larvae, nymphs or adults): the larvae stay on the ground, whereas nymphs and adults climb to heights of up to 150 cm (32).

The authors of an epidemiological study reported the occurrence of an increase in the number of cases of Lyme borreliosis occurring in the USA from 1992 to 2006 (33, 34). At the same time, during the last decade, the numbers of cases of Lyme borreliosis have increased in some European countries, namely Poland, Eastern Germany, Slovenia, Bulgaria, Norway, Finland, Belgium, Britain (England, Wales and Scotland), France and the Netherlands (34–39). Several hypotheses can be put forward to explain this increase: an improvement in physicians' diagnoses, increased exposure of humans to ticks, increased tick densities and higher rates of *Borrelia* infection in ticks, or both of the latter causes combined.

Alsace, a part of France where Lyme disease has been endemic for many years (38, 39), was previously studied in terms of the acarological risk by Ferquel et al. in 2003

and 2004 (40), who focused on the tick nymph densities, the density of infected nymphs, the prevalence and species distribution of *B. burgdorferi* and the prevalence of *A. phagocytophilum* in ticks. Some administrative divisions of French departments in Alsace were found to have both a high prevalence of Lyme borreliosis, high tick nymph densities, high rates of infection and high infected nymph densities (40). Ten years later, we reinvestigated this region in order to determine whether any changes in the nymph density or in the prevalence of *B. burgdorferi* and/or *A. phagocytophilum* had occurred in nymphs. We also mapped the distribution of the pathogenic species in nymphs, depending on the site and the year of collection.

Material and Methods

Collection sites. All the sites at which tick nymph specimens were collected in 2003-2004 were again visited in 2013-2014. The transects (GPS-localized-GPS Garmin 62®) crossing each site were located and visited with one of the investigators involved in the 2003/2004 study. As in 2003 and 2004, three plots at the Guebwiller site (at Rimbach, Murbach and Appenthal), four plots at the Munster site (at Sattel, Chêne Voltaire, Wasserbourg and Firstplan) and a single plot at Dannemarie were studied in order to estimate the nymph densities in each forest. Host seeking nymphs were collected every month from April to October in 2013 and 2014 (Fig.1).

Tick sampling procedure. At each visit, host seeking ticks (questing nymphs and adults) were collected from the vegetation and litter by dragging, as previously done (40), a 1 m² white cotton cloth over an area of 10 meters and inspecting the cloth for ticks every 10 m, and 16 transects were performed. Nymph and adult ticks were removed from the cloth, identified, counted, and kept in plastic tubes until being stored at -20°C within ≤ 24h. The existence of strict agreement between the

prevalence of fresh nymphs collected on clean clothes and on clothes rinsed three times with water was checked on a collection site showing an infection rate of 16 % with *Borrelia*. At each visit, the ground temperature and relative hygrometry (RH) were measured with a LCD Digital Hygro-Thermometer® (Moineau Instruments) and recorded. At least two collectors participated in each visit, which took place every month between 8:30 a.m. and 6:30 p.m.

DNA extraction. Total DNA was extracted from individual *I. ricinus* nymphs as previously described (41, 42). Briefly, nymphs were sampled randomly on the field and stored within 12h at -20°C. Then 60 nymphs were analyzed unless a plot contained fewer than 60 ticks. Nymphs were thawed, washed with 70 percent alcohol for 1 to 3 minutes, rinsed with distilled water and dried on absorbent paper. Each individual nymph was then immersed in a tube containing a 100µl solution of NH₄OH (0.7M), which was placed in a safety cabinet. Tubes were incubated for 15 minutes in a heating block at 100°C and then centrifuged. To evaporate the NH₃, opened tubes were re-heated for 15 minutes at 100°C before being stored at -80°C. The presence of *B. burgdorferi* sl DNA was checked in all the extracts using a specific real-time PCR procedure targeting a conserved region of the *fla* B gene and a TaqMan® probe (43). PCR reactions were performed on a 7500 Real Time PCR thermocycler System (Applied Biosystems) and the analyses were performed with 7500 software version 2.0.6 (Applied Biosystems). The existence of strict agreement between the prevalence of *B. burgdorferi* sl in frozen (at -20°C and at -80°C) and fresh nymphs was checked on 60 *Borrelia* nymphs showing an infection rate of 16 % with *Borrelia*.

***Borrelia* typing and *Anaplasma* detection.** A PCR typing assay was performed on each positive sample in order to identify the *B. burgdorferi* sl species, using the same primers as those used in the PCR detection assay, the LightCycler®

FastStart DNA Master Mix HybProbe (Roche), lightCycler® Capillaries 20 µl (Roche), the thermocycleur LightCycler® 2.0 (Roche) and the LightCycler® Software Version 4.1 (Roche) and specific probes for *B. garinii* / *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s. s., *B. bissetii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, and *B. spielmanii*. *B. garinii* and *B. bavariensis* were not investigated separately allowing us to compare our results with data of the 2003-2004 study.

The prevalence of *A. phagocytophilum* in nymphs was determined by performing real-time PCR assays targeting the *msp2/p44* gene using a TaqMan probe (18).

Statistical analyses. In our 2013 and 2014 study, the nymph densities were first determined with the formula previously used in 2003/2004 in order to compare the latest data with those previously published (40). This formula was based on the nymph densities (mean density per 100 m²) and the 95 percent confidence intervals recorded at a site where 16 transects were performed in each plot. Based on these data, the densities were compared between years and sites using the appropriate generalized linear model. The statistical method used was then updated: the nymph density was determined at each site using the 30 transects performed in 2013 and 2014 at each site. R software (3.0.2) and the appropriate packages were then used to determine the nymph densities and 95 percent confidence intervals. As the pattern of nymph density did not follow a Gaussian distribution because a single transect was performed at Dannemarie, and as the data were overdispersed, a binomial negative model with a logarithmic link function was used to determine the 95 percent confidence interval corresponding to each nymph density observed in 2014. Collection sites and months were used as covariates in the model and the nymph density was adopted as the response variable. Ninety-five percent confidence

intervals corresponding to each monthly nymph density at each site were calculated. Ninety-five percent confidence intervals were determined on the infection rates using the R binom package with the binom.confint function.

To make sure that these two methods were equivalent, a Student's paired t-test was conducted on the data and the correlation coefficient was determined between the nymph densities estimated with the 2003/2004 formula and the present method. The paired T-test showed the existence of no significant differences between the two methods ($p=0.18$) and the correlation coefficient was 0.98 with a p -value $< 2 \times 10^{-16}$. It was therefore concluded that either method can be used to estimate the nymph densities at a given site and to compare the nymph densities between years at a given site.

Results

Nymph densities. Nymphs were collected at three sites in Alsace (Fig.1). As was to be expected, the nymph densities were low in April and August, and higher in May and June in both 2013 and 2014. No increase was ever observed in September or October in comparison with the summer period (Fig. 2). Higher nymph densities were observed in 2013 than in 2014, but this difference was not statistically significant (Fig. 2).

At Dannemarie in 2013, the nymph densities ranged between 18 nymphs per 100 m² (in May) to 1 per 100 m² (in June) (Fig. 2), whereas in 2014, the nymph densities ranged at this site between 16 nymphs per 100 m² (in June) and 0 nymphs per 100 m² (in October). At Guebwiller in 2013, the nymph densities ranged between 301 (in May) to 7 per 100 m² (in October) and between 102 (in May) and 7 per 100 m² (in October) in 2014. At Munster in 2013, the nymph densities ranged between 94 nymphs (in June) and 1 nymph per 100 m² (in October) and in 2014, they ranged between 56 (in April) and 1 (in October) (Fig. 2). During the present two-year study period, the highest nymph density (301 nymphs per 100 m²) was observed in May 2013 at Guebwiller (Fig. 2). The overall nymph densities were ten times higher at Guebwiller than at Dannemarie.

Rates of *B. burgdorferi* sI infection in nymphs. At all three sites combined, the nymph infection rate with *B. burgdorferi* sI was 10.0% (CI_{95%} =[8.8-11.4]) in 2013 and 7.5% (CI_{95%} =[6.5-8.7]) in 2014. There was a slightly significant difference between the 2013 and 2014 infection rates, which were slightly significantly lower in 2014 than in 2013 (p<0.05). The nymph infection rates with *B. burgdorferi* sI differed significantly between sites in 2013/2014: the overall nymph infection rate at

Dannemarie, Guebwiller and Munster was 3% (CI_{95%} = [1.4-6.3]), 10.3% (CI_{95%} = 9.1-11.7) and 7.4% (CI_{95%} =6.5-8.9), respectively (Table 1). In both 2013 and 2014, the lowest nymph infection rate was observed at Dannemarie, and the highest rate, at Guebwiller.

No significant differences in the nymph infection rates were observed between sites in 2013 (Table 1), whereas the nymph *B. burgdorferi* sl infection rate was statistically higher at Guebwiller than at Dannemarie in 2014 (Table 1).

***B. burgdorferi* sl species distribution varies according to the site and the year of collection.** Nymphs in the Alsace region were mainly infected with *B. afzelii* and *B. garinii* / *B. bavariensis*. Overall, *B. afzelii* was the main species with which nymphs were infected in 2013, whereas in 2014, *B. garinii* / *B. bavariensis* were the main species detected (Table 2). *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. valaisiana*, *B. spielmanii* and co-infections of several *Borrelia* species were also observed but not at all the sites. At Dannemarie, for example, three different *Borrelia* species were detected in 2014: *B. afzelii*, *B. garinii* / *B. bavariensis* and *B. spielmanii*, but no other species or *Borrelia* co-infections were detected, whereas a greater variety of *B. burgdorferi* sl species was observed at Guebwiller and Munster (Fig. 3).

At all the latter study sites, *B. afzelii* and *B. garinii* / *B. bavariensis* were the main *Borrelia* species detected in the nymphs collected in 2013 and 2014. In 2014, significantly larger numbers of nymphs were infected with *B. garinii* / *B. bavariensis* at Munster than at Guebwiller (Fig. 3). *B. spielmanii* was detected at all three study sites. In 2014, only three nymphs were found to carry *B. burgdorferi* sl at Dannemarie: one of them was infected with *B. afzelii*, one with *B. garinii* / *B. bavariensis* and one with *B. spielmanii*, which means that these three *Borrelia*

species were equally distributed at this site (Fig. 3). Whatever the month of collection, *B. afzelii* and *B. garinii* / *B. bavariensis* were always the most prevalent species in nymphs. *B. burgdorferi* ss was present at every month of collection (from April to October). *B. valaisiana* was present in May, August and September 2013 and in March and September 2014. *B. spielmanii* was present in July 2013 and March 2014 (data not shown). Taking these two years together, no specific associations were observed between the month of collection and the presence of *B. burgdorferi* species in the nymphs (data not shown).

Anaplasma phagocytophilum. The prevalence of *A. phagocytophilum* was highest at the Dannemarie site (3%) during both 2013 and 2014 (Table 3), but the rates of infection did not differ significantly between the three sites investigated. The prevalence of this bacterium in nymphs was 0.7 % (CI_{95%}=[0.4-1.4]) in 2013 and 1.1% (CI_{95%}=[0.7-1.6]) in 2014; no significant difference in the prevalence of *A. phagocytophilum* were observed between these 2 years.

Discussion

In this region in which Lyme borreliosis is endemic, field studies were conducted in 2013 and 2014 on the monthly nymph densities, rates of nymph infection by *B. burgdorferi* sl and *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* sl complex species distribution and compared with the data obtained ten years before. The same locations (recorded by GPS) as those adopted in the 2003/2004 field study by Ferquel et al. (2006) were investigated using similar tick sampling procedure and method of statistical analysis. Two of these sites were selected since the authors of a

human epidemiological study has described them as being associated with a particularly high risk of transmission of Lyme borreliosis (Munster and Guewiller versus Dannemarie, a low risk area) (44). In the present study, high nymph densities were mostly observed in 2013/2014 during the months of May and June, as classically observed in the field of nymph phenology (1, 31). However, a very low nymph density was observed in June 2013 at Dannemarie. Based on the Infoclimat® website, it was noted that it had rained steadily (giving rainfall levels of up to 12.6 mm 24 hours before the sampling took place) in June at Dannemarie. This rainfall level increased to 17% of the expected total monthly rainfall. The high rainfall may therefore have affected the nymph density measured at Dannemarie in June.

As the same locations were studied here as ten years ago, the changes in nymph density were analyzed by comparing the data obtained in the present two-year study with those obtained in 2003/2004 by Ferquel et al. (40). Some of the nymph densities recorded in 2013/2014 were significantly lower than those observed in 2003/2004 (Table S1). The nymph density was higher at Dannemarie in July 2003 than in 2013 and 2014, for example. No evidence of an overall increase in the nymph densities was therefore obtained here in comparison with those recorded ten years ago at the same three locations in Alsace. In addition, multivariate statistical analyses on data obtained in 2015 and 2016 showed that the nymph densities occurring during the latter two years were again significantly lower than in 2003/2004 (Fig. S1a).

Lower nymph densities were observed at Dannemarie than at Guebwiller or Munster during both the periods 2003/2004 and 2013/2014 studied. This difference may have been due to the specific situation of Dannemarie, which is located in an agricultural area consisting mainly of open spaces at a fairly low altitude (320m). A similar range of stable nymph densities was observed at each of these sites after a ten-year

interval, and statistically significant differences of nymph density were observed between these sites after a ten-year interval. This suggests that the nymph densities may depend on the biotope of the study sites. The composition of forest populations such as deciduous, coniferous or mixed forest, the canopy and the age of the forest are known to impact tick populations (45). In fact, the three sites studied here did not have exactly the same biotope. Dannemarie is a lowland deciduous forest area. Munster and Guebwiller are located at higher altitudes and therefore harbor the mixed forest vegetation (deciduous and coniferous trees) typical of the Vosges Mountains. Open areas have been reported to contain fewer nymphs than deciduous and mixed forests. Nymphs are more abundant in deciduous and mixed forests than in pine forests (46–48). In fact, a difference was observed in the present study, between the nymph densities recorded at mixed forest sites (Munster and Guebwiller) and a deciduous forest site (Dannemarie). Differences between nymph densities may also be attributable to differences in terms of mammalian populations (rodents and deer) or landscape features such as fragmentation (48–51). These biotope features are known to influence nymph populations (52–54). First of all, a high abundance of deer is known to be responsible for higher nymph densities because these animals are tick reproduction hosts (55). Rodent populations are also qualitatively and quantitatively correlated with tick densities (50, 56). Differences in deer or rodent populations between sites may also explain the differences in nymph densities observed between our study sites.

At Dannemarie, the nymph abundance was low in 2003/2004, and was not found to increase between the two study periods. Environmental factors such as global warming, which can impact nymph densities, therefore did not suffice to impact the tick populations inhabiting this site during the decade under investigation (57).

The prevalence of *B. burgdorferi* sI in nymphs remained relatively stable between 2013 and 2014, and although it was higher in 2013 than in 2014, the difference was not statistically significant. The lowest *B. burgdorferi* sI infection rate in nymphs was observed at Dannemarie and the highest at Guebwiller during the present two-year study period. In addition, the prevalence of *A. phagocytophilum* in nymphs also remained stable during these two years.

Although the PCR assays were not the same between the study by Ferquel *et al.* (40) and the present study (nested PCR assay with gel electrophoresis detection in the study by Ferquel *et al.* versus real-time PCR and Taqman probe in the present one), it has been frequently reported in the literature, including a recent meta-analysis (58–62) that the real-time PCR assay with TaqMan chemistry is at least as sensitive as the end-point nested PCR assay with gel electrophoresis for *B. burgdorferi* sI detection, which made it possible to compare our results with those of Ferquel *et al.* In 2003/2004, the prevalence of nymphs at Dannemarie, Munster and Guebwiller was reported to be 11.8% (CI_{95%} = [7.6-18]), 20.1% (CI_{95%} = [18-22]) and 15.3% (CI_{95%} = [13-18]), respectively (40). There was also a difference in *Borrelia burgdorferi* sI prevalence between the study sites. During the four years included in these studies (2003, 2004, 2013, 2014), the prevalence of *B. burgdorferi* sI in nymphs reached a single peak in 2004. This 2013/2014 follow-up has been continued and a further increase was observed in the prevalence of *B. burgdorferi* sI in 2015 and 2016 (Fig. S1b). More specifically, the infection rate was higher in 2004 than in 2003, 2013 and 2014 at both Guebwiller and Munster. At Dannemarie, the infection rate was significantly higher in 2004 than in 2014.

In 2013/2014, *B. afzelii* and *B. garinii* / *B. bavariensis* were found to be the main pathogenic species present in ticks, as noted ten years previously: these two species

accounted for 51.4% and 36.1% respectively in 2003 and for 52.8% and 31.6% respectively in 2004, of all the *B. burgdorferi* sl species detected in infected nymphs. Among the *Borrelia* species, a higher prevalence of *B. burgdorferi* ss was observed in 2013/2014 than in 2003/2004. It is noteworthy that the prevalence of *B. burgdorferi* ss decreased from 18 to 9% from 2013 to 2014, although this difference was not statistically significant. A similar rate of *B. burgdorferi* ss prevalence (15% +/- 3) was reported in Central Europe (62). In the case of *B. valaisiana*, a lower prevalence was recorded in 2013/2014 than in 2003/2004 (Table S2). The prevalence of *B. spielmanii* and the rates of occurrence of co-infections were low, and no significant difference was observed between the 2003/2004 and 2013/2014 prevalences (Table S2).

All in all, the results of this study show that no significant changes had occurred in either the nymph densities or the prevalence of *B. burgdorferi* sl ten years after the first study. No increase in the acarological risk can therefore be said to have occurred ten years later at the three sites studied. However, in Alsace and in France in general, the incidence of Lyme borreliosis seems to be on the increase in humans. It was reported to be 9.4 cases per 100 000 habitants in 1999-2000 (38) and 43 cases per 100 000 habitants in 2009-2011 (39). Various factors may have contributed to the increase which has occurred during the last decade. First, it has been established that the incidence of Lyme borreliosis is highly sensitive to changes in the methods of surveillance adopted; the methods used by Letrillard et al. in 1999-2000 were no longer applied in 2009-2011, and the data were probably underestimated in the former study. In addition, data were not collected using systematic standardized methods of surveillance in 1999-2000. Since 2009, regular surveillance has been performed by a "Sentinelle" network based on periodic reports (mostly weekly reports) by physicians. Secondly, Lyme borreliosis is better known today by the

public and by general practitioners than it was in 1999. This has also contributed to the recent stabilization in the incidence of LB observed in the Netherlands after 15 years of increase (63). Lastly, the number of cases of LB hospitalized was stable during the period 2004-2009. This does not seem to be compatible with the occurrence of an increase in the incidence of the disease between 1999 and 2012. Since the French hospital discharge database is a highly reliable system, the possibility of a surveillance bias can be ruled out and the database can therefore be said to provide useful data for trend analyses (39). Lyme borreliosis is correlated with both the abundance of infected nymphs and certain occupations and hobbies such as jogging, fishing and hiking (64–67). It is possible that an increase in the incidence of Lyme borreliosis might be due to the occurrence of more frequent contacts between humans and ticks. It has been clearly established that forestry workers, farmers, soldiers, hunters and hikers run a higher risk of infection with Lyme borreliosis than other people in Europe (64, 68–71).

In 2013/2014, a lower prevalence of *B. valaisiana* than previously i.e., 2003-2004 (p -value < 5%) was observed, but *B. afzelii* and *B. garini* / *B. bavariensis* were the most frequently encountered infectious *Borrelia* species in ticks as previously, and after a ten-year interval, the overall pattern of *Borrelia* species distribution in ticks did not show any significant change (62). Any environmental changes which may have occurred, such as changes in small mammalian or bird populations, can therefore be said to have had no significant impact on *Borrelia* species distribution during the ten-year period under investigation.

In 2004, the prevalence of *A. phagocytophilum* in tick nymphs was 0.4% ($CI_{95\%}=[0.15-1.0]$) (40). No increase in this parameter was again observed ten years later. Methods of diagnosing Lyme borreliosis in humans have improved during the

last few years (18). We can therefore expect to observe an increase in the number of cases of human anaplasmosis reported. In conclusion, although some changes were observed between some sites and years in the distribution of the pathogens responsible for these two tick-borne pathogens after a period of ten years, they did not amount to an increase in the acarological risk. The current increase in the number of human cases of Lyme borreliosis reported in Alsace is therefore probably due to the increasing awareness of tick borne diseases on the part of both the public and the medical profession as well as a possible increase to tick bites (34). However, prospective entomological surveillance will be necessary in order to monitor the situation and determine the most efficient preventive measures against tick bites.

References

1. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. 2012. Lyme borreliosis. *Lancet* 379:461–473.[https://doi.org/ 10.1016/S0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60103-7)
2. Burgdorfer W. 1984. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* 57:515–520.
3. Wilhelmsson P, Lindblom P, Fryland L, Nyman D, Jaenson TGT, Forsberg P, Lindgren P-E. 2013. *Ixodes ricinus* ticks removed from humans in Northern Europe: seasonal pattern of infestation, attachment sites and duration of feeding. *Parasit Vectors* 6:362–373.[https://doi.org/ 10.1186/1756-3305-6-362](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-362)
4. Ivanova LB, Tomova A, González-Acuña D, Murúa R, Moreno CX, Hernández C, Cabello J, Cabello C, Daniels TJ, Godfrey HP, Cabello FC. 2014. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ Microbiol* 16:1069–1080.[https://doi.org/ 10.1111/1462-2920.12310](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12310)
5. Margos G, Fedorova N, Kleinjan J, Hartberger C, Schwan TG, Sing A, Fingerle V. 2017. *Borrelia lanei* sp. nov. extends the diversity of *Borrelia* species in California. *Int J Syst Evol Microbiol*.[https://doi.org/ 10.1099/ijsem.0.002214](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002214)
6. Hanincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K. 2003. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 126:11–20.[https://doi.org/ 10.1128/AEM.69.5.2825–2830.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2825-2830.2003)
7. Taragel'ová V, Koci J, Hanincová K, Kurtenbach K, Derdáková M, Ogden NH, Literák I, Kocianová E, Labuda M. 2008. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 74:1289–1293.[https://doi.org/ 10.1128/AEM.01060-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01060-07)
8. Stanek G, Reiter M. 2011. The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect* 17:487–93.[https://doi.org/ 10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x)
9. Assous M V, Postic D, Paul G, Névot P, Baranton G. 1993. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:261–268.
10. Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12:633–653.
11. Jaulhac B, Heller R, Limbach FX, Hansmann Y, Lipsker D, Monteil H, Sibilia J, Piémont Y. 2000. Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis. *J Clin Microbiol* 38:1895–1900.
12. Lenormand C, Jaulhac B, Debarbieux S, Dupin N, Granel-Brocard F, Adamski H, Barthel C, Cribier B, Lipsker D. 2016. Expanding the clinicopathological spectrum of late cutaneous Lyme borreliosis (acrodermatitis chronica atrophicans: A prospective study of 20 culture- and/or polymerase chain reaction (PCR)-documented cases. *J Am Acad Dermatol* 14:685–692.[https://doi.org/ 10.1016/j.jaad.2015.10.046](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.10.046).

13. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. Ticks Tick Borne Dis 2:123–8. [https://doi.org/ 10.1016/j.ttbdis.2011.04.002](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.04.002)
14. Rijpkema SGT, Tazelaar DJ, Molkenboer MJCH, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JFP. 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin Microbiol Infect 3:109–116.
15. Strle F, Picken RN, Cheng Y, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Ruzic-Sabljic E, Picken MM. 1997. Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. Clin Infect Dis 25:273–80.
16. Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Gonçalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. J Clin Microbiol 42:1316–8. [https://doi.org/ 10.1128/JCM.42.3.1316-1318.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1316-1318.2004)
17. Rikihisa Y. 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin Microbiol Rev 24:469–489. [https://doi.org/ 10.1128/CMR.00064-10](https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10)
18. Koebel C, Kern A, Edouard S, Hoang AT, Celestin N, Hansmann Y, Jaulhac B, Brouqui P, Josiane DMS. 2012. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. Diagn Microbiol Infect Dis 72:214–218. [https://doi.org/ 10.1016/j.ttbdis.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.002)
19. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 32:589–595.
20. Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS. 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. J Clin Microbiol 35:1556–1559.
21. George J. 1999. Comment un syndrome estival peut révéler un premier cas d'ehrlichiose granulocytaire en France. Rev Prat Med Gen 1715–1717.
22. Cahill B, Lubelczyk C, Smith R, Gensheimer K, Robbins A, Robinson S, Eremeeva ME, McQuiston JH, DVM, Pelletier A, Adjeman JT. 2009. Anaplasmosis and ehrlichiosis - Maine, 2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 58:1033–1036.
23. Gray JS. 1998. Review The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. Exp Appl Acarol 22:249–258.
24. Heinz F, Stiasny K, Holzmann H, Kundi M, Sixl W, Wenk M, Kainz W, Essl A, Kunz C. 2015. Emergence of tick-borne encephalitis in new endemic areas in Austria: 42 years of surveillance. Eurosurveillance 20:21077–21085. [https://doi.org/ 10.2807/1560-7917.ES2015.20.13.21077](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.13.21077)
25. Estrada-Peña A, Ruiz-Fons F, Acevedo P, Gortazar C, de la Fuente J. 2013. Factors driving the circulation and possible expansion of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the western Palearctic. J Appl Microbiol 114:278–86. [https://doi.org/ 10.1186/1756-3305-6-1](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-1)
26. Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. 2012. Of ticks, mice and men:

- understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 10:87–99.[https://doi.org/ 10.1038/nrmicro2714](https://doi.org/10.1038/nrmicro2714)
27. Benach JL, Coleman JL, Skinner RA, Rosler EM. 1987. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* 155:1300–1306.
 28. Gern L, Zhu Z, Aeschlimann A. 1990. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Ann Parasitol Hum Comparée* 65:89–93.
 29. Spielman A, Ribeiro JMC, Mather TN, Piesman J. 1987. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 24:201–205.
 30. Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Richter D, Spielman A. 1992. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* 165:479–483.
 31. Kurtenbach K, Hanincová K, Tsao JI, Margos G, Fish D, Ogden NH. 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat Rev Microbiol* 4:660–669.[https://doi.org/ 10.1038/nrmicro1475](https://doi.org/10.1038/nrmicro1475)
 32. Mejlou HA, Jaenson TGT. 1997. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 21:747–754.
 33. Bacon R, Kugeler K, Mead P. 2008. Surveillance for Lyme disease United States: 1992-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57:1-19
 34. Mead PS. 2015. Epidemiology of Lyme Disease. *Infect Dis Clin North Am* 29:187–210.
 35. Smith R, Takkinen J, Editorial EC for DP and C (ECDC)-HCU-E. 2006. Lyme borreliosis: Europe-wide coordinated surveillance and action needed? *Euro Surveill* 11:2977–2978. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2977>
 36. Fülöp B, Poggensee G. 2008. Epidemiological situation of Lyme borreliosis in Germany: surveillance data from six Eastern German States, 2002 to 2006. *Parasitol Res* 103 Suppl:117–120.[https://doi.org/ 10.1007/s00436-008-1060-y](https://doi.org/10.1007/s00436-008-1060-y)
 37. Hofhuis A, van der Giessen J, Borgsteede F, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - Health Communication Unit - Eurosurveillance editorial. 2006. Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveill* 11:2978–2979. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2978>
 38. Letrilliart L, Ragon B, Hanslik T, Flahault A. 2005. Lyme disease in France: a primary care-based prospective study. *Epidemiol Infect* 133:935–942.[https://doi.org/ 10.1017/S0950268805004413](https://doi.org/10.1017/S0950268805004413)
 39. Vandenesch A, Turbelin C, Couturier E, Arena C, Jaulhac B, Ferquel E, Choumet V, Saugeon C, Coffinieres E, Blanchon T, Vaillant V, Hanslik T. 2014. Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. *Eurosurveillance* 19:20883–20891. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20883>
 40. Ferquel E, Garnier M, Marie J, Bernède-Bauduin C, Baranton G, Pérez-Eid C, Postic D. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and

- Anaplasmataceae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl Environ Microbiol* 72:3074–3082.[https://doi.org/ 10.1128/AEM.72.4.3074-3078.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.3074-3078.2006)
41. Guy EC, Stanek G. 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 44:610–611.
 42. Rijpkema S, Golubić D, Molkenboer M, Verbeek-De Kruif N, Schellekens J. 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol* 20:23–30.
 43. Hidri N, Barraud O, de Martino S, Garnier F, Paraf F, Martin C, Sekkal S, Laskar M, Jaulhac B, Ploy M-C. 2012. Lyme endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 18:531–532.[https://doi.org/ 10.1111/1469-0691.12016](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12016)
 44. Institut National de Veille Sanitaire. 2003. Rapport Lyme: Données du réseau de surveillance de la maladie de Lyme. Mars 2001-Février 2003.
 45. Estrada-Peña A. 2001. Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Spain. *J Med Entomol* 38:361–370.
 46. Lindström A, Jaenson TGT. 2003. Distribution of the common tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in different vegetation types in southern Sweden. *J Med Entomol* 40:375–378.
 47. Tack W, Madder M, Baeten L, De Frenne P, Verheyen K. 2012. The abundance of *Ixodes ricinus* ticks depends on tree species composition and shrub cover. *Parasitology* 139:1273–1281.[https://doi.org/ 10.1017/S0031182012000625](https://doi.org/10.1017/S0031182012000625)
 48. Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubalek Z, Foldvari G, Plantard O, Vayssier-Taussat M, Bonnet S, Spiltalska E, Kazimirova M. 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Heal* 2:251–275.[https://doi.org/ 10.3389/fpubh.2014.00251](https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251)
 49. Pfäffle M, Littwin N, Muders S V, Petney TN. 2013. The ecology of tick-borne diseases. *Int J Parasitol* 43:1059–1077.[https://doi.org/ 10.1016/j.ijpara.2013.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.009)
 50. Mihalca AD, Sándor AD. 2013. The role of rodents in the ecology of *Ixodes ricinus* and associated pathogens in Central and Eastern Europe. *Front Cell Infect Microbiol* 3:56.[https://doi.org/ 10.3389/fcimb.2013.00056](https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00056)
 51. Kilpatrick HJ, LaBonte AM, Stafford KC. 2014. The relationship between deer density, tick abundance, and human cases of Lyme disease in a residential community. *J Med Entomol* 51:777–84.<https://doi.org/10.1603/ME13232>
 52. De Keukeleire M, Vanwambeke SO, Somassè E, Kabamba B, Luyasu V, Robert A. 2015. Scouts, forests, and ticks: Impact of landscapes on human-tick contacts. *Ticks Tick Borne Dis* 6:633–644.[https://doi.org/ 10.1016/j.ttbdis.2015.05.008](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.05.008)
 53. Brownstein JS, Skelly DK, Holford TR, Fish D. 2005. Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. *Oecologia* 146:469–475.[https://doi.org/ 10.1007/s00442-005-0251-9](https://doi.org/10.1007/s00442-005-0251-9)
 54. Barandika JF, Berriatua E, Barral M, Juste R a, Anda P, García-Pérez a L.

2006. Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. *Med Vet Entomol* 20:177–188.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00619.x>
55. Millins C, Gilbert L, Medlock J, Hansford K, Thompson DB, Biek R. 2017. Effects of conservation management of landscapes and vertebrate communities on Lyme borreliosis risk in the United Kingdom. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0123>
 56. Siński E, Pawełczyk A, Bajer A, Behnke J. 2006. Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. *Ann Agric Environ Med* 13:295–300.
 57. Sykes RA. 2014. An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *Res Medica* 22:76–87.<https://doi.org/10.2218/resmedica.v22i1.743>
 58. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. 2004. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 42:3164–3168.<https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3164-3168.2004>
 59. Ivacic L, Reed KD, Mitchell PD, Ghebranious N. 2007. A LightCycler TaqMan assay for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:137–143.<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.08.005>
 60. Zeidner NS, Schneider BS, Dolan MC, Piesman J. 2001. An Analysis of Spirochete Load, Strain, and Pathology in a Model of Tick-Transmitted Lyme Borreliosis. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 1:35–44.<https://doi.org/10.1089/153036601750137642>
 61. Wang G, Liveris D, Brei B, Wu H, Falco RC, Fish D, Schwartz I. 2003. Real-time PCR for simultaneous detection and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the Northeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 69:4561–5.<https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4561-4565.2003>
 62. Strnad M, Hönig V, Růžek D, Grubhoffer L, Rego ROM. 2017. Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol* AEM.00609-17.<https://doi.org/10.1128/AEM.00609-17>
 63. Hofhuis A, Bennema S, Harms M, van Vliet AJH, Takken W, Van Den Wijngaard CC, Van Pelt W. 2016. Decrease in tick bite consultations and stabilization of early Lyme borreliosis in the Netherlands in 2014 after 15 years of continuous increase. *BMC Public Health* 16:425–451.<https://doi.org/10.1186/s12889-16-3105-y>
 64. Kaya AD, Parlak AH, Ozturk CE, Behcet M. 2008. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers and farmers in Duzce, north-western Turkey. *New Microbiol* 31:203–209.
 65. Smith PF, Benach JL, White DJ, Stroup DF, Morse DL. 1988. Occupational risk of Lyme disease in endemic areas of New York State. *Ann N Y Acad Sci* 539:289–301.
 66. Vorou RM, Papavassiliou VG, Tsiodras S. 2007. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. *Epidemiol Infect*

135:1231–1247.<https://doi.org/10.1017/S0950268807008527>

67. Rigaud E, Jaulhac B, Garcia-Bonnet N, Hunfeld K-P, Féménia F, Huet D, Goulvestre C, Vaillant V, Deffontaines G, Abadia-Benoist G,. 2016. Seroprevalence of seven pathogens transmitted by the *Ixodes ricinus* tick in forestry workers in France. *Clin Microbiol Infect* 0:33–50.<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.014>.
68. Buczek A, Rudek A, Bartosik K, Szymanska J, Wojcik-Fatla A. 2009. Seroepidemiological study of Lyme borreliosis among forestry workers in southern Poland. *Ann Agric Environ Med* 16:257–261.
69. Bilski B. 2009. Occurrence of cases of borreliosis certified as an occupational disease in the province of Wielkopolska (Poland). *Ann Agric Environ Med* 16:211–217.
70. Cinco M, Barbone F, Grazia Ciufolini M, Mascioli M, Anguero Rosenfeld M, Stefanel P, Luzzati R. 2004. Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. *Clin Microbiol Infect* 10:1056–1061.<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01026.x>
71. Hubálek Z. 2009. Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37:31–50.
72. Bleyenheuft C, Lernout T, Berger N, Rebolledo J, Leroy M, Robert A, Quoilin S. 2015. Epidemiological situation of Lyme borreliosis in Belgium, 2003 to 2012. *Arch Public Health* 73:33. <https://doi.org/10.1186/s13690-015-0079-7>

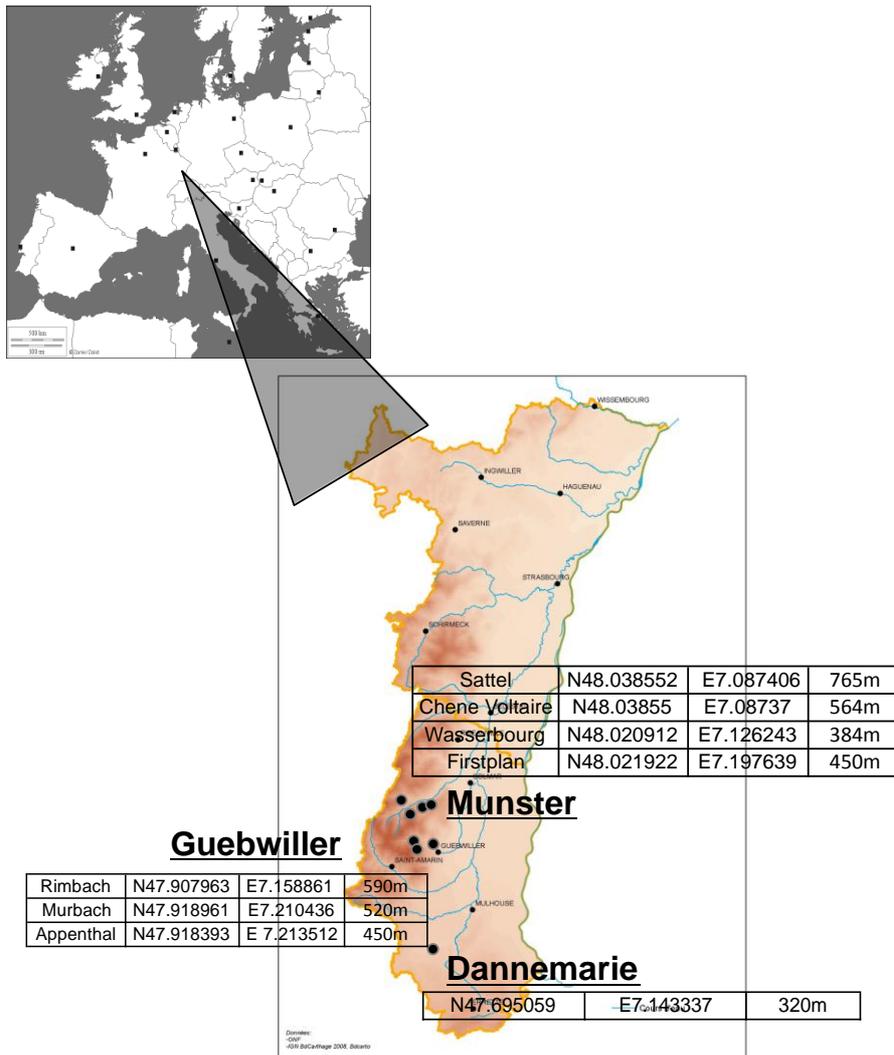
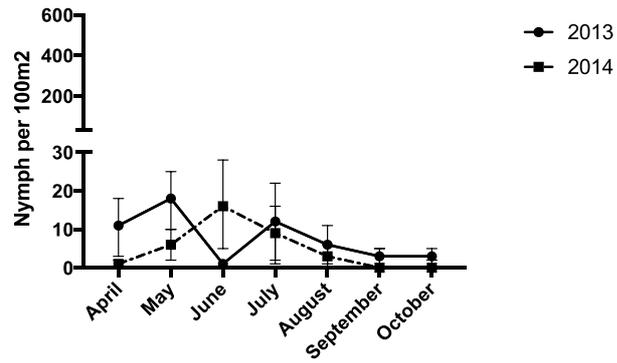


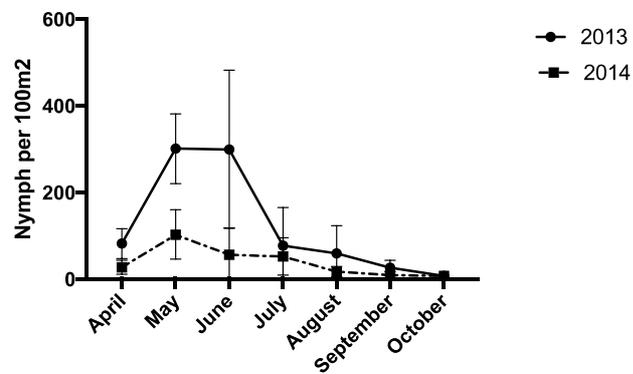
FIG 1. Map of the Alsace region showing the tick nymph collection sites with their GPS locations and altitudes. The insert shows the situation of Alsace (Eastern France) in Europe.

(A)



Guebwiller

(B)



Munster

(C)

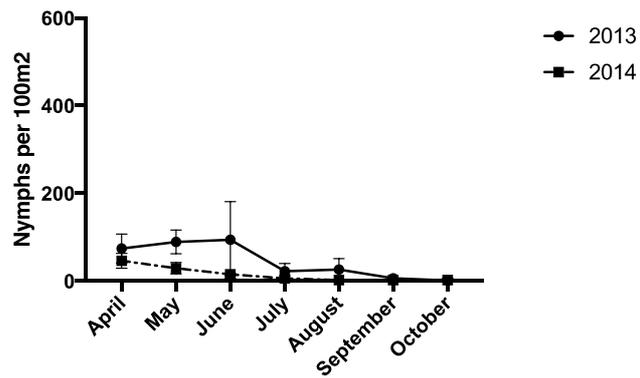


FIG 2. Nymph densities (nymphs per 100 m²) per month in 2013 and 2014 at various study sites: (A) Dannemarjie, (B) Guebwiller, (C) Munster.

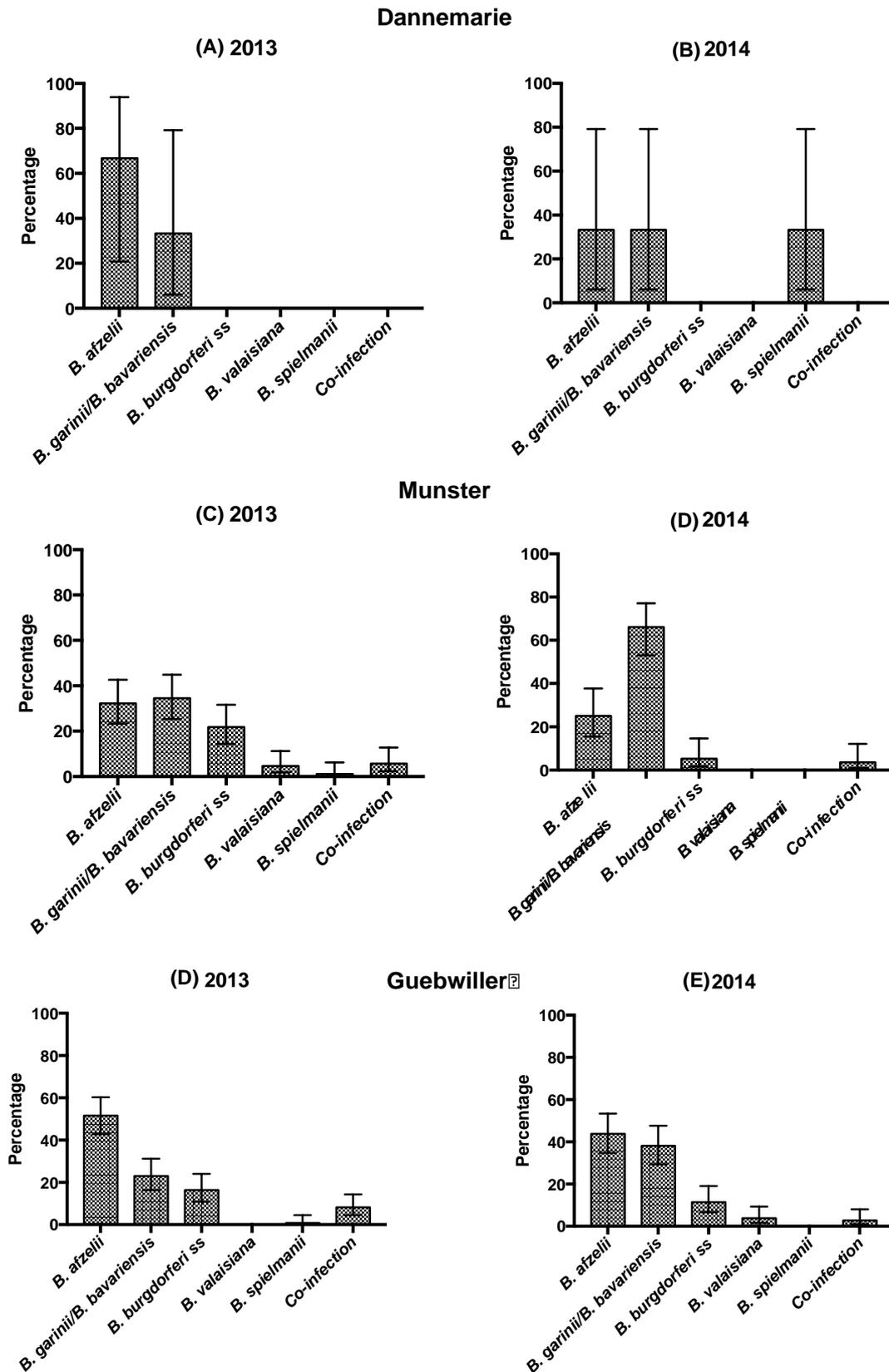


FIG 3. *Borrelia* species distribution in nymphs at the various collection sites in 2013 and 2014: (A) Dannemarie in 2013, (B) Dannemarie in 2014, (C) Munster in 2013, (D) Munster in 2014, (E) Guebwiller in 2013, (F) Guebwiller in 2014. Upper and lower limits of the 95 percent confidence intervals are specified

<i>Borrelia burgdorferi</i> sl mean nymph infection rate (%) and 95 percent confidence interval						
Month	Site					
	Dannemarie		Guebwiller		Munster	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014
April	7.1 [1.3-31.4]	0 [0-30.0]	11.4 [7.6-16.8]	11.6 [7.3-18.0]	5.3 [2.9-9.4]	NA
May	7.4 [2.0-23.3]	3.4 [0.6-17.1]	5.8 [3.2-10.1]	4.9 [2.8-8.6]	10.4 [7.2-14.7]	3.8 [2.1-6.9]
June	0 [0-79.3]	2.4 [0.4-12.3]	10 [6.5-15.0]	9.2 [5.8-14.5]	6.9 [4.2-11.1]	7.6 [4.7-12]
July	0 [0-23]	0 [0-11.7]	14.6 [10.0-20.9]	7.7 [4.9-11.9]	5.9 [3.0-11]	4.5 [2.4-8.0]
August	0 [0-30]	0 [0-27.8]	14.4 [9.9-20.3]	9.6 [5.7-15.7]	14.5 [9.5-21.5]	6.7 [3.7-11.9]
September	0 [0-49.0]	0 [0-32.4]	11.7 [7.2-18.4]	18.3 [11.4-28]	17.8 [9.3-31.3]	13.6 [4.7-33.3]
October	NA	NA	20.6 [10.3-36.8]	4.4 [1.2-14.8]	0 [0-56]	5.9 [1.0-27]
Average percentage of infection in nymph and 95 percent confidence interval	4.4 [1.5-12.2]	2.2 [0.8-6.4]	11.5 [9.7-13.5]	9.3 [7.7-11.1]	8.9 [7.2-10.8]	5.6 [4.3-7.4]
2013	10.0 [8.8-11.4]					
2014	7.5 [6.5-8.7]					
2013+2014	3.0%		10.3 %		7.4 %	
Mean density of nymph (2013/2014)	7		82		32	
Mean density of infected nymph (2013/2014)	1		8		2	

NA: not available

NC: not collected

TABLE 1. *Borrelia burgdorferi* sl infection rates in 2013 and 2014 and 95 percent confidence intervals

NA*: not applicable; no ticks were collected that month. NC: not collected; the site was not visited that month. Values differing significantly between years (p-value < 5%) are presented in bold print.

<i>Borrelia burgdorferi</i> sI species nymph infection rate (% and CI 95%)		
<i>Borrelia burgdorferi</i> sI species	2013	2014
<i>B. afzelii</i>	44% [37-51]	37% [30-45]
<i>B. garinii/B. bavariensis</i>	28% [19-30]	48% [40-55]
<i>B. burgdorferi</i> ss	18% [14-24]	9% [6-15]
<i>B. valaisiana</i>	2% [1-4]	2% [1-6]
<i>B. spielmanii</i>	1% [0-3]	1% [0-3]
co-infection of <i>Borrelia burgdorferi</i> sI species	7% [4-11]	3% [1-7]

TABLE 2. *Borrelia* species distribution in nymphs depending on the year of collection and 95 percent confidence intervals. Co-infections involve two or more *Borrelia burgdorferi* sI species

<i>Anaplasma phagocytophilum</i> nymph infection rate			
	Dannemarie	Munster	Guebwiller
2013	3	0	1.3
CI 95%	[0.8-10]	[0-0.6]	[0.6-2.7]
2014	3	1.1	0.6
CI 95%	[1.1-7.4]	[0.6-2.0]	[0.3-1.3]

TABLE 3. *Anaplasma phagocytophilum* infection rates and 95 percent confidence intervals in 2013 and 2014

Nymph densities										
Month	Site	2003*	IC*	2004*	IC*	2013	IC	2014	IC	Source*
April	Dannemarie	NC	NC	40	[29-51]	11	[3-18]	1	[0-2]	Ferquel et al. AEM 2006
	Guebwiller	NC	NC	308	[156-459]	82	[47-116]	27	[11-43]	
	Munster	51	[34-69]	246	[38-455]	74	[41-107]	46	[29-63]	
May	Dannemarie	NC	NC	41	[24-58]	18	[10-25]	6	[2-10]	
	Guebwiller	248	[54-442]	488	[303-673]	301	[220-381]	102	[46-160]	
	Munster	103	[78-129]	398	[26-771]	89	[62-116]	29	[16-42]	
June	Dannemarie	NC	NC	35	[19-51]	1	[0-4]	16	[5-28]	
	Guebwiller	308	[53-563]	238	[101-375]	299	[117-482]	56	[0-118]	
	Munster	110	[56-164]	177	[0-384]	94	[7-181]	15	[12-18]	
July	Dannemarie	29	[28-31]	34	[21-47]	12	[2-22]	9	[1-16]	
	Guebwiller	203	[97-308]	255	[63-447]	77	[0-165]	52	[9-95]	
	Munster	117	[84-150]	215	[0-471]	22	[4-40]	6	[1-12]	
August	Dannemarie	NC	NC	NC	NC	6	[1-11]	3	[0-6]	
	Guebwiller	NC	NC	NC	NC	59	[0-123]	17	[5-29]	
	Munster	NC	NC	NC	NC	26	[1-51]	2	[1-3]	
September	Dannemarie	6	[5-8]	21	[12-31]	3	[0-5]	0	[0-5]	
	Guebwiller	39	[20-58]	59	[10-107]	26	[9-43]	9	[1-17]	
	Munster	31	[4-58]	34	[3-65]	6	[3-10]	2	[1-3]	
October	Dannemarie	NC	NC	NC	NC	3	[0-5]	0	[0-2]	
	Guebwiller	53	[9-97]	16	[0-31]	7	[3-11]	7	[4-10]	
	Munster	30	[24-35]	14	[0-28]	1	[0-2]	2	[0-6]	

NC : not collected ; * Data from the Ferquel et al. study in 2003/2004 (38)

TABLE S1. Nymph densities at the Dannemarie, Munster and Guebwiller study sites in 2003, 2004, 2013 and 2014 from April to October. NC: not collected; * Data obtained in the 2003/2004 study; in bold, densities recorded in 2003 and 2004 which differed significantly from those obtained in 2013 and 2014.

<i>Borrelia burgdorferi</i> sl species nymph infection rate (% and CI 95%)			Source
<i>Borrelia burgdorferi</i> sl species	2003	2004	Ferquel et al. AEM 2006
<i>B. afzelii</i>	51.4 [44.0-58.8]	52.8 [46.4-59.0]	
<i>B. garinii/B. bavariensis</i>	31.6 [25.1-38.9]	24.2 [19.2-30.1]	
<i>B. burgdorferi</i> ss	4.1 [2.0-8.2]	3.4 [1.7-6.6]	
<i>B. valaisiana</i>	11.7 [7.7-17.4]	14.5 [10.5-19.5]	
<i>B. spielmanii</i>	0	0.4 [0.08-2.4]	
<i>B. lusitaniae</i>	0	0	
co-infection of <i>Borrelia burgdorferi</i> sl species	1.2 [0.3-4.1]	4.7 [2.6-8.1]	

TABLE S2. *Borrelia burgdorferi* sl infection rates in the in 2003/-2004 study by Ferquel et al. (40).

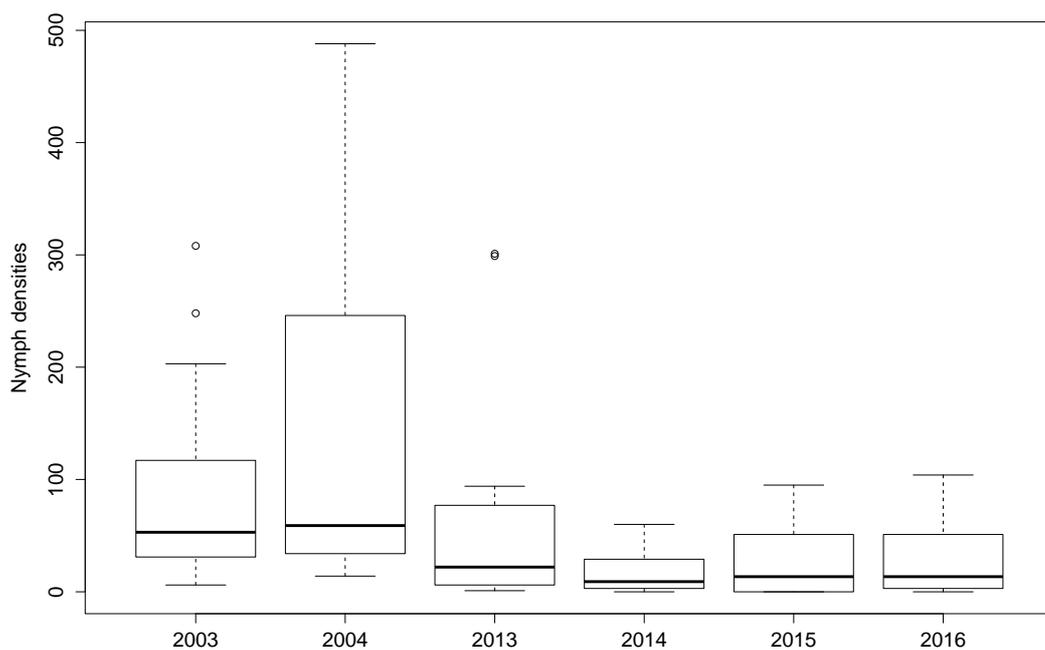


FIG S1a. Boxplot of nymph densities observed in Alsace in 2003, 2004, 2013, 2014, 2015 and 2016.

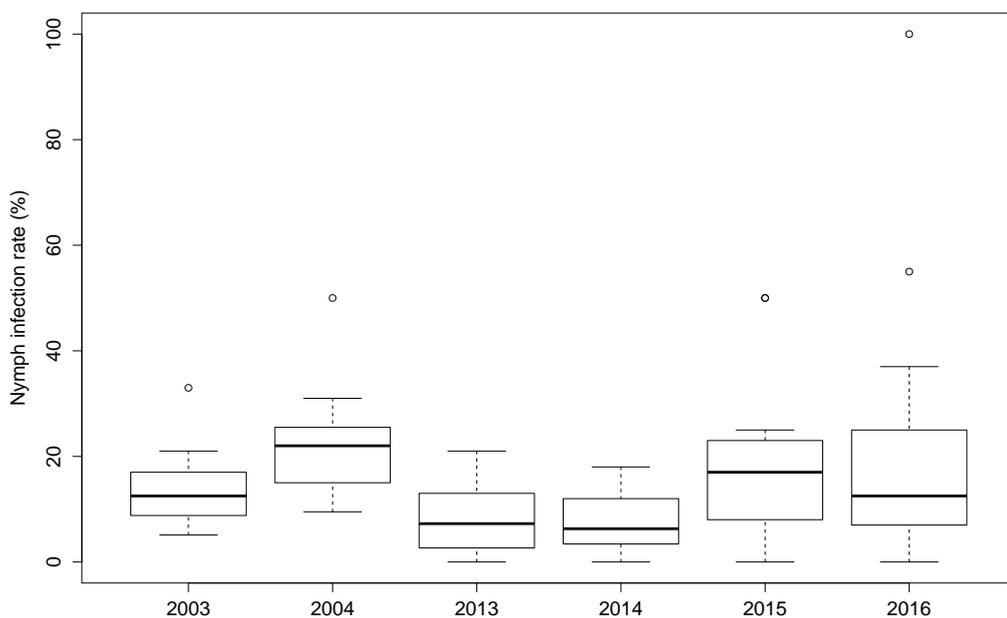


FIG S1b. Boxplot of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection rate in Alsace in 2003, 2004, 2013, 2014, 2015 and 2016.

Etude sur les facteurs biotiques et abiotiques en zone d'endémie*

I) Contexte, présentation du projet et objectif

La prévention primaire de la maladie de Lyme peut reposer sur plusieurs concepts. Parmi eux, nous pouvons citer : la lutte contre le vecteur par épandage d'acaricide ou la détermination de zones à risque c'est à dire des zones à éviter du fait d'une forte présence de tiques infectées. Considérer une zone à risque sur la base de mesures de terrain effectives est une approche efficace mais longue à mettre en œuvre. Une prédiction de la densité en nymphes et/ou en nymphes infectées est alors une bonne stratégie pour déterminer des zones à risque à partir d'un échantillonnage et ainsi élargir la prédiction à des zones non obligatoirement investiguées.

C'est dans ce contexte que nous avons entamé le travail ci-dessous qui tend à investiguer les caractéristiques de l'environnement associées à la densité en tiques.

II) Résultats et article

Article n°2 (soumis à Ticks and Tick-borne diseases)

Factors responsible for *Ixodes ricinus* nymphal density: are soil features indicators of tick nymphal densities in a french region where lyme borreliosis is endemic?

Running title: Soil features as indicators of nymphal tick abundance.

Valérie Goldstein^a, Nathalie Boulanger^{a,b,*}, Dominique Schwartz^c, Jean-Claude George^b, Damien Ertlen^c, Laurence Zilliox^b, Mickaël Schaeffer^d, Benoît Jaulhac^{a,b}

^a EA 7290: Virulence bactérienne précoce: groupe Borréliose de Lyme, Facultés de pharmacie et de médecine, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé 67097, Strasbourg, France

^b Centre National de Référence des Borrelia, Centre hospitalier universitaire, Strasbourg, 3 rue Koeberlé 67097, Strasbourg, France

^c UMR 7362, Laboratoire Image, Ville et Environnement, Faculté de géographie, Université de Strasbourg, 3 rue de l'Argonne 67000, Strasbourg, France

^d Département d'Information Médicale, Centre hospitalier universitaire, 1 place de l'Hôpital 67000 Strasbourg, France

* Corresponding author : E-mail address: nboulanger@unistra.fr

ABSTRACT

In Europe, the main vector of Lyme borreliosis, an infectious disease caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato, is the hard tick *Ixodes ricinus*. A field study was conducted to evaluate the density of *Ixodes* nymphs in the French region of Alsace, where Lyme borreliosis is endemic, and to determine whether environmental factors such as soil moisture and composition may be associated with nymph density. In the ten sites studied, ticks were collected by drag sampling from March to October in 2013 and 2014. Temperature, relative humidity, saturation deficit, soil pH, humus composition and type of vegetation were recorded at each site. The abundance of *I. ricinus* was highly variable from one site to another. Inter-annual variations were also observed, since the nymph densities were higher in 2013 than in 2014. This study shows that humus type can be indicative of nymph abundance. Three types of humus were observed: (1) moder, (2) mull, and (3) mull-moder humus. One of them, moder humus, which is characterized by a thick layer of fragmented leaves, was found in multivariate analyses to be strongly associated with the nymph densities. This study demonstrates that factors such as saturation deficit do not suffice to explain the differences in nymph abundance among sites. The composition of the soil and especially the type of humus should also be taken into consideration when assessing acarological risks.

Keywords: *Ixodes* spp., ticks, soil, Lyme borreliosis, nymph density, Alsace, humus

1. Introduction

The hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is the main vector in Europe of Lyme borreliosis spirochetes, which are responsible for the most frequent vector-borne disease occurring in the Northern Hemisphere (Stanek et al., 2012). For public health reasons, Lyme borreliosis has recently attracted considerable attention (Gray et al., 2009; Rizzoli et al., 2014). The disease is transmitted by spirochetes belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group. In France, Lyme borreliosis is endemic to the Alsace region (Letrilliart et al., 2005; Vandenesch et al., 2014) and some of the cantons (French administrative divisions) in this region are known to have both a high incidence of Lyme borreliosis and high nymph densities (Ferquel et al., 2006).

I. ricinus ticks spend a large part of their lives off their hosts (Humair and Gern, 2000; Kurtenbach et al., 2006). Humans are only incidental tick hosts, since ticks feed only on humans who are visiting their habitat. Transmission of *B. burgdorferi* s. l. occurs via the inoculation of tick saliva containing *Borrelia* into the hosts on which they are feeding (Stanek et al., 2012). The risk of tick-borne infection in humans depends on the conjunction of several parameters, including the tick abundance and the prevalence of tick infection. These parameters are indicators to the level of human exposure to questing ticks, which has been called the acarological risk (Estrada-Peña et al., 2012; Mannelli et al., 2003; Medlock et al., 2013). Field studies have been conducted in both the USA and Europe to elucidate the occurrence of this disease in human populations. The nymph, which is the main tick stage involved in *Borrelia* transmission to humans, is responsible for 90% of all cases of Lyme disease (Falco et al., 1999). Most field studies have therefore focused on the nymphs' ecological niches (Dobson and Randolph, 2011; Estrada-Peña, 2001). In several field studies, the factors affecting the *I. ricinus* phenology have been assessed in order to predict the abundance of questing nymphs (Estrada-Peña, 2003; Estrada-Peña, 2001; Jore et al., 2014;

Randolph et al., 2002). Biotic factors such as tree species, landscape fragmentation, the composition of the vegetation and the ungulate densities also contribute importantly to the establishment of *I. ricinus* populations and their size (Brownstein et al., 2005; Li et al., 2012; Pfäffle et al., 2013; Tack et al., 2012). Abiotic factors such as temperature, relative humidity and saturation deficit have long been known to be associated with the survival and behavior of *I. ricinus* (Perret et al., 2000; Randolph and Storey, 1999; Schulz et al., 2014; Tagliapietra et al., 2011). As a humid environment is essential to tick survival, some soil features such as the presence of leaf litter in particular play a key role in tick abundance patterns (MacLeod, 1935; Milne, 1946; Tomkins et al., 2014). Other soil features such as particle size distribution and soil structure have been less frequently investigated in terms of their impact on *I. ricinus* ticks (Gilot et al., 1975; Glass et al., 1994; Guerra et al., 2002; Vourc'h et al., 2016). The porosity of the soil structure is known to have a major impact on water retention processes (Medlock et al., 2008). In this study, we explored certain soil features such as the humus status with its potential microbial activity (biotic factors) and particle size (abiotic factors) on the *I. ricinus* nymph densities.

2. Methods

2.1. Sites

The present study sites were located in both rural and suburban areas in Northern, Southern, Eastern and Western Alsace at various altitudes (Fig.1). Since eight of these sites were previously studied in 2003-2004 by Ferquel et al., comparisons were made between the nymph densities recorded after a ten-year interval (Ferquel et al., 2006). The two sites in suburban areas were selected in order to measure the nymph densities in areas with a high human population density. In 2013 and 2014, all ten sites were visited every month. Altitude, longitude and latitude were recorded with a GPS apparatus (GPS Garmin 62 ®) (Fig.1).

2.2. Type of forest

The forests visited in this study were located at both mountainous and lowland altitudes. Lowland sites were defined as those located at altitudes of less than 300 m above sea level (a.s.l.), and mountain sites, as those located at altitudes of more than 380 m a.s.l. (Table 1). The type of forest was classified according to the ONF (Office National des Forêts, the French Forestry Department) system of classification. Based on this system, which makes it possible to classify forests consistently, the exact locations of the sites, the type of situation (mountainous or hilly), the landscape, the geology, the altitude and the sun exposure were recorded. The main type of vegetation composing each of the forests visited was then determined with the ONF guide book (Table 1). The majority of the sites were *Asperulo-Fagetum* beech forests with a neutral or near-neutral pH soil and wild humus. In forests of this kind, the plants form a richer and more abundant herb layer than in the *Luzulo-Fagetum* forests. The *Asperulo-Fagetum* beech forests which abound in mid-European and Atlantic parts of western Central and northern Central Europe are characterized by *Fagus sylvatica* and at higher altitudes, by *Fagus sylvatica-Abies alba* and *Fagus sylvatica-Abies alba-Picea abies* (European Commission DG Environment, 2007). In *Asperulo-Fagetum* forests, *Fagus sylvatica* predominate, followed by *Abies alba* and *Picea abies* (Danylyk and Kuziariin, n.d.). In the case of *Luzulo-Fagetum* forests, *Fagus sylvatica* is also the predominant species, along with *Quercus petraea* at collinear level and *Abies alba* and/or *Picea abies* in mountainous areas (European Commission DG Environment, 2007). Only the Illkirch and Rimbach sites did not show this pattern of vegetation: the former (Illkirch) is an ash/oak forest and the latter is an oak/fir forest (Rimbach).

2.3. Soil features

In humus soil, the leaf litter occurs in layers called horizons (Fig.2). The first layer, Horizon O, is composed of whole and/or fragmented leaves. The second one, Horizon A, corresponds to the first organo-mineral layer of soil. At each study site, the humus type (Horizon O), the acidity, the percentage rate of coarse elements and the particle size distribution of the Horizon A were characterized using the systems of classification described by Baize and Jabiol (2011) or Jabiol et al. (2007). The humus observed in the present study region can be classified in three groups: mull humus, mull-moder humus and moder humus (Table 1). Mull humus is characterized by a layer of whole leaves (OL) lying directly above horizon A, the first organo-mineral layer occurring under the humus. Mull humus can be found above soils with high levels of biological activity. The moder humus, which consists of a thick layer of fragmented leaves (OF) separating the OL from horizon A (Fig. 2), corresponds to a soil with a medium level of biological activity. If the biological activity is intense, no layer of fragmented leaves is present above the organo-mineral layer because the annual leaves are quickly degraded.

To determine the pH of horizon A, a twenty-grams dried horizon A soil sample collected at each site was diluted in 50 ml distilled water (Baize, 2006), and the pH was then measured (pH meter WTW pH 7110 inolab N°14391389 2015). The percentage of coarse elements present in Horizon A was also calculated. Horizon A samples were sieved through a screen. The weight of samples with a particle size of more than 2 mm (coarse elements) and that of samples with a particle size of less than 2 mm (fine soil) was recorded. The percentage of coarse elements detected at each site was calculated by dividing the weight of the coarse elements divided by the weight of the fine soil, multiplied by 100. The size of the soil particles collected in each Horizon A sample, which was also called the texture, was determined with a granulometer (a Laser diffraction Beckmann Coulter LS 13320® particle

size analyzer). Three classes were defined in terms of the particle diameter: silt, clay and sand. The soil texture depended on combinations of silt, clay and sand.

2.4. Climate covariates

At each visit, the following data were recorded: the date, the ground temperature (T) and the relative humidity of the ground (RH) measured with a LCD Digital Hygro-Thermometer® (Moineau Instruments). Saturation deficit (SD) was calculated using the following formula: $SD \text{ (in mm Hg)} = (1 - RH/100) * 4.9463 * \exp(0.0621 * T)$ (Perret et al., 2000), where RH is the relative humidity (expressed as a percentage) and T is the temperature (in degrees Celsius) recorded on the ground.

2.5. Field sampling

At each site, questing ticks were collected once a month by at least two persons from March to November in 2013 and 2014. On each transect, ticks were collected from the vegetation and litter using a drag sampling procedure with a white cotton drag cloth 1-m² in size from 10 am to 5 pm on days without any rain. Each drag was checked for ticks every 10 meters and a total area of 300 m² was covered per visit. Nymphs and adult ticks were placed in plastic tubes and transported alive in a humid chamber to the laboratory where they were frozen at -20°C upon arrival. Tick identification was performed at species level, using PCR targeting the COI gene (cytochrome oxidase I) and MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) as described (Boyer et al., 2017).

2.6. Nymph density

The density of the nymphs per 100 m² was determined after each visit and expressed as the total number of nymphs present on the cotton cloth in all the 10-meter transects divided by the number of subsamples collected, multiplied by 10.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed on pooled data using R (3.0.2) software. p-values < 0.05 were taken to be statistically significant. The general linear multivariate model with a negative binomial link function was established manually using an upward stepwise procedure. In the multivariate model, all covariates which were found in the univariate analysis to be significantly associated with the nymph abundance were taken to be candidates in the multivariate analysis. A correlation matrix was used on the quantitative variables. The possible existence of correlations, and interactions between quantitative and categorical variables and the AIC (Akaike Information Criterion) was examined. Before inserting a new variable into the model, a likelihood test was carried out to test the contribution of the variable to the nymph density and it was compared to the previous model. Correlations between covariates and the possible occurrence of interactions between quantitative and categorical variables, and the stability of the coefficient estimations were also tested.

3. Results

3.1. Sites and environmental covariates in 2013 and 2014

During 2013 and 2014, 169 sets of ticks were collected at sites located between 145 and 564 m a.s.l. Most of the sites were mountainous, but three were located in lowland areas (Table 1). Most of the sites carried mull humus, but two sites (Appenthal and Sattel) carried moder humus, and two other sites (Murbach and Chene Voltaire) carried mull-moder humus. Soil acidity ranged between 4.6 in the most acidic case (at Murbach) to 6.5 in the most basic case (at Dannemarie). The soil occurring at more than half of the sites consisted of a combination of sand and silt. Two sites (Murbach and Dannemarie) showed a silt-like texture.

Mean ground temperature, mean relative humidity and mean saturation deficit at the study sites were 17 °C (range=1.2-33.8), 73.7 % (range=27-99) and 4.5 mm Hg (range=0-27),

respectively. The percentage rate of coarse elements ranged between 22 % (Sattel) and 72 % (Firstplan). At all the sites studied during the two consecutive years, the mean nymph and adult densities observed in Alsace were 37 nymphs per 100 m² and 2 per 100 m², respectively (Table 2).

3. 2. Nymph densities in 2013 and 2014 in Alsace

Ticks were collected from March to October in years 2013 and 2014. The nymph and adult densities, which were low in March, reached a peak in May-June, before decreasing to a minimum in October during each of the 2 years included in the study (Fig. 3).

3.3. Univariate analyses

In the univariate analysis, some of the sites, such as Murbach, Wasserbourg and Appenthal (mountainous sites) had higher nymph densities than others such as Dannemarie, Illkirch and Pourtales (lowland sites). Lowland sites showed statistically lower nymph densities than mountain sites. However, all the sites had significantly lower nymph densities than Murbach (Table 3). Mull humus showed significantly lower nymph densities than moder humus or mull/moder humus. Although the nymph densities varied between 2013 and 2014, May 2013 and 2014 presented a peak of nymph activity. For the other months, densities were significantly lower (Table 3). The nymph densities were statistically highest in the months of May and June. Indeed, except for the month of June, the β coefficient was consistently negative and differed significantly from the intercept in the month of May (Table 3). Concerning the particle size distribution, Horizon A soil containing a mixture of silt with clay or sand showed significantly lower nymph densities than horizon A soil consisting only of silt (Table 3). So in summary, in the univariate analysis, the mountainous site of Murbach shows

the highest nymph density with *Asperulo-Fagetum* beech forests, a soil composed only of silt and a moder humus type (Table 3).

As far as the abiotic factors were concerned, an association was also found to exist between nymph densities and year of tick collection, altitude, ground temperature, relative ground humidity, ground saturation deficit and soil acidity, as the p values were highly significant (Table 4). The mean nymph densities observed in 2013 were much higher than the 2014 values ($p=1.2*10^{-7}$). Unlike the nymph densities, the adult densities showed no significant differences

between 2013 and 2014. All the adult densities recorded during the other months were significantly lower than that recorded in May (data not shown). Altitude, ground temperature and saturation deficit were positively correlated with the nymph densities, whereas the relative ground humidity and acidity were negatively correlated (Table 4). The coarse element percentages were not significantly correlated with the nymph densities as the p values were not significant.

Significant associations were observed between nymph densities and sites, month of tick collection, topological features, forest type, soil texture, and humus type.

3.4. Multivariate analysis

Correlations were observed between acidity and altitude and between temperature, relative humidity and saturation deficit (Supplementary material 2). Interactions were found to occur between humus and altitude and between SD and humus type (data not shown). Acidity and altitude were therefore not included in the final model. Particle size distribution was not significant in the model, so a model in which the particle size distribution was not included was chosen (Table 5). The model adopted included the following variables: humus and forest type, SD, the month and the year of collection.

In the multivariate analyses, the regression β coefficient obtained with the model adopted is summarized in Table 6. Mull humus is negatively associated here with the nymph densities, contrary to the reference moder humus environment, considering all other factors (SD, forest type and month) to be equal. *Asperulo-Fagetum* beech/ *Luzulo-Fagetum* beech forests were negatively associated with the nymph densities, contrary to the reference *Asperulo-Fagetum* beech forest. In addition, in the multivariate analyses, May and June were always the months of the highest nymph densities. In 2014, the nymph densities were statistically lower than in 2013 (Table 6).

In short, the highest nymph densities corre -*Fagetum* beech forest in May giving a low SD, and this was observed at the Murbach and Appenthal sites.

4. Discussion

The hard tick *I. sp.* responded to sites with a moder or mull/moder humus in an *Asperulo ricinus* is the main vector of the *B. burgdorferi* complex in Europe (Humair and Gern, 2000; van Duijvendijk et al., 2015). Assessing the risk of being bitten by a nymph is a good way of informing the public about the risk of Lyme borreliosis (Hai et al., 2014). In this study, we focused on the nymph densities observed during two consecutive years in a region where Lyme disease is endemic, and on the relationships between abiotic factors (relative humidity, temperature, saturation deficit), biotic factors (humus features, forest type) and nymph densities.

The results obtained in the present univariate analyses show that silt/clay soil was negatively associated with the nymph density, contrary to silt soil. Guerra et al. established in 2002 that silt soils were negatively associated with *I. scapularis* nymph densities. Contrary to what was suggested by Guerra's results, we know that soil with a high clay content retains more moisture, which can be deleterious to tick survival (Guerra et al., 2002; Jensen et al., 2000).

Interestingly, univariate and especially multivariate analyses presented here, showed that moder and mull/moder humus but not mull humus were positively correlated with nymph density. Higher nymph densities therefore occurred at sites containing moder or mull-moder humus rather than mull humus. Biological activity is known to be high in mull humus environments (Gobat et al., 2010; Jabiol et al., 2007; Toutain, 1981). In this type of humus, bacterial, fungal and arthropod populations are highly active (Gobat et al., 2010; Jabiol et al., 2007; Toutain, 1981). The degradation of organic matter (leaves, wood, etc.) is therefore intense and the populations of microorganisms are particularly dense. High nymph densities were not observed in this study at sites where mull humus was present (Dannemarie, Rimbach for example). *I. ricinus* ticks may not develop very easily in this ecological niche, whereas some other organisms (bacteria, fungi, mites, nematodes, earthworms, etc.) abound in this environment (Gobat et al., 2010; Jabiol et al., 2007; Toutain, 1981). The lack of biological activity observed in moder humus may have protective effects on nymph survival. Fungi, bacteria and nematodes are indeed known to be tick predators and thus reduce the tick survival rates (Gingserb, 2014). A low prevalence of microorganisms in moder humus will therefore facilitate the nymphs' chances of survival (Zhioua et al., 1999). Unlike some other organisms, ticks can survive in unfavorable environments such as moder humus environments and therefore tend to occupy this particular type of ecological niche. Apart from biological activity considerations, the low nymph densities observed in mull humus can also be explained by the fact that unlike mull humus, moder humus includes an abundant layer of plant residues and decomposing leaves. This thick layer may therefore contribute to protecting ticks from harsh climatic conditions (such as a highly desiccating atmosphere or very low temperatures), and thus enhance the tick survival rates. This process may explain the differences in nymph population abundance observed between the various sites included in the present study.

In addition, both nymph and adult densities were found to vary from one year to another. A high peak in questing nymph activity was consistently observed in May and June. However, no significant second peak in the tick abundance levels was observed in September or October, contrary to what has often been reported to occur in previous studies on *I. ricinus* nymph epidemiology in Central Europe and Northern England (Kurtenbach et al., 2006). A similar single-peak pattern of questing activity was recently recorded in Germany, a neighboring country, during an eleven-month field study (Schulz et al., 2014). In other European regions such as Southern England and Ireland, a single peak was also observed at the end of spring (Kurtenbach et al., 2006). It is possible that the winter temperatures occurring in Alsace during the years 2013 and 2014 were not high enough to promote the molting of larvae into nymphs the following summer. In fact, it has been previously reported that cumulative summer temperatures and the tick densities in autumn are correlated (Perret et al., 2000; Randolph et al., 2002). Temperature at ground level, sunshine duration and relative humidity are correlated with tick host-seeking activity (Schulz et al., 2014). In Alsace, 2013 was a year with particularly low summer temperatures. The climate in 2013 and 2014 may therefore have been similar to that traditionally observed in Southern England, which therefore did not favor larval development or the occurrence of a second peak in questing nymph activity (Kurtenbach et al., 2006). A unimodal activity peak was previously observed in other forests with dense vegetation like the forest studied here (Jensen and Kaufmann, 2003).

The nymph densities were significantly higher in 2013 than in 2014. In winter 2013, the temperatures were low and a permanent snow cover persisted up to the end of March. The persistent snow cover may have helped *I. ricinus* ticks to survive by protecting them from the frost and from frequent changes of temperature, which are also known to result in nymph mortality (Gigon, 1985; Herrmann and Gern, 2013; Vollack et al., 2017). Since this protective

snow cover was not present in 2014, the conditions on which nymph survival depended were different. It could explain the difference observed in terms of nymph densities between 2013 and 2014. In addition, the abundance of small mammals is usually affected by low winter temperatures. If few rodents were available in the spring for ticks to feed on, this might have indirectly promoted greater questing activity in nymphs (Medlock et al., 2013).

Inter-annual nymph density variations may also be attributable to the fact that mast production can vary annually, regardless of the temperature levels and snow cover, as in the case of acorn production which tends to be variable. When the mast is abundant, the rodent populations increase because they feed on mast. Since ticks in turn feed on these mammals, there will be fewer ticks questing for other vertebrate hosts (Ostfeld et al., 1996). Mast production may have been lower in 2013 than in 2014, in which case the nymph questing activity in spring 2013 probably increased because fewer rodents were available for questing nymphs to feed on.

The present univariate analyses showed that particle size distribution was associated with nymph density at the sites included in this study. Silt/clay soil was found in the univariate analyses to be more negatively associated with nymph density than silt soil. Guerra et al. reported in 2002 that silt was negatively associated with the *I. scapularis* nymph densities. Despite Guerra's results, soil with a high clay content is known to retain more moisture, which can be deleterious to tick survival (Guerra et al., 2002; Jensen et al., 2000). It therefore seems likely that the silt/clay soil retaining excess moisture may have been responsible for the lower nymph densities observed in this type of environment in the present study.

Other biotic factors and covariates such as the presence of deers, rodents and mast production (Földvári et al., 2011; Jensen et al., 2000; Ostfeld et al., 2006; Rizzoli et al., 2009) have not been assessed in this field study. Rodent populations, especially wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), yellow-necked wood mouse *Apodemus flavicollis* and bank vole (*Myodes*

glareolus) populations serve as hosts for *I. ricinus* in this region (Gern et al., 1994; Inventaire National du Patrimoine Naturel, 2017). Inter-site variations in the numbers of small mammals available may also affect the size of the nymph populations inhabiting these sites. Deer density is also one of the most important factors determining the abundance of ticks, as deer are the adult female ticks' main hosts, which supply them with abundant blood meals (Kurtenbach et al., 2006; Mysterud et al., 2016). It has been reported that reducing the deer population densities decreases *Ixodes* tick abundance (Kilpatrick et al., 2014; Piesman, 2006). We were not able to collect reliable deer density data at all the present tick collection sites. However, deers are not the only factor on which tick density depends (Mysterud et al., 2016). Nymph density also depends on many other biotic and abiotic factors (Ruiz-Fons et al., 2012; Vollack et al., 2017).

5. Conclusions

Mull humus contains only one layer of intact leaves above the organo-mineral layer, whereas moder humus comprises a layer of intact leaves as well as a layer of partially decomposing leaves. Higher nymph densities were observed in the present study in moder and mull-moder humus. It seems likely that moder humus may provide a more suitable environment for nymphs, since it may protect them from dryness, cold and predators. The humus type therefore contributes significantly to the acarological risks in these environments, and the data collected on tick transects should therefore include information about this factor.

Abbreviations:

GPS: Global Positioning System, RH: Relative Humidity, SD: Saturation Deficit, T: Temperature, ONF: Office National des Forêts, AER: Applied Econometrics in R, GLM:

Generalized Linear Model, MASS: Modern Applied Statistics with S, SE: Standard Error, AIC: Akaike Information Criterion

Funding

This work was supported by the Centre National de Référence *Borrelia* (French Ministry of Health: “Santé Publique France”).

References:

- Baize, D., 2006. Guide des analyses en pédologie, QUAE. ed.
- Boyer, P.H., Boulanger, N., Nebbak, A., Collin, E., Jaulhac, B., Almeras L. Assessment of MALDI-TOF MS biotyping for *Borrelia burgdorferi* sl detection in *Ixodes ricinus*. PLoS One. 2017 Sep 26;12(9):e0185430.
- Brownstein, J.S., Skelly, D.K., Holford, T.R., Fish, D., 2005. Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. *Oecologia* 146, 469–75. doi:10.1007/s00442-005-0251-9
- Danylyk, I., Kuziarin, O., n.d. Asperulo-Fagetum beech forests | Rare habitats (NATURA-2000) [WWW Document].
- Dobson, A.D.M., Randolph, S.E., 2011. Modelling the effects of recent changes in climate, host density and acaricide treatments on population dynamics of *Ixodes ricinus* in the UK. *J. Appl. Ecol.* 48, 1029–1037. doi:10.1111/j.1365-2664.2011.02004.x
- Estrada-Pena, A., 2003. The relationships between habitat topology , critical scales of connectivity and tick abundance *Ixodes ricinus* in a heterogeneous landscape in northern Spain. *Ecography (Cop.)*. 5, 661–671.
- Estrada-Peña, A., 2001. Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Spain. *J. Med. Entomol.* 38, 361–370.
- Estrada-Peña, A., Ayllón, N., de la Fuente, J., 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Front Physiol.* 27, 64.
- European Commission DG Environment, 2007. Interpretation Manual Of European Union Habitats.
- Falco, R.C., McKenna, D.F., Daniels, T.J., Nadelman, R.B., Nowakowski, J., Fish, D., Wormser, G.P., 1999. Temporal Relation between *Ixodes scapularis* Abundance and

- Risk for Lyme Disease Associated with Erythema Migrans. *Am. J. Epidemiol.* 149, 771–776. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009886
- Ferquel, E., Garnier, M., Marie, J., Bernède-Bauduin, C., Baranton, G., Pérez-Eid, C., Postic, D., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3074–8. doi:10.1128/AEM.72.4.3074-3078.2006
- Földvári, G., Rigó, K., Jablonszky, M., Biró, N., Majoros, G., Molnár, V., Tóth, M., 2011. Ticks and the city: Ectoparasites of the Northern white-breasted hedgehog (*Erinaceus roumanicus*) in an urban park. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 2, 231–234. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.09.001
- Gern, L., Siegenthaler, M., Hu, C.M., Leuba-Garcia, S., Humair, P.F., Moret J., 1994. *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): Duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur. J. Epidemiol.* 10, 75–80.
- Gigon, F., 1985. Biologie d'*Ixodes ricinus*L. sur le Plateau Suisse- une contribution à l'écologie de ce vecteur.
- Gilot, B., Pautou, G., Moncada, E., Ain, G., 1975. [Ecological study of *Ixodes ricinus* (Linné, 1758) (Acarina, Ixodoidea) in southeastern France]. *Acta Trop.* 32, 232–58.
- Gingserb, H., 2014. Tick control: trapping, bio-control, host management and other alternative strategies, in: Press, O.U. (Ed.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, Oxford, pp. 409–444.
- Glass, G.E., Amerasinghe, F.P., Morgan, J.M., Scott, T.W., 1994. Predicting *Ixodes scapularis* abundance on white-tailed deer using geographic information systems. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 538–44.
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Mathey, W., Bally, R., 2010. Le sol vivant: Bases de pédologie,

Biologie des sols, Troisième. ed.

Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E., 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009, 593232.

Guerra, M., Walker, E., Jones, C., Paskewitz, S., Cortinas, M.R., Stancil, A., Beck, L., Bobo, M., Kitron, U., 2002. Predicting the risk of Lyme disease: habitat suitability for *Ixodes scapularis* in the north central United States. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 289–97. doi:10.3201/eid0803.010166

Hai, V.V., Almeras, L., Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P., Pagès, F., 2014. Monitoring human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: available tools and promising future methods. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 607–19. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.022

Herrmann, C., Gern, L., 2013. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) nymphs under cold conditions is negatively influenced by frequent temperature variations. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 445–51. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.05.002

Humair, P.-F., Gern, L., 2000. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect.* 2, 915–922. doi:10.1016/S1286-4579(00)00393-2

Inventaire National du Patrimoine Naturel, 2017. INPN - Statistiques sur le statut biologique des espèces recensées - Région : Alsace [WWW Document].

Jabiol, B., Brêthes, A., Ponge, J.-F., Toutain, F., Brun, J.-J., 2007. L'humus sous toutes ses formes, ENGREF/AGR. ed.

Jensen, P.M., Hansen, H., Frandsen, F., 2000. Spatial risk assessment for Lyme borreliosis in Denmark. *Scand. J. Infect. Dis.* 32, 545–50.

Jensen, P.M., Kaufmann, U., 2003. Seasonal and diel activity of *Ixodes ricinus* (Acari:

- Ixodidae) subpopulations in Denmark. Aspects of size, physiological age, and malate dehydrogenase genotype in a forest site without any undergrowth. *Exp. Appl. Acarol.* 30, 289–303.
- Jore, S., Vanwambeke, S.O., Viljugrein, H., Isaksen, K., Kristoffersen, A.B., Woldehiwet, Z., Johansen, B., Brun, E., Brun-Hansen, H., Westermann, S., Larsen, I.-L., Ytrehus, B., Hofshagen, M., 2014. Climate and environmental change drives *Ixodes ricinus* geographical expansion at the northern range margin. *Parasit. Vectors* 7, 11. doi:10.1186/1756-3305-7-11
- Kilpatrick, H.J., LaBonte, A.M., Stafford, K.C., 2014. The relationship between deer density, tick abundance, and human cases of Lyme disease in a residential community. *J. Med. Entomol.* 51, 777–84.
- Kurtenbach, K., Hanincová, K., Tsao, J.I., Margos, G., Fish, D., Ogden, N.H., 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 660–9. doi:10.1038/nrmicro1475
- Letrilliart, L., Ragon, B., Hanslik, T., Flahault, a, 2005. Lyme disease in France: a primary care-based prospective study. *Epidemiol. Infect.* 133, 935–42. doi:10.1017/S0950268805004413
- Li, S., Heyman, P., Cochez, C., Simons, L., Vanwambeke, S.O., 2012. A multi-level analysis of the relationship between environmental factors and questing *Ixodes ricinus* dynamics in Belgium. *Parasit. Vectors* 5, 149–160. doi:10.1186/1756-3305-5-149
- MacLeod, J., 1935. *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. II. The factors governing survival and activity. *Parasitology* 27, 123–144.
- Mannelli, A., Boggiatto, G., Grego, E., Cinco, M., Murgia, R., Stefanelli, S., De Meneghi, D., Rosati, S., 2003. Acarological risk of exposure to agents of tick-borne zoonoses in the

- first recognized Italian focus of Lyme borreliosis. *Epidemiol. Infect.* 131, 1139–47.
- Medlock, J., Pietzsch, M., Rice, N., Jones, L., Kerrod, E., Avenell, D., Los, S., Ratcliffe, N., Leach, S., Butt, T., 2008. Investigation of ecological and environmental determinants for the presence of questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on Gower, South Wales. *J Med Entomol.* 45, 314–25.
- Medlock, J.M., Hansford, K.M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J.-C., Golovljova, I., Jaenson, T.G.T., Jensen, J.-K., Jensen, P.M., Kazimirova, M., Oteo, J., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S.E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M.M., Sprong, H., Vial, L., Hendrickx, G., Zeller, H., Van Bortel, W., 2013. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit. Vectors* 6, 1. doi:10.1186/1756-3305-6-1
- Milne, A., 1946. The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. Distribution of the tick on hill pasture. *Parasitology* 37, 75. doi:10.1017/S0031182000013184
- Mysterud, A., Easterday, W.R., Stigum, V.M., Aas, A.B., Meisingset, E.L., Viljugrein, H., Johnson, P.T.J., Preston, D.L., Hoverman, J.T., LaFonte, B.E., Johnson, P.T.J., Roode, J.C. de, Fenton, A., Piesman, J., Gern, L., Ruiz-Fons, F., Fernandez-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Gortázar, C., Fuente, J. de la, Estrada-Peña, A., Fuente, J. de la, Ostfeld, R.S., Cabezas-Cruz, A., Medlock, J.M., Glass, G.E., Ostfeld, R.S., Keesing, F., LoGiudice, K., Ostfeld, R.S., Schmidt, K.A., Keesing, F., Laurenson, M.K., Norman, R.A., Gilbert, L., Reid, H.W., Hudson, P.J., Ostfeld, R.S., Canham, C.D., Oggenfuss, K., Winchcombe, R.J., Keesing, F., Levi, T., Kilpatrick, A.M., Mangel, M., Wilmers, C.C., Gilbert, L., Maffey, G.L., Ramsay, S.L., Hester, A.J., Brisson, D., Dykhuizen, D.E., Ostfeld, R.S., Randolph, S.E., Dobson, A.D.M., Wood, C.L., Civitello, D.J., Gern, L., Jore, S., Andreassen, A., Turney, S., Gonzalez, A., Millien, V., Gray, J.S., Kahl, O., Janetzki, C., Stein, J., Rand, P.W., Lubelczyk, C., Holman, M.S., Lacombe, E.H., Smith,

- R.P., Wilson, M.L., Ducey, A.M., Litwin, T.S., Gavin, T.A., Spielman, A., Deblinger, R.D., Wilson, M.L., Rimmer, D.W., Spielman, A., Coulson, T., Guinness, F., Pemberton, J., Clutton-Brock, T., Fryxell, J.M., Packer, C., McCann, K., Solberg, E.J., Sæther, B.-E., Cornulier, T., Lindström, E., Kjelland, V., Stuen, S., Skarpaas, T., Slettan, A., Tveten, A.K., Ostfeld, R.S., Keesing, F., LoGiudice, K., Werden, L., Telford, S.R., Mather, T.N., Moore, S.I., Wilson, M.L., Spielman, A., Kiffner, C., Lödige, C., Alings, M., Rühle, F., Mysterud, A., Hatlegjerde, I.L., Sørensen, O.J., Herrmann, C., Gern, L., Abrahamsen, J., Mysterud, A., Qviller, L., Meisingset, E.L., Viljugrein, H., Qviller, L., Mysterud, A., Easterday, W.R., Qviller, L., Viljugrein, H., Ytrehus, B., James, M.C., Funk, S., Bogich, T.L., Jones, K.E., Kilpatrick, A.M., Daszak, P., 2016. Contrasting emergence of Lyme disease across ecosystems. *Nat. Commun.* 7, 11882. doi:10.1038/ncomms11882
- Ostfeld, R.S., Canham, C.D., Oggenfuss, K., Winchcombe, R.J., Keesing, F., 2006. Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in lyme-disease risk. *PLoS Biol.* 4, e145. doi:10.1371/journal.pbio.0040145
- Ostfeld, R.S., Jones, C.G., Wolff, J.O., 1996. Of Mice and Mast. *Bioscience* 46, 323–330. doi:10.2307/1312946
- Perret, J.L., Guigoz, E., Rais, O., Gern, L., 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.* 86, 554–7.
- Pfäffle, M., Littwin, N., Muders, S. V, Petney, T.N., 2013. The ecology of tick-borne diseases. *Int. J. Parasitol.* 43, 1059–77. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.009
- Piesman, J., 2006. Strategies for reducing the risk of Lyme borreliosis in North America. *Int. J. Med. Microbiol.* 296 Suppl, 17–22. doi:10.1016/j.ijmm.2005.11.007

- Randolph, S.E., Green, R.M., Hoodless, a N., Peacey, M.F., 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 32, 979–89.
- Randolph, S.E., Storey, K., 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *J. Med. Entomol.* 36, 741–8.
- Rizzoli, A., Hauffe, H.C., Tagliapietra, V., Neteler, M., Rosà, R., 2009. Forest Structure and Roe Deer Abundance Predict Tick-Borne Encephalitis Risk in Italy. *PLoS One* 4, e4336. doi:10.1371/journal.pone.0004336
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubalek, Z., Foldvari, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Spiltalska, E., Kazimirova, M., 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Heal.* 2, 251–275. doi:10.3389/fpubh.2014.00251
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2012. Factors driving the abundance of *ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2669–76. doi:10.1128/AEM.06564-11
- Schulz, M., Mahling, M., Pfister, K., 2014. Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *J. Vector Ecol.* 39, 56–65. doi:10.1111/j.1948-7134.2014.12070.x
- Stanek, G., Wormser, G., Gray, J., Strle, F., 2012. Lyme borreliosis. *Lancet* 379, 461–73. doi:10.1016/S0140-6736(11)60103-7
- Tack, W., Madder, M., Baeten, L., De Frenne, P., Verheyen, K., 2012. The abundance of

- Ixodes ricinus* ticks depends on tree species composition and shrub cover. *Parasitology* 139, 1273–81. doi:10.1017/S0031182012000625
- Tagliapietra, V., Rosà, R., Arnoldi, D., Cagnacci, F., Capelli, G., Montarsi, F., Hauffe, H.C., Rizzoli, A., 2011. Saturation deficit and deer density affect questing activity and local abundance of *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) in Italy. *Vet. Parasitol.* 183, 114–24. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.022
- Tomkins, J.L., Aungier, J., Hazel, W., Gilbert, L., 2014. Towards an Evolutionary Understanding of Questing Behaviour in the Tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One* 9, e110028. doi:10.1371/journal.pone.0110028
- Toutain, F., 1981. LES HUMUS FORESTIERS STRUCTURES ET MODES DE FONCTIONNEMENT*.
- van Duijvendijk, G., Sprong, H., Takken, W., 2015. Multi-trophic interactions driving the transmission cycle of *Borrelia afzelii* between *Ixodes ricinus* and rodents: a review. *Parasit. Vectors* 8, 643. doi:10.1186/s13071-015-1257-8
- Vandenesch, A., Turbelin, C., Couturier, E., Arena, C., Jaulhac, B., Ferquel, E., Choumet, V., Saugeon, C., Coffinieres, E., Vaillant, V., Hanslik, T., 2014. Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. *EuroSurveill* 19, pii=20883.
- Vollack, K., Sodoudi, S., Névir, P., Müller, K., Richter, D., 2017. Influence of meteorological parameters during the preceding fall and winter on the questing activity of nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Biometeorol.* 2017. *Int J Biometeorol.*
- Vourc'h, G., Abrial, D., Bord, S., Jacquot, M., Masségli, S., Poux, V., Pisanu, B., Bailly, X., Chapuis, J.-L., 2016. Mapping human risk of infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the agent of Lyme borreliosis, in a periurban forest in France. *Ticks Tick. Borne.*

Zhioua, E., Heyer, K., Browning, M., Ginsberg, H.S., LeBrun, R.A., 1999. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 36, 900–902.

color in the figure: red stands for positive correlations; blue stands for negative correlations.

The larger the circle, the higher the correlation.

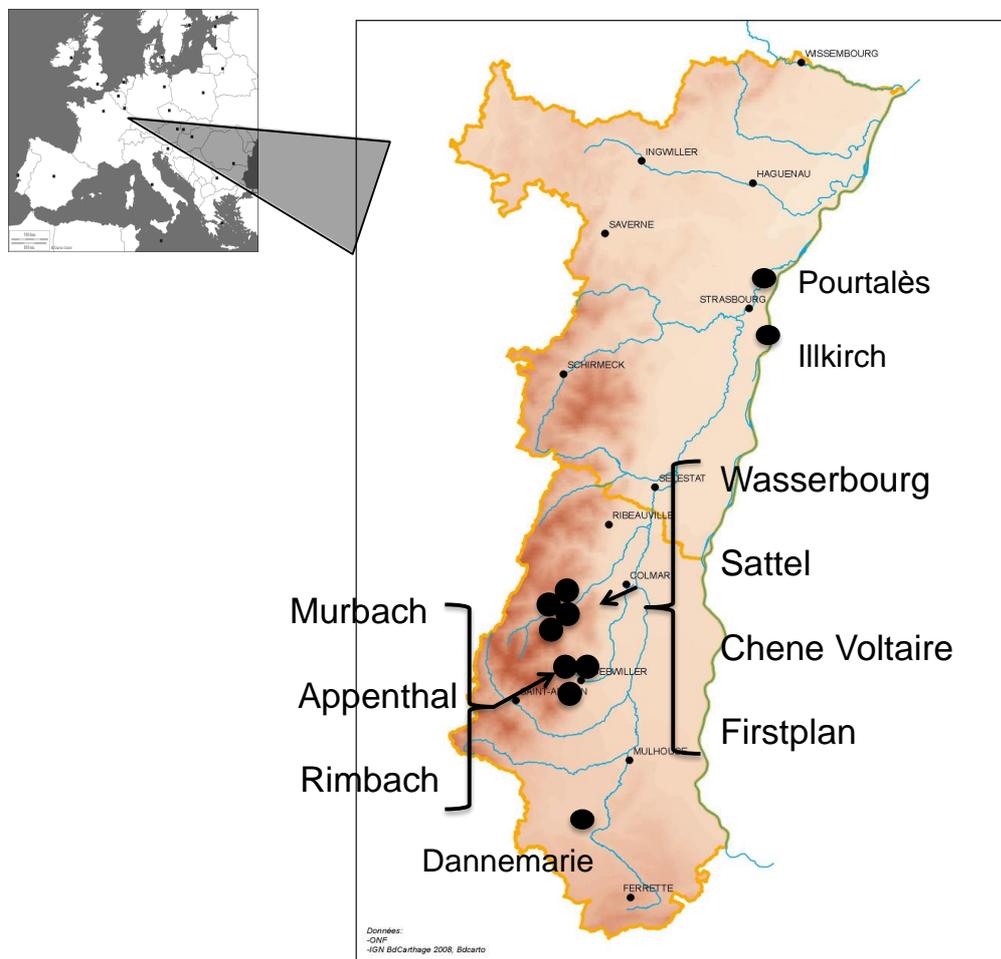


Fig. 1: Sites studied in the Alsace region (France) in 2013 and 2014.

Descriptive statistics for quantitative variables				
Covariates	Mean	Median	SD	Range
Ground temperature (°C)	17	17	5.4	[1.2-33.8]
Ground relative humidity (%)	73.7	78	19.6	[27-99]
Saturation deficit (mm Hg)	4.5	3	4.5	[0-27]
pH	5.4	5.4	0.6	[4.6-6.5]
Coarse element percentage(%)	39.4	35.5	16.2	[22-70]
Altitude(m a.s.l)	433	450	186.7	[145-765]
Nymphal density (nymph per m ²)	37	11	66.9	[0-426]
Adult density (adult per m ²)	2	1	3.9	[0-33]

Table 2. Descriptive statistics on the quantitative variables on which this study focused.

Sites	Humus	pH	Texture	% coarse elements	Altitude (m)	Topographic type	Latitude	Longitude	Total nymphs collected	
Type of forest: <i>Asperulo-Fagetum</i> beech forest									2013	2014
Appenthal	moder	5.3	silt-sandy	27	450	mountainous	N47.918393	E7.213512	1414	1078
Chene Voltaire	mull-moder	5.4	sandy-silt	30	564	mountainous	N48.03855	E7.08737	231	274
Dannemarie	mull	6.5	silt	24	320	lowland	N47.695059	E7.143337	86	130
Firstplan	mull	6.2	silt-sandy	72	450	mountainous	N48.021922	E7.197639	441	492
Murbach	mull-moder	4.6	silt	47	520	mountainous	N47.918961	E7.210436	2166	1231
Sattel	moder	4.9	sandy-silt	22	765	mountainous	N48.038552	E7.087406	413	466
Type of forest: <i>Asperulo-Fagetum</i> beech/ <i>Luzulo-Fagetum</i> beech forest										
Wasserbourg	mull	5.8	sandy-silt	52	384	mountainous	N48.020912	E7.126243	900	586
Type of forest: Oak-pine forest										
Rimbach	mull	4.7	silt-sandy	41	590	mountainous	N47.907963	E7.158861	793	355
Type of forest: Ash-oak forest										
Illkirch	mull	NA	silt-clay	NA	146	lowland	N48.518797	N7.74322	413	384
Type of forest: NA										
Portalès	mull	NA	silt-sandy	NA	145	lowland	N48.605847	N7.800294	866	284

Table 1: Characteristics of sites investigated in 2013 and 2014. NA: not applicable

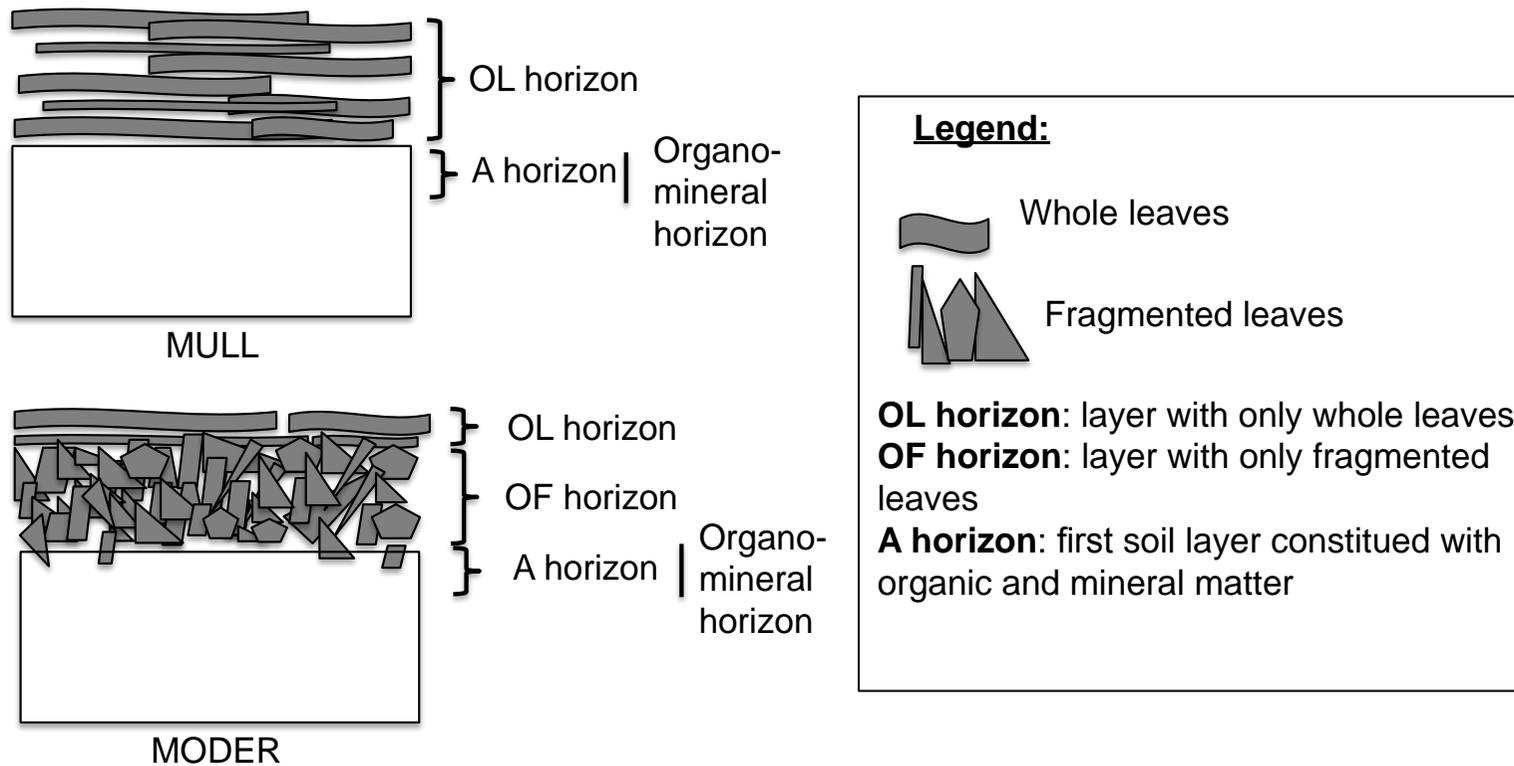


Fig. 2: Scheme of various humus types adapted from Jabiol et al., 2007 (Jabiol et al., 2007).

Impact of categorical variables on nymphal densities in univariate analysis				
Categorical variable	β	SE	z value	p value
Categorical variable: Site				
Murbach (intercept)	4.6	0.3	14.4	< 0.001 ***
Appenthal	-0.3	0.5	-0.8	0.45
Chene Voltaire	-2.0	0.5	-4.2	< 0.001 ***
Dannemarie	-2.9	0.5	-6.1	< 0.001 ***
Firstplan	-1.4	0.5	-3.1	0.002**
Illkirch	-1.9	0.5	-4.3	<0.001***
Pourtalès	-1.5	0.5	-3.3	<0.001***
Rimbach	-1.0	0.5	-2.2	0.03*
Sattel	-1.5	0.5	-3.2	0.001***
Wasserbourg	-0.9	0.5	-1.9	0.06
Categorical variable: Topographic type				
mountainous (intercept)	3.8	0.1	28.8	<0.001***
lowland	-1.2	0.2	-4.7	<0.001***
Categorical variable: Humus type				
moder (intercept)	3.9	0.25	15.4	<0.001***
mull-moder	0.2	0.4	0.6	0.6
mull	-0.7	0.3	-2.3	0.02*
Categorical variable: Month				
May (intercept)	4.4	0.2	21.4	<0.001***
March	-3.0	0.4	-7.6	<0.001***
April	-0.7	0.33	-2.1	0.04*
June	0.02	0.30	0.07	0.9
July	-0.8	0.3	-2.7	0.008**
August	-1.2	0.3	-4.0	<0.001***
September	-2.5	0.3	-7.8	<0.001***
October	-3.2	0.4	-9.2	<0.001***
Categorical variable: Forest type				
<i>Asperulo-Fagetum</i> beech forest (intercept)	3.8	0.1	26.7	<0.001***
oak and pine forest	-0.2	0.4	-0.4	0.7
ash and oak forest	-1.1	0.4	-3.0	0.003**
<i>Asperulo-Fagetum/Luzulo-Fagetum</i> beech forest	-0.6	0.4	-1.7	0.1
Categorical variable: Particule size distribution				
Silt (intercept)	4.0	0.3	15.9	<0.001***
Silt-clay	-1.3	0.4	-3.0	0.002**
Silt-sandy	-0.7	0.3	2.0	0.04*
Sandy-silt	-0.4	0.3	-0.7	0.2

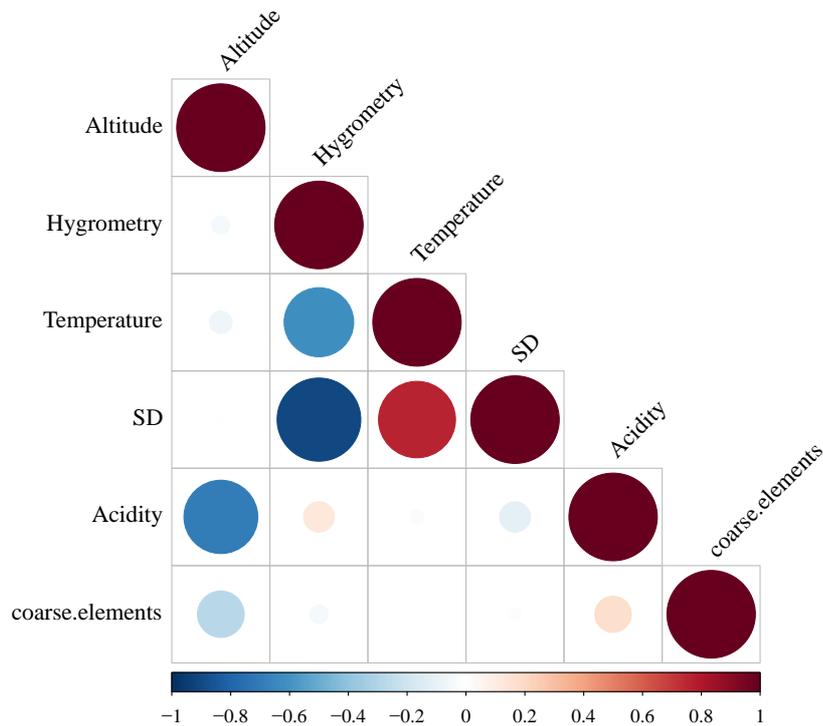
Table 3. Results of univariate analyses on categorical variables (SE: standard error, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; intercept is the reference)

Impact of abiotic factors on nymphal densities in univariate analysis				
Quantitative covariates	β	SE	z value	p value
Year (2013 vs 2014)	-1.2	0.2	-5.3	< 0.001 ***
Altitude	0.002	0.0006	2.6	0.009**
Temperature	0.07	0.02	3.2	0.002**
Relative hygrometry	-0.025	0.006	-4.1	<0.001 ***
Saturation deficit	0.1	0.03	3.6	0.004**
pH	-0.8	0.2	-4.4	<0.001***
Coarse element percentage	0.01	0.08	1.4	0.2

Table 4. Effects of quantitative variables on nymph densities. Results of univariate analyses. (SE: standard error. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Associations between nymphal densities and environmental factors in multivariate analysis				
Covariates	β	SE	z value	p value
Intercept	16.5	2.5	6.7	< 0.001***
Mull	-1.1	0.27	-4.0	< 0.001***
Mull-moder	-0.14	0.27	-0.52	0.6
Oak-fir	0.4	0.26	1.5	0.13
Ash-oak	0.1	0.26	0.29	0.77
<i>Asperulo-Fagetum</i> beech forest/ <i>Luzulo-Fagetum</i> beech forest	-1.2	0.33	-3.8	0.0016**
SD	0.018	0.02	0.94	0.35
March	-2.6	0.36	-7.4	< 0.001***
April	-0.9	0.29	-3.0	0.003**
June	-0.28	0.26	-1.0	0.30
July	-1.0	0.25	-4.0	< 0.001***
August	-1.4	0.29	-4.7	< 0.001***
September	-2.6	0.36	-7.4	< 0.001***
October	-3.1	0.33	-9.3	< 0.001***
November	-4.6	0.44	-10.4	< 0.001***
Year	-0.85	0.18	-4.9	< 0.001***

Table 5. Summary of regression model. References are: Moder, *Asperulo-Fagetum* beech forest in the month of May, 2013. The regression coefficient β , the standard error (SE), the z-value (statistical tests) and the p value (significance) obtained with each explanatory variable are given. SD: Saturation deficit



Supplementary material 1: Correlation matrix corresponding to the quantitative variables studied. Colored scale gives the values of the correlation coefficient and the corresponding

Enfin, le dernier objectif de ma thèse était d'établir des zones à risque de borréliose de Lyme dans le but de prioriser les lieux où mettre en place des mesures de prévention. Ainsi, à partir des données recueillies durant les campagnes de 2013 et 2014, nous avons établi une gradation du risque de borréliose de Lyme en Alsace.

Etude descriptive globale du risque acarologique en Alsace

I) Descriptif des données

A partir des données de densités en nymphes des sites collectées régulièrement en Alsace sur les deux années 2013, 2014 nous avons calculé pour chaque site une densité moyenne en nymphes. Avec les données de prévalence de 2013 et de 2014, nous avons également établi un taux d'infection à *B. burgdorferi* si moyen chez les nymphes.

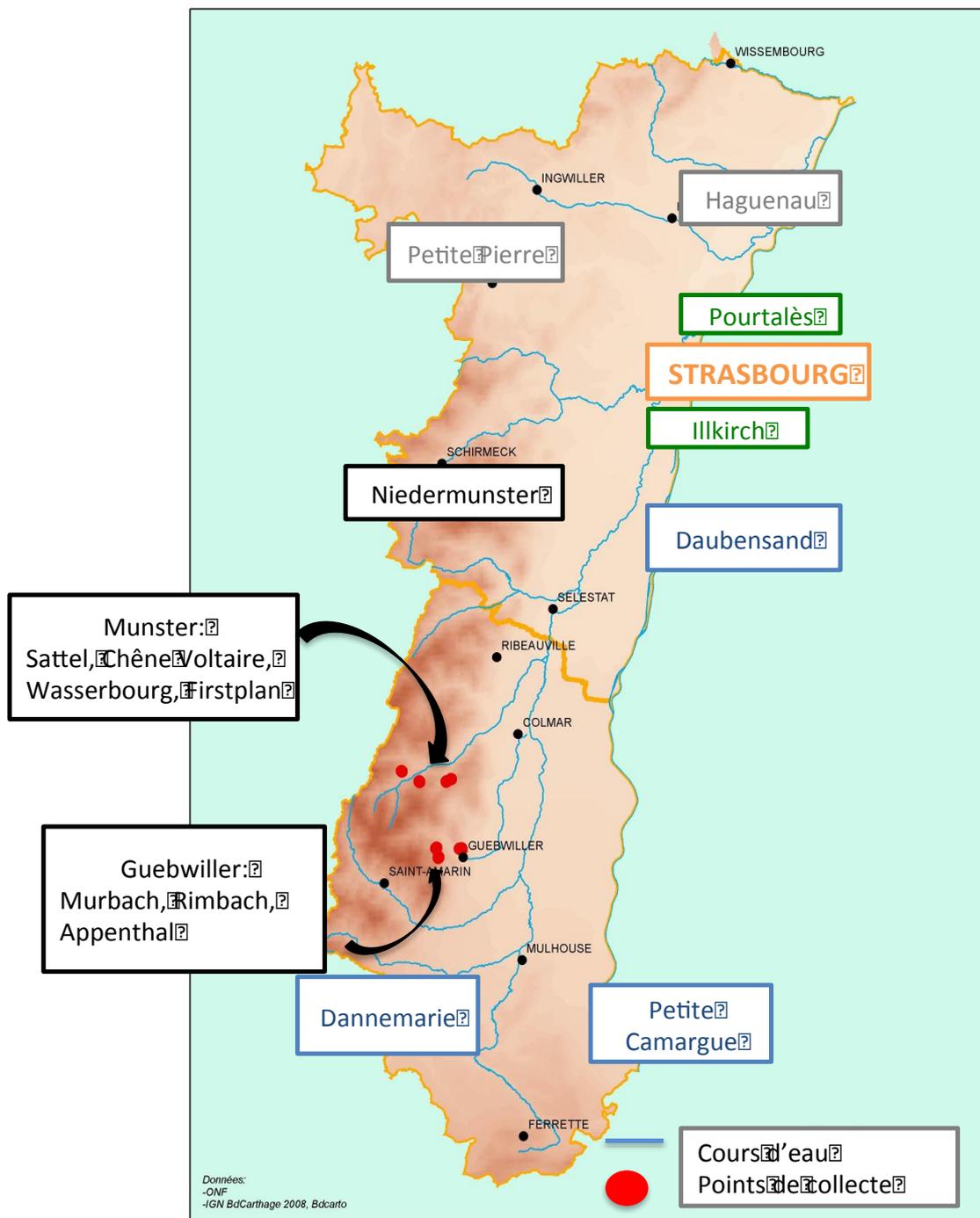
Pour chaque site, nous avons ensuite déterminé la densité en nymphes infectées moyenne. Nous considérons donc le risque acarologique moyen sur 2013 et 2014, ayant des données pour ces 13 sites sur ces deux années. Nous évaluons également ce risque sur 2015 et 2016.

Nous présentons également les données de collectes effectuées par le CNR entre 2013 et 2016 sur un autre pathogène *A. phagocytophilum*.

II) Résultats

Pour les trois années (2013-2014 et 2015), voici les résultats obtenus pour les densités en nymphes, les taux d'infection ainsi que les densités en nymphes infectées pour les sites investigués (localisés sur la carte ci-dessous- Figure 28).

Figure 28. Carte de répartition des principaux sites investigués en Alsace de 2013 à 2016



En vert sont représentés les sites péri-urbains
En bleu les sites de plaines +/- inondables
En noir les zones forestières +/- montagneuses
En gris, deux sites collectés uniquement en 2013

(A) Densités en nymphes en Alsace

La densité en nymphes notée D a été calculée à l'aide de la formule détaillée en p.144

Tableau VII. Densités en nymphes et en adultes en 2013

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés	Densité en nymphes	Densité en adultes
Appenthal	1414	126	126	11
Chêne Voltaire	231	10	20	<1
Dannemarie	86	3	8	<1
Daubensand	18	1	3	<1
Firstplan	441	16	34	1
Illkirch	413	9	16	<1
Murbach	2166	41	193	4
Niedermunster	980	31	19	<1
Petite Camargue	6	6	1	1
Pourtalès	866	15	36	<1
Rimbach	793	17	71	2
Sattel	413	21	34	2
Wasserbourg	900	53	79	4
Total	8727	349	42	2

Tableau VIII. Densités en nymphes et en adultes en 2014

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés	Densité en nymphes	Densité en adultes
Appenthal	1078	163	36	5
Chêne Voltaire	274	44	9	2
Dannemarie	130	12	4	<1
Daubensand	151	5	26	1
Firstplan	492	25	17	1
Illkirch	384	23	14	1
Murbach	1231	68	40	2
Niedermunster	177	35	12	2
Petite Camargue	183	4	11	<1
Pourtalès	284	14	10	1
Rimbach	355	22	13	1
Sattel	466	61	16	2
Wasserbourg	586	108	20	4
Total	5791	584	18	2

Tableau IX. Densités en nymphes et en adultes en 2015

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés	Densité en nymphes/100m ²	Densité en adultes
Illkirch	540	19	20	0,7
Niedermunster	376	71	14,4	2,7
Dannemarie	202	2	7,5	0,1
Murbach	1040	22	38,5	0,8
Total	2158	114	20,1	1,1

En Alsace, le site ayant la densité en nymphes la plus élevée correspond au site de Murbach et ceci quelque soit l'année de considérée entre 2013 et 2015) suivie par le site de l'Appenthal (en 2013 et 2014). Pour ce qui est de la densité en adultes, celle-ci est régulièrement la plus élevée à Niedermunster (en 2014 et 2015).

Tableau X. Densités en nymphes et en adultes en 2016

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés	Densité en nymphes/100m ²	Densité en adultes
Illkirch	449	21	15	1
Niedermunster	795	168	25	5
Dannemarie	208	18	7,7	1
Murbach	1066	30	40	1
Total	2518	237	22	2

La densité en nymphes à Murbach reste équivalente en 2016 par rapport aux années 2014 et 2015. Le site de Niedermunster présente une densité beaucoup plus importante qu'en 2015. Le site de Dannemarie est stable par rapport à 2015.

(B) Taux d'infection des nymphes en Alsace

La prévalence de *B. burgdorferi* sl chez les nymphes pour les années 2013, 2014 et 2015 est synthétisée ci-dessous.

Tableau XI. Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2013

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage	IC ₉₅
Appenthal	364	26	7,1	[4,9-10,3]
Murbach	402	70	17,4	[14-21]
Rimbach	299	26	8,7	[6,0-12,4]
Wasserbourg	329	27	8,2	[5,7-11,7]
Firstplan	244	34	13,9	[10,1-18,8]
Chêne Voltaire	175	12	6,9	[4,0-11,6]
Sattel	232	14	6,0	[3,6-9,9]
Niedermunster	375	23	6,1	[4,1-9,0]
Dannemarie	69	3	4,3	[1,5-12,0]
Daubensand	16	1	6,3	[1,1-28,3]
Petite Camargue	3	0	0,0	[0-56,1]

Pourtalès	140	11	7,9	[4,4-13,5]
Illkirch	258	34	13,2	[9,6-17,9]

Tableau XII. Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2014

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage	IC ₉₅
Appenthal	423	32	7,6	[5,4; 10,5]
Murbach	417	56	13,4	[10,5; 17]
Rimbach	292	17	5,8	[3,7; 9,1]
Wasserbourg	272	21	7,7	[5,1; 11,5]
Firstplan	254	19	7,5	[4,8; 11,4]
Chêne Voltaire	177	6	3,4	[1,6; 7,2]
Sattel	204	10	4,9	[2,7; 8,8]
Niedermunster	219	11	5,0	[2,9; 8,8]
Dannemarie	134	3	2,2	[0,8; 6,4]
Daubensand	100	12	12,0	[7; 19,8]
Petite Camargue	91	7	7,7	[3,8; 15]
Pourtalès	154	11	7,1	[4; 12,3]
Illkirch	297	28	9,4	[6,6; 13,3]

Tableau XIII. Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2015

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage	IC ₉₅
Illkirch	276	34	12,3	[8,7 - 16,8]
Niedermunster	207	23	11,1	[7,2 - 16,2]
Dannemarie	192	20	10,4	[6,5 - 15,6]
Murbach	299	57	19,1	[14,8 - 24,0]

Pareillement aux densités en nymphes, la prévalence la plus élevée de l'infection à *B. burgdorferi* si est retrouvée sur le site de Murbach pour les trois années. D'autres sites présentent également un taux d'infection élevé : il s'agit du Firstplan (en 2013), du site de Daubensand (en 2014) et du site péri-urbain d'Illkirch (2015).

Hormis le site de Murbach, qui de façon constante est à un taux au-dessus des autres sites, les autres prévalences peuvent être qualifiées de dynamique. En effet, un site (ex du Firstplan) présente en 2013 un taux élevé (13,9 %) puis beaucoup plus bas l'année suivante (7 % environ en 2014).

Nous avons collecté sur ces sites tous les mois et notre méthodologie n'ayant pas évolué entre les années, on voit que cette prévalence moyenne sur l'année est très variable et que ceci n'est pas attribuable à des variations dans l'échantillonnage ou dans la méthodologie.

Tableau XIV. Taux d'infection des nymphes en 2016

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage	IC ₉₅
Illkirch	253	55	21,7	[17-27]
Niedermunster	392	43	11	[8-14]
Dannemarie	235	30	13	[9-18]
Murbach	357	81	22,7	[19-27]

Le taux d'infection des tiques à *B. burgdorferi* sl à Illkirch a quasiment doublé entre 2015 et 2016.

(C) Densités en nymphes infectées en Alsace

Les densités en nymphes de 2013 à 2016 sont présentées dans les tableaux ci-dessous.

Tableau XV. Densités en nymphes infectées en 2013

Site	Densité en nymphes	Taux d'infection	Densité en nymphes infectées
Appenthal	60	7,1	4
Chêne Voltaire	13	6,2	1
Dannemarie	5	4,3	<1
Daubensand	14	6,3	<1
Firstplan	23	13,9	3
Illkirch	15	13,2	2
Murbach	80	17,4	14
Niedermunster	17	6,1	1
Petite Camargue	10	0	<1
Pourtalès	23	7,9	2
Rimbach	30	8,7	3
Sattel	22	6,0	1
Wasserbourg	36	8,2	3
Moyenne	27	8,1	2

Tableau XVI. Densités en nymphes infectées en 2014

Site	Densité en nymphes	Taux d'infection	Densité en nymphes infectées
Appenthal	36	7,6	3
Chêne Voltaire	9	3,4	<1
Dannemarie	4	2,2	<1
Daubensand	26	12	3
Firstplan	17	7,5	1
Illkirch	14	9,4	1
Murbach	40	13,4	5

Site	Densité en nymphes	Taux d'infection	Densité en nymphes infectées
Niedermunster	12	5	<1
Petite Camargue	11	7,7	<1
Pourtalès	10	7,1	<1
Rimbach	13	5,8	<1
Sattel	16	4,9	<1
Wasserbourg	20	7,7	2
Moyenne	18	7,2	1

Tableau XVII. Densités en nymphes infectées en 2015

Site	Densité en nymphes	Taux d'infection	Densité en nymphes infectées
Illkirch	20	12,3	3
Niedermunster	14,4	11,1	2
Dannemarie	7,5	10,4	1
Murbach	38,5	19,1	7
Moyenne	20,1	13,2	3

Tableau XVIII. Densités en nymphes infectées en 2016

Site	Densité en nymphes	Taux d'infection	Densité en nymphes infectées
Illkirch	15	21,7	3
Niedermunster	25	11	3
Dannemarie	7,7	13	1
Murbach	40	22,7	9
Moyenne	22	17,1	4

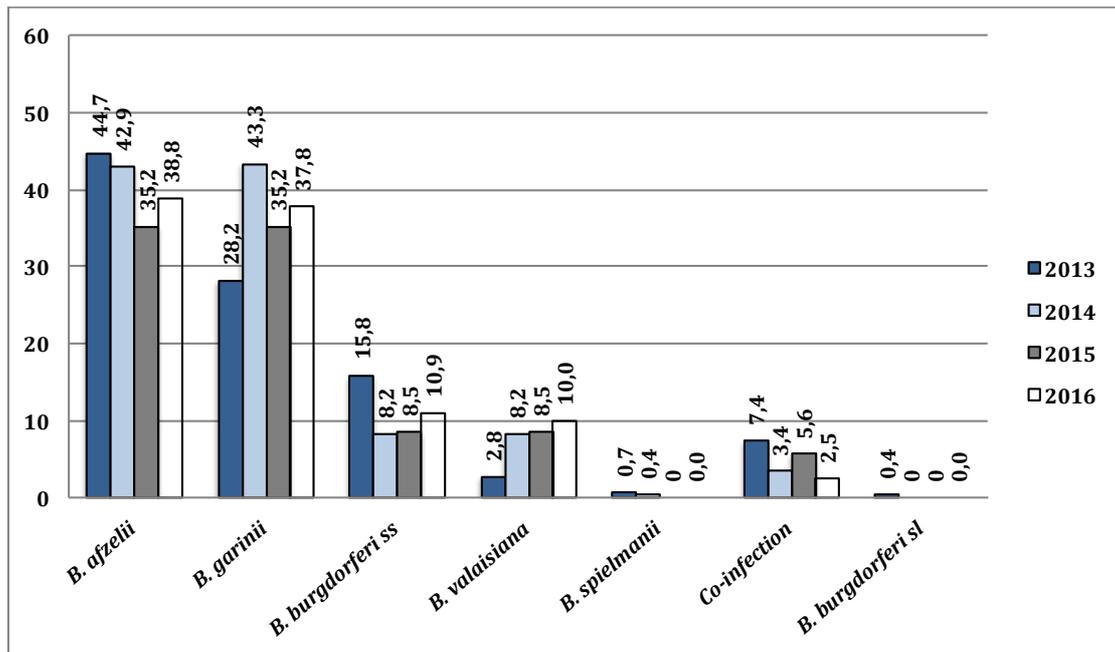
Murbach, du fait des résultats précédents est bien sûr le site avec la densité en nymphes infectées la plus élevée et ceci toujours quelque soit l'année. Dannemarie présente un risque moyen sur l'année nulle en 2013 et 2014. En 2015 et 2016, le risque passe à une nymphe infectée par 100 m². On observe donc une augmentation à Dannemarie tout comme à Illkirch où les densités en 2013 et 2014 sont plus faibles qu'en 2015 et 2016. Le site de Niedermunster présente des augmentations plus importantes. La densité en nymphes infectées est passée de nulle (en 2014) à 3 en (en 2016). L'année 2014 présente des densités en nymphes infectées plus basses par rapport aux autres années d'études, en effet en moyenne elle est de 1 nymphe infectée par 100 m² et de 4 nymphes infectées par 100 m² en 2016.

Les variations observées sont importantes cependant les sites suivis en continu depuis 2013 (Niedermunster, Dannemarie, Murbach et Illkirch) font partie (sauf pour Dannemarie) de sites avec une population en nymphes importante. D'autres sites comme la Petite Camargue ou le Sattel, moins dense en population n'ont pas été

collectés en 2015 et 2016. Ceci a pu jouer sur la densité moyenne obtenue.

(D) Répartition des espèces de *Borrelia burgdorferi* sl

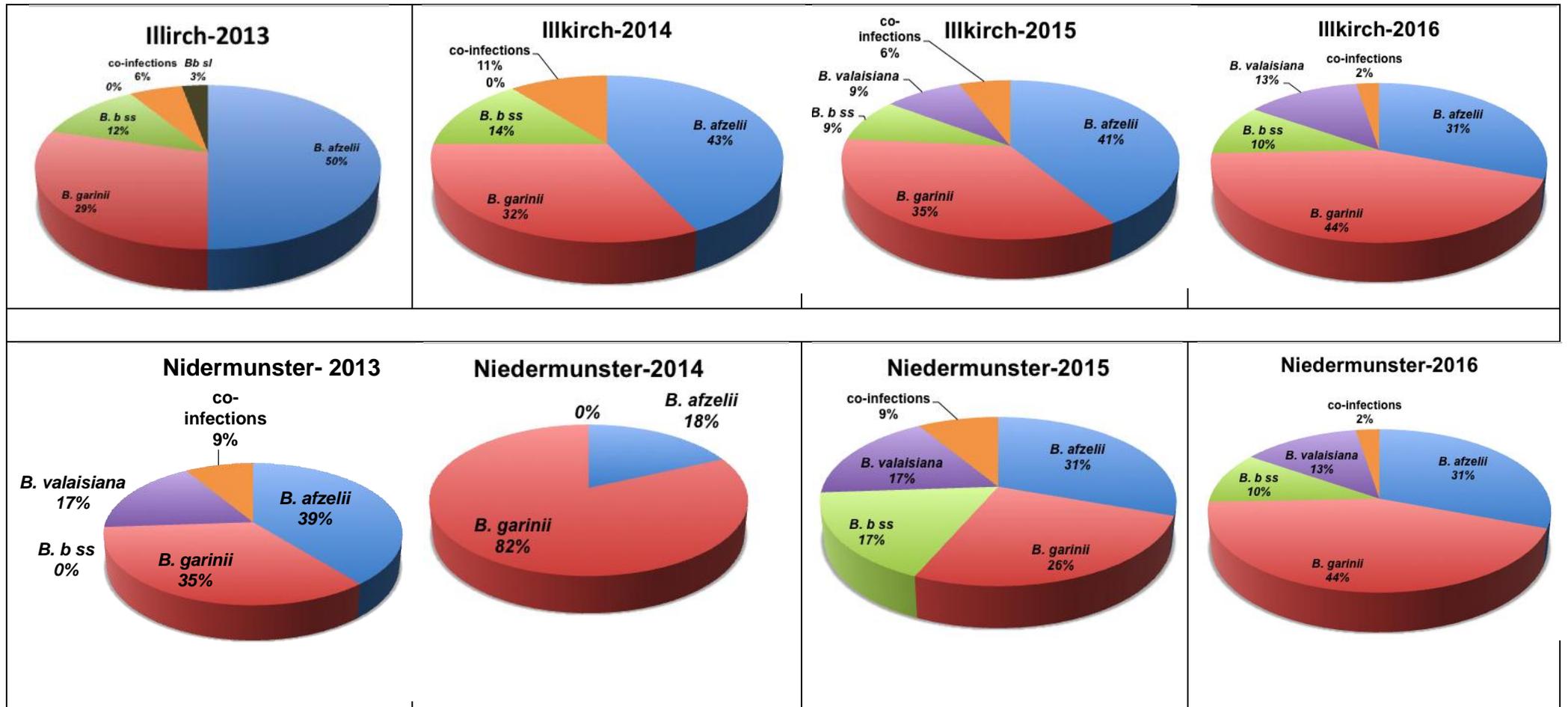
Figure 29. Répartition globale des différentes espèces de *Borrelia burgdorferi* sl de 2013 à 2016

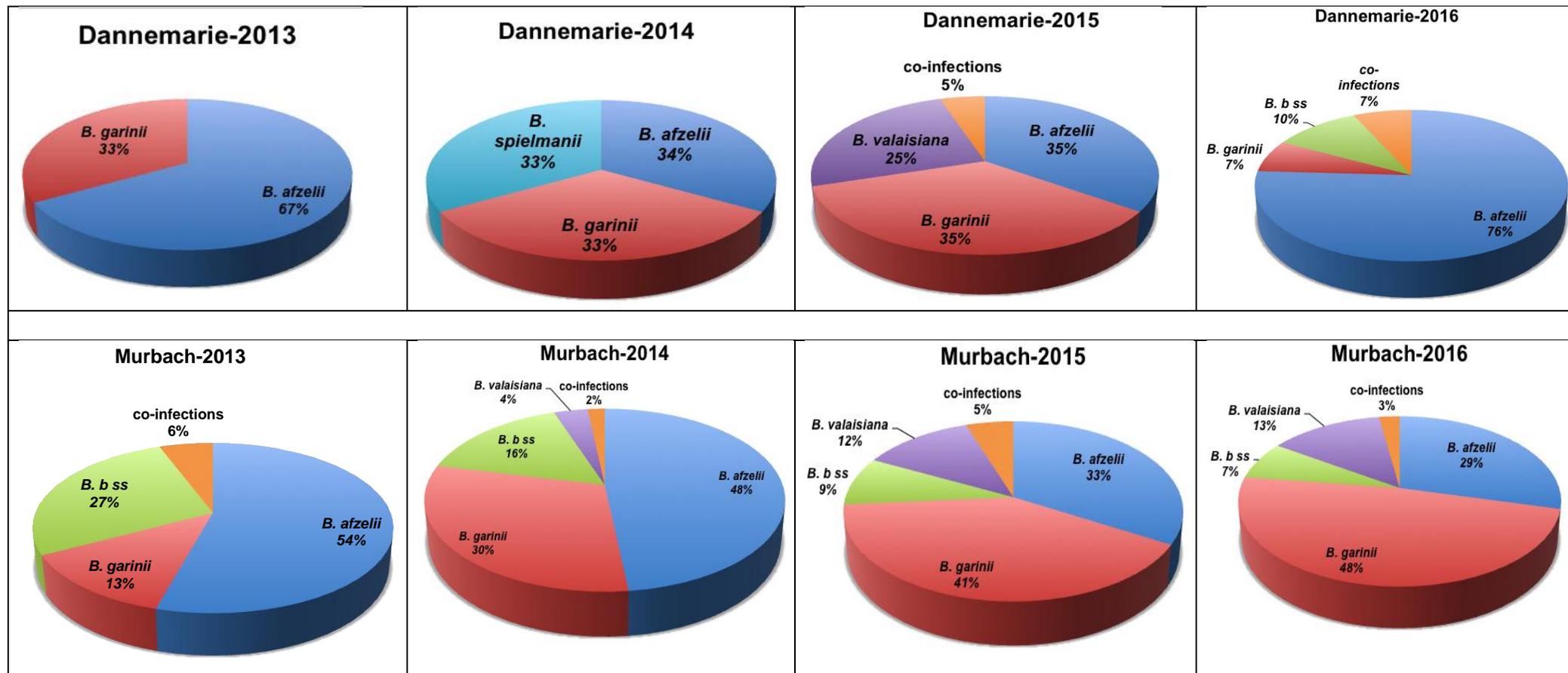


B. afzelii et *B. garinii* sont, sur les trois années, les principales espèces infectant les tiques.

Les co-infections à *Borrelia* sp se trouvent toujours très inférieures à 10 %. On constate que leur proportion peut varier très fortement. Ainsi, le pourcentage de co-infections est de 2,5 % en 2016 et de 7,4 % en 2013. En 2013, le taux de *B. garinii* a baissé fortement et ceci s'est accompagné d'une prévalence plus importante en *B. burgdorferi* ss et en co-infection.

Figure 30. Répartition des différentes espèces de *Borrelia burgdorferi* sl en fonction des sites de collecte de 2013 à 2016





La distribution des différentes espèces du complexe *B. burgdorferi* sl, on le voit dans la figure ci-dessus, est très variable d'un site à l'autre et d'une année sur l'autre. Le site de Niedermunster par exemple, ne présente que deux espèces en 2014 : *B. afzelii* et *B. garinii*. En 2015 et 2016, on observe des nymphes infectées par *B. burgdorferi* ss. Ceci peut être lié à la quantité en nymphes collectées cette année-là (n=177), beaucoup plus faible par rapport aux autres années. Pareillement, Dannemarie est le site pour lequel *B. spielmanii* a été mis en évidence (en 2014). Cette espèce n'a d'ailleurs pas été retrouvée sur ce site en 2015 et 2016

B. garinii et *B. afzelii* sont les espèces les plus prévalentes habituellement (cf Figure 29). Cependant à Murbach en 2013 ou à Dannemarie en 2016, ces espèces les répartitions sont respectivement de 13 % et 54% (Murbach) et de 7 et 74 % (Dannemarie).

Tableau XIX. Densités moyennes en nymphes infectées (données 2013-2014) des 13 sites collectés régulièrement

Site	Densité en nymphes infectées
Appenthal	3,5
Chêne Voltaire	0,5
Dannemarie	0
Daubensand	1,5
Firstplan	2
Illkirch	1,5
Murbach	9,5
Niedermunster	0,5
Petite Camargue	0
Portalès	1
Rimbach	1,5
Sattel	0,5
Wasserbourg	2,5

L'analyse de la distribution de ces densités moyennes en nymphes infectées, nous a permis, à l'aide des quartiles, d'établir trois classes de risque acarologique (cf Tableau XX) : le 1^{er} quartile est égal à 0,5 nymphe infectée par 100m², la médiane à 1,9 par 100 m² et le troisième quartile à 2 par 100m².

Tableau XX. Niveaux de risque acarologique (3 classes)

Site	Densité en nymphes infectées
Dannemarie	0
Petite Camargue	0
Chêne Voltaire	0,5
Niedermunster	0,5
Sattel	0,5
Portalès	1
Daubensand	1,5
Illkirch	1,5
Rimbach	1,5
Firstplan	2
Wasserbourg	2,5
Appenthal	3,5
Murbach	9,5

Légende

< 1
[1-2[
[2-∞[

Ainsi les quatre sites présentant un risque élevé de borréliose de Lyme au vu des données de 2013 et 2014 sont les sites suivants : Firstplan, Wasserbourg, Appenthal et Murbach. Ces quatre sites se situent dans les vallées de Munster ou Guebwiller, deux zones pour lesquels l'incidence de la borréliose de Lyme est élevée.

Les sites péri-urbains d' Illkirch et Pourtalès présentent aussi également un risque acarologique non négligeable.

(E) Données sur *A. phagocytophilum* :

Figure 31. Carte de répartition des prévalences en *A. phagocytophilum* de 2013 à 2016

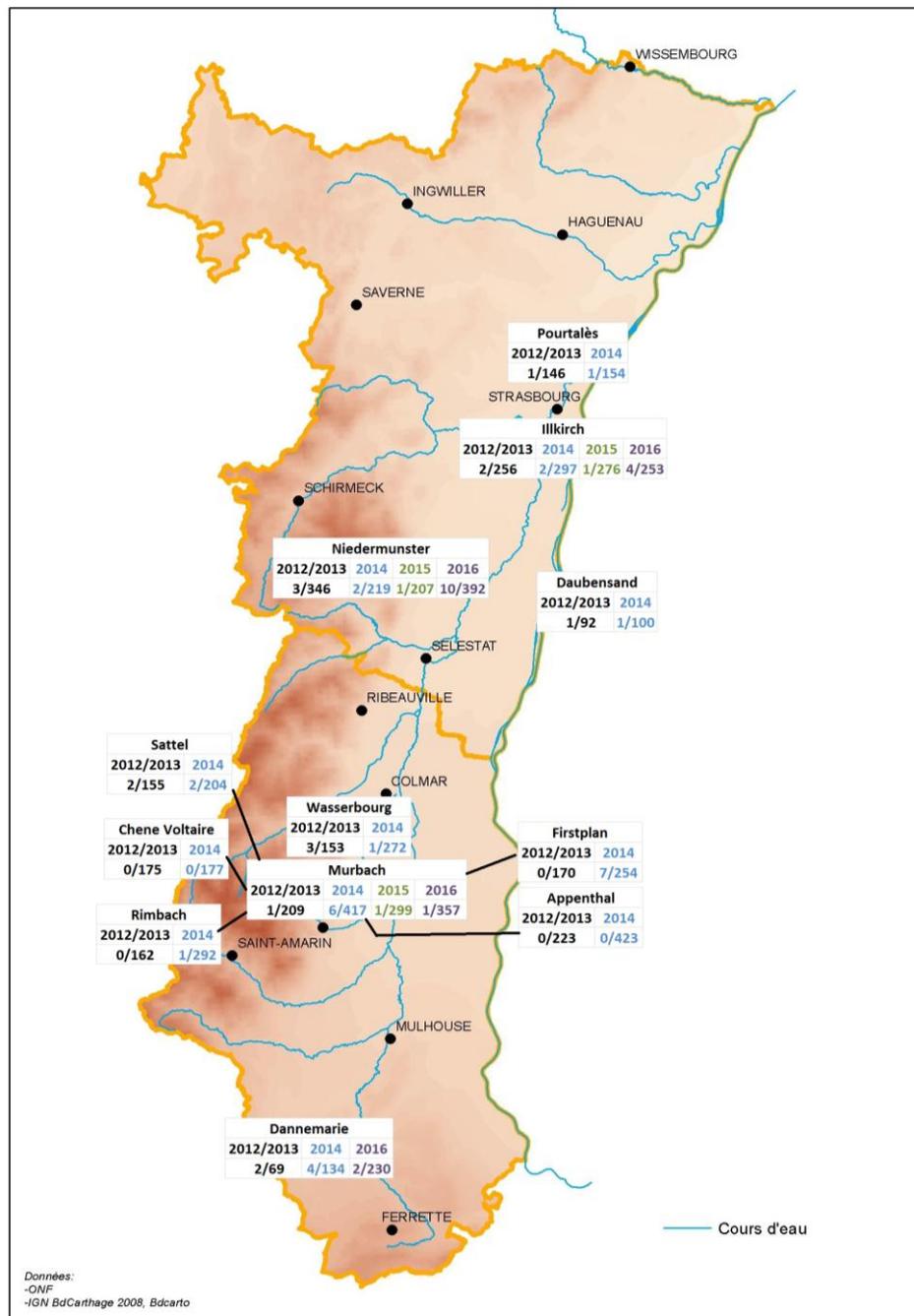


Tableau XXI. Prévalence d'*A. phagocytophilum* dans les nymphes en 2004 et de 2013 à 2016

Année	2004	2013	2014	2015	2016
Prévalence (% et intervalle de confiance à 95%)	0,4 [0,15-1,0]	0,94 [0,6-1,4]	1,1 [0,7-1,4]	0,36 [0,14-0,9]	1,4 [0,9-2,2]

On constate que la prévalence fluctue légèrement mais reste néanmoins toujours inférieure à 2%. Grâce à la carte ci-dessus, nous observons que cette densité n'est pas stable entre les sites. Par exemple à Murbach, les prévalences de 2012/2013 à 2016 sont respectivement de 0,5 % (2012/2013), 1,44% (2014), 0,33% (2015), 0,28% (2016). De façon identique à Illkirch, il est de 0,78% (2012/2013), 0,67% (2014), 0,36% (2015), 1,58% (2016). Dannemarie présente en 2012/2013 et 2014 des prévalences de 2,9 et 3 %. Celle-ci en 2016 tombe à 0,87 %.

Les variations observées pour *B. burgdorferi* si sont également constatées pour *A. phagocytophilum* : des taux d'infection très différents ainsi que des fluctuations inter-annuelle.

III) Discussion

Nous avons, grâce aux données collectées, définis pour chaque site son risque acarologique (faible, moyen ou fort).

Cette classification « statique » a été établie sur des données agrégées. Or il est établi qu'il existe de forte variation intra-annuelle de la densité en nymphes. En prenant comme exemple les densités en nymphes infectées pour les mois de mai et de juin 2013 (cf Annexe 4), il apparaît que notre classification est transposable pour certains mois de l'année. En effet, au moment du pic d'activité, les sites à faible risque (Dannemarie, Chêne Voltaire) conservent la même catégorie que celle établie via la densité en nymphes infectées moyenne. Il en est de même des sites à risque élevé (Murbach, Appenthal).

Cependant, selon le mois de collecte, certains sites peuvent voir leur catégorie modifiée et ceci de façon notable. Le site de la Petite Camargue devient ainsi un site à classer en site à risque acarologique élevé du fait de son résultat de densité en nymphes infectées de juin 2013 (17 nymphes infectées/100m²). Se pose donc la question de la valeur d'une telle classification « statique ». Doit-elle être modulée idéalement selon le mois de collecte pour devenir une classification « dynamique » ? Dès lors quelle est la pérennité d'une telle classification et de son utilité en pratique. Cette valeur seuil de 2 nymphes infectées par 100 m², est-elle un seuil correct et pérenne pour définir une fois pour toute, un risque acarologique élevé ?

En effet, dans l'hypothèse où il se produirait une augmentation générale de la quantité de tiques et/ou de la prévalence de *Borrelia* sur la région, nous devons potentiellement régulièrement changer les sites de catégorie et/ou réévaluer ce seuil.

Aux Etats-Unis, une telle catégorisation a également été élaborée. La classification générée a déterminé qu'une densité en nymphes infectées supérieure à 0,3 nymphes infectées par 1000 m² est associée à un risque acarologique élevé (Diuk-Wasser et al. 2012). De façon intéressante, nous nous ne retrouvons donc pas le même ordre de grandeur entre ces deux travaux.

En effet, ces travaux ayant été réalisés sur l'ensemble des Etats-Unis, un grand nombre de zones prélevées présentaient des densités en nymphes infectées nulles. A l'inverse, dans notre étude, un seul site présentait une faible population en tiques infectées (Dannemarie). Ainsi, d'une part, pour réellement comparer le travail américain au notre, l'ensemble de la France métropolitaine aurait du être inclus dans notre étude. Ceci aurait très probablement modifié les seuils établis dans celle-ci. D'autre part, dans le travail de Diuk-Wasser, un modèle prédictif de la densité en nymphes infectées a été élaboré à partir de variables abiotiques : l'altitude, la texture du sol, déficit de saturation en eau dans l'air, etc... et *in fine*, les seuils ont été choisis au travers d'une analyse de sensibilité et de spécificité.

Pour se rapprocher de ce type d'étude, la continuité logique de notre travail serait d'élargir la zone d'investigation. Plusieurs sites sélectionnés de façon aléatoire dans toute la France pourraient donc faire l'objet d'un protocole de collecte et d'analyse identique à celui réalisé pour notre étude en Alsace. L'analyse des taux d'infection par *B. burgdorferi* s1 dans les tiques ainsi que l'étude de sensibilité et de spécificités des seuils choisis serait aussi à inclure pour, *in fine*, produire un modèle prédictif, tel celui élaboré par Diuk-Wasser et coll., sur l'ensemble du territoire.

En France à notre connaissance, aucune classification de la sorte n'a été établie en France à ce jour. Cependant, nous pouvons comparer nos résultats à ceux obtenus par Vourc'h et coll. dans un travail publié en 2016. Dans cette étude réalisée dans la forêt de Sénart (22 km au Sud-Est de Paris), une densité moyenne en nymphes infectées de 5,9 nymphes par 100 m² avait été mise en évidence lors d'une campagne de collectes réalisées en 2011 durant le mois de mai (Vourc'h et al. 2016). Un maximum de 9 nymphes infectées par 100 m² a été également observé. Ce résultat est identique à la densité en nymphes infectées moyenne de Murbach en 2016.

Discussion et perspectives

En Alsace, région française endémique pour la borréliose de Lyme, les études de terrain menées en 2003/2004 et 2013/2014 ont montré que les densités en nymphes et les taux d'infection à *Borrelia burgdorferi* sl et à *A. phagocytophilum* n'ont pas évolué en dix ans. Sur certains sites, les densités en nymphes, notamment en 2004 sont même retrouvées supérieures à celles de 2013 ou 2014. De même, la prévalence de *B. burgdorferi* sl ne montre pas d'accroissement sur dix ans : pour l'ensemble des sites, les prévalences en 2004 sont supérieures à 2013 ou 2014.

Nous pouvons donc objectiver qu'il n'y a pas de tendance à l'augmentation de la densité en nymphes sur des sites déjà connus comme colonisés par *I. ricinus* sur les dix dernières années- de ce fait, notre étude répond à cette première interrogation.

L'abondance relative en tiques entre les sites de collecte est respectée entre les dix années d'étude : le site avec la plus faible densité en nymphes conserve son rang- de même pour le site le plus colonisé (Murbach). La densité en nymphes à Dannemarie était déjà établie comme faible en 2003/2004. De ce fait, dans l'hypothèse où les populations en tiques avaient augmenté au cours des dix dernières années, nous pouvions donc nous attendre à ce que sur ce site, la densité en nymphes observée en 2013/2014 soit significativement supérieure à celle d'il y a dix ans. Nous n'avons pas constaté une telle variation.

A la lumière de ces constats, nous devons aussi mettre en perspective que des facteurs comme le changement climatique, la population en cervidés et en micromammifères, les pratiques de sylvicultures, la gestion des surfaces agricoles ont un impact sur les populations en tiques ; l'ensemble de ces éléments étant maintenant connus comme facteurs de l'expansion des tiques. Il est alors très probable que des zones jusqu'à lors tout à fait exemptes de tiques deviennent, par exemple par modification des pratiques de sylviculture, des niches écologiques pour elles.

(A) L'expansion des tiques

1) Le facteur climatique

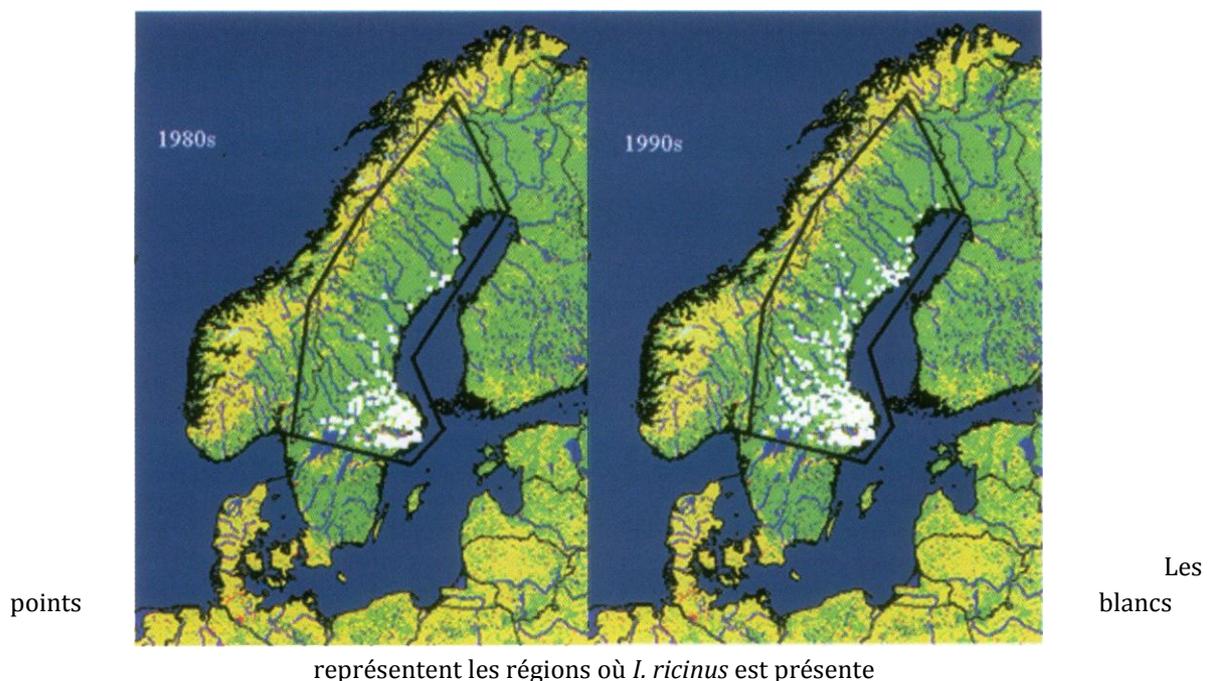
L'intrication des éléments d'une niche écologique et les répercussions de leurs modifications sur l'évolution d'un écosystème est difficilement prévisible (Estrada-Peña 2008).

Un des éléments de cette niche écologique est le climat. Le changement climatique est souvent invoqué comme élément inducteur de l'expansion des populations de tiques. Des constats de l'extension spatiale des tiques sous l'influence du climat ont déjà été établis dans certaines régions du globe. C'est le cas par exemple en Suède et au Canada (Jaenson et al. 2012; Simon et al. 2014).

Ainsi, en Suède, en considérant une période allant de 1980 à 1990, de nouvelles aires vers le Nord ont été colonisées par les tiques et à une même latitude, des aires plus froides situées à l'intérieur des terres sont maintenant colonisées par *I. ricinus*. Au Canada, le nombre de zones endémiques a augmenté depuis 1997 : les zones

d'implantation se sont étendues à l'Est et au centre du pays (Ogden et al. 2009). Les tiques semblent donc généralement coloniser des aires géographiquement plus au Nord ou des zones à des altitudes supérieures à celles répertoriées jusqu'à présent (Lindgren et al. 2000; Simon et al. 2014). Sont en causes des hivers plus doux et des migrations d'animaux-hôtes pour les tiques (par exemple oiseaux et souris à pattes blanches *Peromyscus leucopus* pour *I. ricinus* (Ogden et al. 2008; Simon et al. 2014)). (Figure 32) Jore et coll. dans leur étude en Norvège mettent aussi en évidence ces facteurs environnementaux et ajoutent également que l'augmentation des zones de brousse est un facteur d'expansion de la population en tiques (Jore et al. 2011)

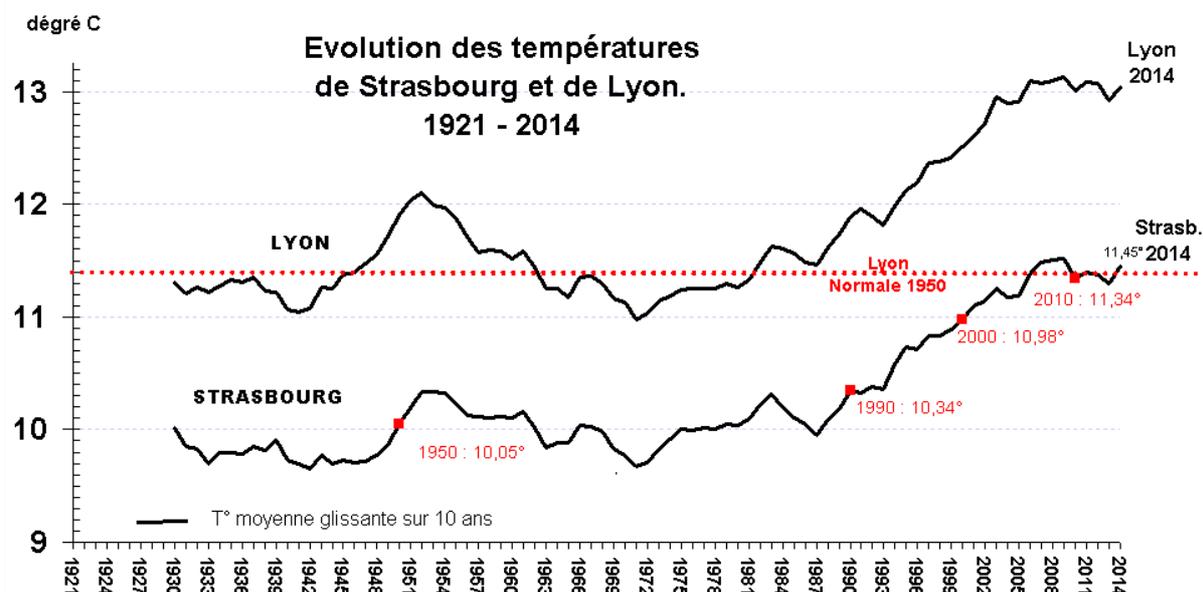
Figure 32. Cartographie de la présence des tiques en Suède en 1980 et 1990.
(Lindgren et al. 2000)



Nous avons objectivé qu'il n'y a pas de tendance à l'augmentation de la densité en nymphes sur des sites déjà connus comme colonisés par *I. ricinus* sur les dix dernières années au travers de l'étude entre 2003/2004 et 2013/2014 ; ceci étant par ailleurs confirmé par les données très récentes de 2015 et 2016, grâce auxquelles nous objectivons la persistance de la non-tendance à l'augmentation. (Figure 33).

Parallèlement les données de température issues des relevés de MétéoFrance® (cf Figure 33) ci-dessous) montrent effectivement une montée importante des températures depuis 1950. Une augmentation est bien retrouvée entre 2003 et 2014.

Figure 33. Evolution des moyennes mobiles de Strasbourg et de Lyon (Hauss 2015)



Nous constatons donc que l'augmentation des températures est effective.

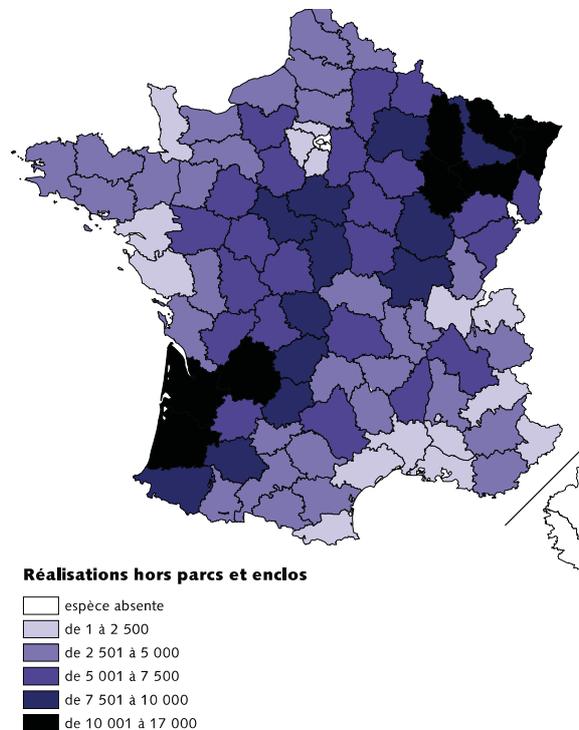
Ces constats (absence de tendance à l'augmentation de façon globale et sur chaque site) invitent à se poser la question de l'impact du changement climatique dans notre région. Celui-ci paraît pour l'instant, inexistant au regard de nos observations de terrain.

A l'instar des températures, des variations au niveau des facteurs biotiques sont aussi des éléments importants puisqu'elles dirigent la présence et l'importance des populations de tiques. Ces facteurs sont les populations en hôtes : cervidés et micromammifères et le management du territoire.

2) Les facteurs biotiques

Pour notre département d'étude principal, le Haut-Rhin, les données de populations de daims, cerfs élaphe et chevreuils montre que les prélèvements en cervidés depuis 2003 ont peu évolué (cf Figure 34). Ces données issues de l'Office National pour la Chasse et la Faune Sauvage (ONCFS) reflètent l'activité de prélèvements en cervidés effectués. (Figure 34 et 35)

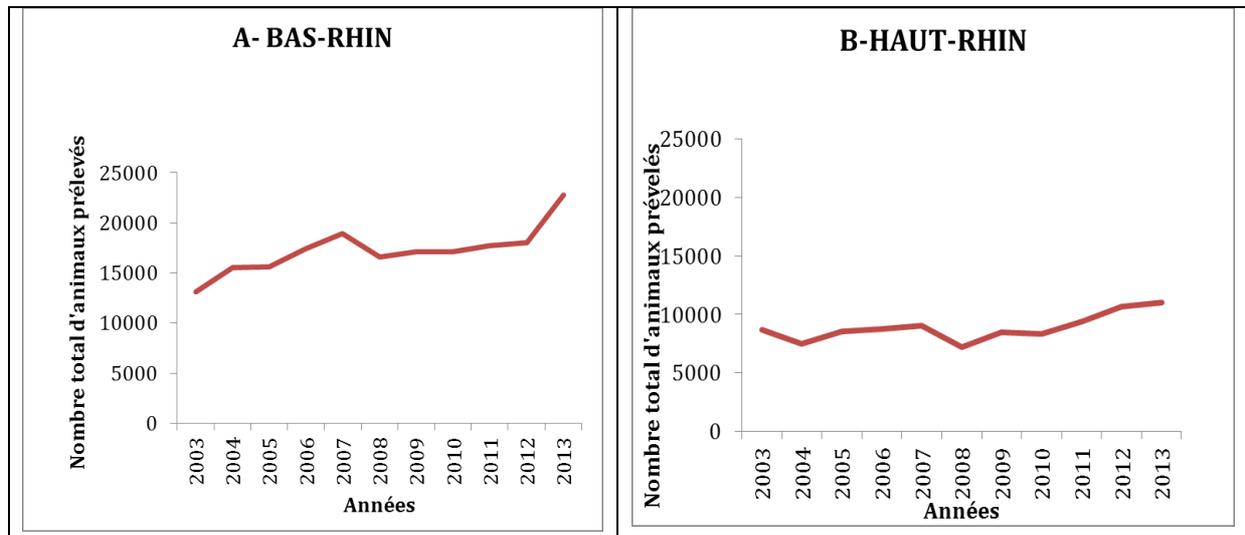
Figure 34. Tableau de chasses départementales des chevreuils en 2008 et 2009.



La gestion des cervidés se réalise au travers de plans de chasse définis au niveau régional ou départemental. Les objectifs de gestion prennent en compte la notion d'équilibre qui doit exister entre les populations de cervidés et leur habitat. Les évaluations des effectifs des populations se font en amont de la décision de plan de chasse. Pour évaluer ces effectifs, l'ONCFS utilise des indicateurs dits ICE (Indicateurs de Changement Ecologique*).

L'effectif de chevreuils au niveau national évalué est de l'ordre de 1 500 000 têtes, soit environ une progression de 3,2% au cours des vingt dernières années. Les populations les plus abondantes se situent dans le quart Nord-Est du territoire (Bas-Rhin, Moselle, Meuse, Haute Marne, Vosges) d'après le réseau des correspondants chevreuils-sangliers 2010. L'augmentation des populations a été significative dans tous les départements. Cependant, une tendance à la saturation est observée dans certains d'entre eux : la Lorraine, certains départements de la Franche-Comté et le sud de la France (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage 2016).

Figure 35. Prélèvement en cerfs élaphe, daim et chevreuil dans deux départements alsaciens entre 2003 et 2013 (Données ONCFS)



Les régions que nous avons investiguées sont donc des zones particulièrement pourvues en faune sauvage de type cervidés. L'évolution des populations de cervidés (1990-2010) n'a donc probablement pas impacté la densité en nymphes ou la prévalence de *Borrelia* sp chez les tiques sur les dix dernières années. De plus, la saturation de la population des cervidés, si celle-ci restait telle quelle, pourrait être un facteur de diminution du risque de borréliose de Lyme, par l'effet de dilution du pathogène qui est associé à la population en cervidés (Mannelli et al. 2011)

Concernant les micromammifères, les principales espèces animales impliquées en Europe dans le cycle de la maladie de Lyme sont : *Microtus arvalis* (le Campagnol des champs), *Apodemus uralensis* (le Mulot pygmée), *A. sylvaticus* (le Mulot sylvestre) (L'Hostis et al. 1996). Nous n'avons, à l'heure actuelle, pas de données précises sur les populations de micromammifères en France et sur leur évolution ces dernières années. Acquérir des données sur ces populations qui influencent la densité en tiques permettrait d'une part d'évaluer l'impact de cette variable et d'autre part d'apporter un élément supplémentaire dans la compréhension des variations des densités en nymphes (Randolph et al. 2002).

D'autres éléments sont aussi invoqués dans une potentielle extension des populations de tiques, celle-ci étant par ailleurs ressentie par le public (Medlock et al. 2013).

Une extension des zones forestières -propices à l'établissement des tiques par rapport aux prairies- ou d'autres aménagements du territoire ont pu être à l'origine de cette augmentation perçue ou réelle (Ostfeld and Brunner 2015). Ainsi, la forêt s'est étendue depuis le milieu du XIX^{ème} siècle et les pratiques de sylviculture ont évolué (Office National des Forêts 2016). Par exemple, la gestion de la forêt n'inclut plus

seulement la visée économique et productiviste. Elle intègre aussi, depuis 1970, des dimensions écologiques, territoriales et sociales (Boutefeu 2005). Ainsi, les aménagements forestiers* de type taillis* laissent progressivement la place aux futaies* ou aux taillis sous futaie. Or, les futaies sont des territoires plus favorables aux micromammifères que ne le sont les taillis car ils génèrent une production régulière de graines (Pucek et al. 1993; Rizzoli et al. 2009). La culture de la forêt selon un mode « futaie » serait donc un élément possiblement pourvoyeur de modifications à effet ascendant de l'incidence de la borréliose de Lyme comme cela serait le cas pour l'encéphalite à tique (Rizzoli et al. 2009).

De plus, l'artificialisation des sols* qui est en progression depuis 1960 s'est accompagné d'une augmentation du « mitage » c'est à dire des interfaces entre la forêt et les habitations (Laugier 2012; Girard 2017). Les Hommes se rapprochent donc plus de la forêt ce qui implique l'augmentation des contacts Homme-forêt qui sont à même de favoriser directement le risque de borréliose de Lyme.

Nous l'avons vu d'autres micro-organismes sont aussi présents dans les tiques. De plus, il est aujourd'hui probable que les tiques portent parmi ceux-ci certains de microorganismes non pathogènes pour l'Homme. Ces aspects font aussi l'objet de recherche.

(B) Les autres maladies liées aux tiques :

Certains microorganismes présents dans les tiques *Ixodes sp* sont connus comme pathogènes : *Borrelia burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *B. miyamotoi*, *Candidatus N. mikurensis*, *Rickettsia spp.*, *Babesia spp.* Avant 1990, les microorganismes trouvés dans les tiques étaient considérés comme des pathogènes sans qu'une réelle évaluation du risque infectieux pour l'Homme appuie ces hypothèses. Depuis la fin des années 1990, les connaissances en biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence que des germes intracellulaires tels des *Coxiella*- like et des *Francisella*-like, présents dans les *Dermacentor spp.* étaient non pathogènes (endosymbiontes)(Bonnet et al. 2017).

Pour *Ixodes ricinus*, les endosymbiontes reconnus sont *Arsenophorus*, *Midichloria* et *Coxiella*. Ils peuvent d'ailleurs présenter une transmission horizontale c'est-à-dire infectieuse. Une *Coxiella*-like, *Candidatus C. massiliensis*, a été mise en évidence comme ayant causé des signes cliniques subaigus chez des patients européens (Angelakis et al. 2016).

Nous l'avons évoqué, hormis *B. burgdorferi* sl, d'autres micro-organismes sont transmissibles par *I. ricinus* dans notre région. Parmi eux, un pathogène a fait l'objet d'un suivi par le CNR: *Anaplasma phagocytophilum*.

Les taux d'infection des nymphes d'*I. ricinus* par *A. phagocytophilum* n'ont pas montré d'évolution entre 2004, 2013, 2014, 2015 et 2016 (cf Article n°1 et Tableau XXI).

Il a par ailleurs aussi été rapporté dans des études datant de la fin des années 1990 que la prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les tiques *I. ricinus* en France était de 1,25 % (Blanco and Oteo 2012). Avec ces études de prévalences répétées, nous pouvons observer que le taux d'infection chez les tiques restent donc relativement stable au fil des ans.

Du point de vue de l'épidémiologie humaine, l'anaplasmose granulocytaire humaine est considérée comme une pathologie émergente du fait de sa découverte récente. Edouard et coll. en 2012, montre qu'en vingt ans, le nombre de cas rapportés d'anaplasmoses granulocytaires humaines a régulièrement augmenté (Edouard et al. 2012). Très localement, les résultats de l'étude Alsa(ce)tique*- étude en réseau, organisée par la Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie de l'Est - montre que dans la période allant du 1^{er} janvier 2014 au 31 décembre 2015, 3 cas d'anaplasmoses granulocytaires humaines ont été biologiquement confirmés (Santé Publique France 2017). Les données semblent donc rester stable par rapport aux précédentes études précédentes (Koebel et al. 2012)

Dans d'autres pays, comme aux Etats-Unis, une augmentation des cas d'anaplasmoses a été rapportée. Pour cette maladie à déclaration obligatoire depuis 1999, l'incidence a été multipliée par 4, passant de 1,6 cas à 6,1 cas par million d'habitants en 2010 (Center for Disease Control 2016). De plus, d'après Stuen et coll. la France et la Hongrie possèdent les prévalences d' *A. phagocytophilum* dans les tiques les plus bas d'Europe- le taux le plus élevé (33,9 % chez des *I. ricinus* adultes) ayant été montré en Bulgarie.

L'absence de variation dans l'incidence des cas d'anaplasmoses en Alsace en dix ans ainsi que la stabilité des taux d'infection dans les tiques montre également que le risque lié à cette autre maladie liée aux tiques est resté stable depuis quelques années.

Nos travaux se sont bordés à l'étude de ces deux pathogènes connus dans les tiques : *A. phagocytophilum* et *B. burgdorferi*. Cependant, d'autres pathogènes émergents tels *Borrelia miyamotoi*, *Rickettsia* spp., *Candidatus Neorhlichia mikurensis* font l'objet d'études récentes.

Parmi ceux-ci, le CNR des *Borrelia* a évalué la prévalence de *B. miyamotoi* dans les nymphes. *B. miyamotoi*, comme les autres maladies liées aux tiques (borréliose de Lyme, babésiose, anaplasmose granulocytaire humaine), provoque chez les patients de la fièvre > 38°C avec possiblement des maux de têtes, des frissons, des myalgies, des arthralgies ou de la fatigue (Telford et al. 2015). Le CNR des *Borrelia* rapporte un taux de 1,9 %-il est par ailleurs par exemple de 0,51 % chez les nymphes en Finlande (Sormunen et al. 2016). A l'inverse d'*A. phagocytophilum*, où des cas ont été rapportés en Alsace, aucun cas de fièvre récurrente autochtone n'a été à ce jour constaté dans la région jusqu'à maintenant (données du rapport CNR *Borrelia* 2016).

Ainsi, l'éventail des bactéries (mais aussi des virus et des parasites) pour lesquelles des investigations, au niveau vectoriel ou humain, sont réalisés, s'élargit. L'impact humain des infections autres que *Borrelia* dans les tiques, et des co-infections

quelle qu'elles soient et leur potentiel de pathogénicité, doit continuer d'être évalué car seules quelques données sur les cas humains de co-infections existent à ce jour (Krause et al. 1996; Swanson et al. 2006).

(C) La santé publique et la prévention de la maladie de Lyme : l'évaluation du risque, ses perspectives, ses limites :

1) L'évaluation du risque

L'évaluation des risques consiste à définir et évaluer chaque étape d'une trajectoire depuis les causes d'un danger jusqu'aux conséquences pour un système donné (OCDE : Organisation de Coopération et de Développement économiques, 2003).

Dans le cas de la borréliose de Lyme, le risque de contracter la maladie est lié à la probabilité d'être piqué par une tique infectante. Cette probabilité dépend notamment de l'abondance, du taux d'infection du vecteur, des différents types de comportement humain (pénétration et fréquence de visites des foyers d'infection, vitesse et efficacité du retrait de tique) ainsi que de la sensibilité interindividuelle au pathogène.

La tique dure *I. ricinus* passe la majeure partie de sa vie hors phase parasitaire et les conditions extérieures influent beaucoup sur sa survie (Pfäffle et al. 2013). Identifier des facteurs associés à une plus forte abondance en nymphes est nécessaire afin de connaître les niches écologiques favorables à l'établissement des tiques et, de ce fait, de pouvoir estimer *a priori* la probabilité d'infestation d'un site par les tiques. *In fine*, l'intérêt est de prévenir la population du risque encouru. Dans notre travail, nous avons évalué divers paramètres tels le type de forêt, la température, l'hygrométrie, l'altitude, le type de litière*.

Nous avons observé l'existence d'une variabilité inter-site au sein d'une zone d'endémicité comme l'Alsace. Nous avons pu au travers de notre étude mettre en évidence que le type d'humus (élément peu investigué jusqu'à lors dans la littérature) est un facteur important à prendre en compte. Un humus possédant plusieurs couches de feuilles dont une de feuilles fragmentées serait un élément favorable à une plus forte population en nymphes puisque pourvoyeur d'humidité, de protection contre l'ensoleillement et contre la chaleur.

Notre démarche d'éco-épidémiologie et d'évaluation du risque est un premier aperçu au regard de ce qui peut être fait dans le domaine. Ainsi, aux Etats-Unis ou aux Pays-Bas, le « risk mapping » est bien plus avancé qu'en France (Diuk-Wasser et al. 2010; Pepin et al. 2012; Swart et al. 2014). Le « risk mapping » ou « cartographie du risque » consiste à construire une carte illustrant la distribution spatiale des densités en tiques. Cela permet ainsi de découper le territoire en zones à risque de borréliose de Lyme (Figure 31). Ces cartes sont des outils utiles en santé publique pour mieux cibler la

surveillance et la prévention dans les zones à haut risque. Elles sont le fruit d'un travail de modélisation qui utilise des systèmes d'information géographique (Global Information System, GIS). Les paramètres sélectionnés dans ces modèles sont variés : indice de fragmentation du paysage (Diuk-Wasser et al. 2012), déficit de saturation en eau dans l'air (Gatewood et al. 2009), Normalized Vegetation Difference Index (NVDI) (Hai et al. 2014), humidité du sol ou population en cervidés pour Swart et coll. (Swart et al. 2014).

Swart et coll. ont élaboré pour les Pays-Bas une carte de risque basée sur un modèle prédictif de la présence ou de l'absence des tiques. L'auteur a utilisé des données satellitaires comme l'EVI (Enhanced Vegetation Index= index de végétation amélioré) qui est un indicateur de la densité en végétation, ainsi que les températures moyennes à la surface le jour et la nuit.

Figure 36. Carte de risque de borréliose de Lyme pour la partie Est des Etats-Unis (Diuk-Wasser et al. 2012)

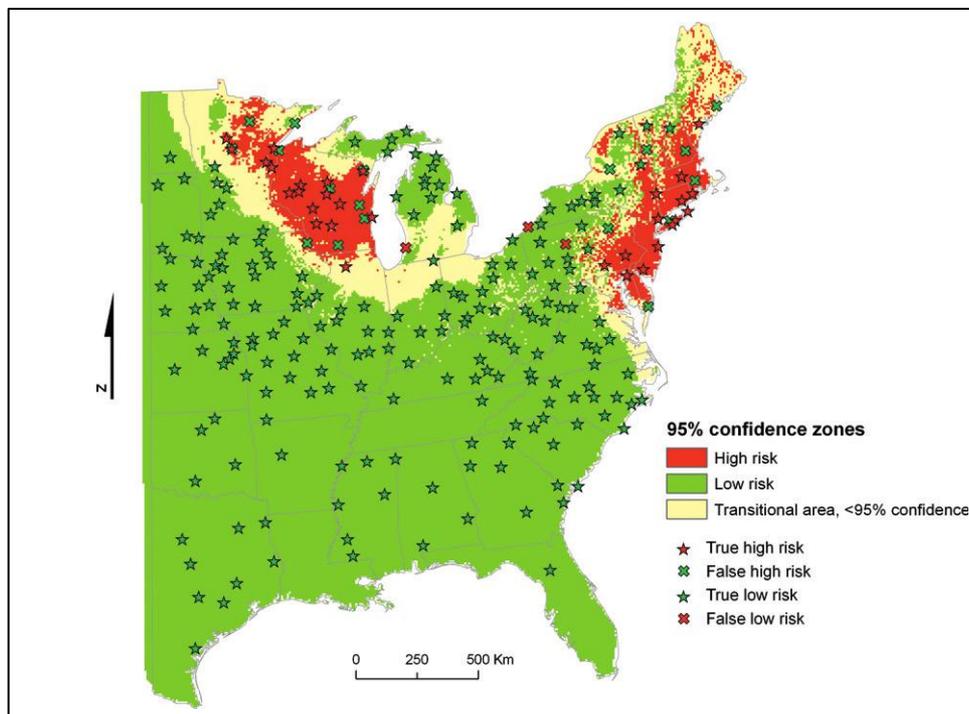
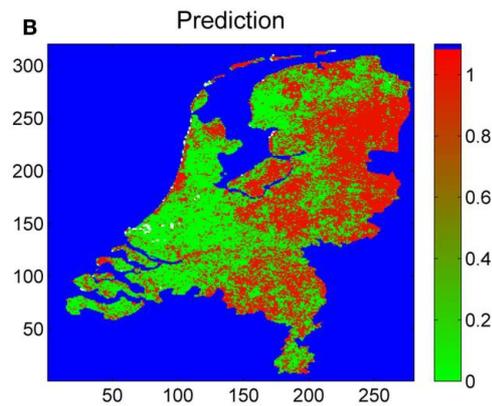


Figure 37. Carte de présence des tiques aux Pays-Bas (Swart et al. 2014)



2) Les limites

Tout en voulant se rapprocher des travaux de « risk mapping » réalisés aux Etats-Unis ou aux Pays-Bas, il est essentiel de rester critique sur la puissance de tel modèle et sur l'efficacité de telles cartes. En effet, comme l'indique Killilea en 2008, en ne considérant que les résultats les plus robustes des études éco-épidémiologiques, seule la forêt montre un risque entomologique élevé comparée aux autres types d'habitats. Ce qui semble insuffisamment précis au regard des observations de terrain (Killilea et al. 2008). Comme l'expose Killilea, ceci est sans doute dû à la très grande hétérogénéité des études réalisées sur le sujet. Ainsi, l'auteur a comparé les travaux relatifs à la mise en évidence des relations entre la présence d'*I. scapularis* et des facteurs biotiques ou abiotiques. Il ressort de l'étude que les méthodologies sont très différentes.

D'une part les méthodes de collectes de tiques peuvent varier (collecte au drapeau ou sur animaux), variables testées et échelles de résolution différentes; ainsi la mise en évidence de la présence de cervidés a été mesurée au moyen du compte en excréments le long d'un transect de 305 m (Rand et al. 2003) ou par preuve du passage de cervidés (coulée ou autre) (Tälleklint-Eisen and Lane 2009). D'autre part, les auteurs peuvent choisir de se focaliser sur une seule des stases (nymphe ou adulte).

De ce fait, le peu ou l'absence de concordance entre les études nous suggère que les relations entre le risque de maladie de Lyme et les facteurs biotiques et abiotiques sont encore insuffisamment comprises (Killilea et al. 2008). Ces travaux sont donc délicats à réaliser et doivent être interprétés avec modestie.

La biologie des tiques reste complexe et les caractéristiques de leur habitat le sont encore davantage. On ne peut alors, d'autant plus à juste titre, prétendre établir un modèle probabiliste qui se voudrait universel. En effet, occulter l'hypothèse de l'adaptation au niveau local des populations de tiques serait une erreur, car il est possible d'observer une présence de tique là où on ne la prédisait pas (Estrada-Peña et al. 2013b). Ainsi, la plasticité phénotypique* est une réponse adaptative induite par des nouveaux éléments environnementaux provoquant une pression de sélection. Celle-ci

est à même de faciliter la divergence des lignées d'une même espèce du point de vue de la morphologie, de la physiologie, du comportement (Price et al. 2003). Une population de tiques appartenant à une même espèce peut, par exemple, s'adapter et persister dans des habitats plus chauds et plus secs, probablement par modification de la couche externe des glucides de la tique qui la protège de la perte d'eau (Estrada-Peña et al. 1994). La tique peut donc investir des lieux où, *a priori*, sa présence aurait été initialement compromise.

Des études ont été menées sur cette plasticité phénotypique* d'*Ixodes ricinus* vis à vis des variations de températures (Gilbert et al. 2014; Tomkins et al. 2014). Il en ressort que des tiques provenant de zones à climats différents ont des activités de quête* d'hôte différentes. Ainsi des *I. ricinus* provenant de zones froides ont une activité de quête d'hôte qui se réalise plus volontiers à des températures plus froides comparées aux *I. ricinus* prélevées dans une zone à climat plus chaud.

Un autre élément modifiant le comportement de quête d'hôte est l'infection à *B. burgdorferi* sl. En effet, les tiques infectées résistent mieux au froid et à la dessiccation et ont un comportement de quête d'hôte plus actif (Faulde and Robbins 2008; Herrmann and Gern 2015).

Des adaptations au niveau local étant mises en évidence, la cartographie des risques reste donc difficile à produire et potentiellement inadaptée. Du moins l'extrapolation au delà d'une région où elle est établie semble plus délicate. Les principales mesures à mettre en place pour éviter le risque de borréliose de Lyme et de maladie liée aux tiques en général, semblent donc être la prévention et la communication au grand public autour de la prévention individuelle (habillement adéquat, auto-examen, répulsifs, imprégnation vestimentaire).

La maladie de Lyme est actuellement le représentant le plus médiatisé en terme de santé publique dans le domaine des maladies liées aux tiques au sein des différents pays de l'Hémisphère Nord. De ce fait, les pouvoirs publics ont mis ou mettent en place des stratégies permettant de maîtriser et de mieux connaître cette maladie. Le plan national de lutte contre la maladie de Lyme en France (2016) est l'exemple que nous avons tout naturellement choisi d'exposer (Ministère des Solidarités et de la Santé 2017).

(D) Les stratégies de maîtrise de la borréliose de Lyme et des maladies liées aux tiques :

Parmi les mesures permettant la prévention des maladies à tiques, voici quelques unes qui ont été choisies au niveau national (Ministère des Solidarités et de la Santé 2017) :

- Développer une application mobile pour recueillir le signalement par les piqûres de tiques. Elle s'appelle Vigi-Tique et permet d'indiquer l'endroit et le moment où une personne ou un animal s'est fait piquer. Une rétro-information par carte consultable sur le site web (lancé en même temps que l'application) sera disponible : 3 000 déclarations ont déjà été faites depuis sa mise en place au début de l'été 2017.
- Mesure d'information des promeneurs à l'orée des bois (panneau indiquant la présence des tiques). 2000 panneaux d'information ont déjà été installés à l'orée des forêts domaniales par les agents de l'ONF (Figure 37 et Annexe 6).
- Diffusion de supports d'informations (affiche, dépliants, ...)
- Deux centres spécialisés dans la prise en charge des maladies liées aux tiques sont mis en place dans le Grand-Est.
- L'élaboration d'un protocole national de diagnostic et de soins est en cours.

Certains sites appartenant à notre étude (comme le site de Murbach et le site d'Illkirch) ont été équipés ces dernières années de panneaux d'information au vu du risque de borréliose de Lyme qui leur est associé.

Figure 38. Carte de déploiement des panneaux d'information en Alsace (Mutualité Sociale Agricole)

Installations panneaux sur le territoire alsacien

gare aux tiques

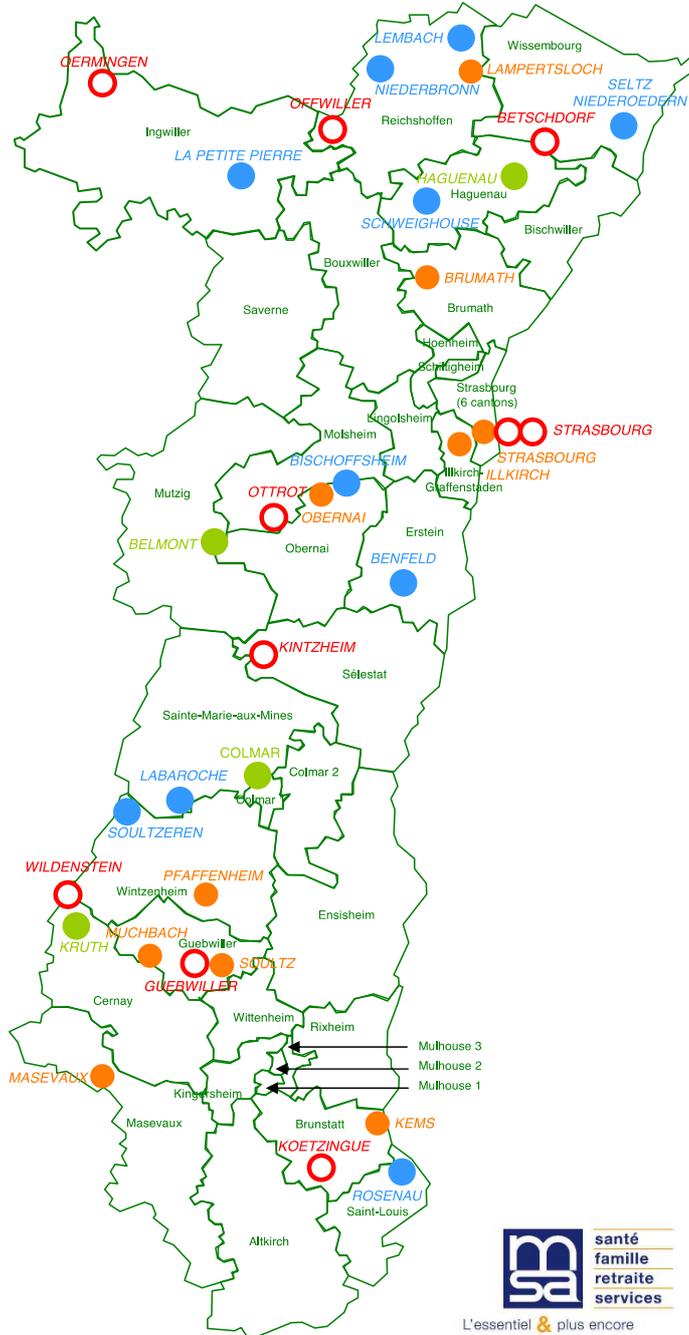
action contre la tique et les maladies qu'elle transmet

Les tiques peuvent transmettre des maladies parfois graves (borreliose de Lyme ou maladie de Lyme, méningo-encéphalite à tique...).
 Les tiques vivent dans les haies, bords, prairies et surtout dans les jardins.
 Elles piquent l'homme et l'animal pour se nourrir de son sang. Lors de ce repas sanguin, elles peuvent transmettre une maladie.
 Postes dans la végétation, les tiques se accrochent aux vêtements ou à la peau lors du passage de l'homme.
 Elles s'installent de préférence dans des zones humides que ce soit des gazon, pi de foin, aiselles, nortoirs.
 Le risque de piqûre est particulièrement important de printemps à l'automne.

Pour diminuer le risque de piqûre et de contamination, il est impératif au retour d'une promenade de s'inspecter minutieusement le corps entier, cuir chevelu compris et de retirer la tique.
 Pour retirer la tique, le saisir le plus près possible de la peau et tourner doucement toujours dans le même sens. Ce geste sera facilité par l'utilisation d'un tire tique. Prenez le soin de désinfecter.
 Surveillez la zone de piqûre dans les jours qui suivent.
 En cas d'apparition d'une rougeur, ou si vous constatez une modification de votre état de santé (fatigue anormale, maux de tête, fièvre, douleurs articulaires...), consultez votre médecin et pensez à lui signaler qu'il y a eu piqûre de tique.

La piqûre de la tique est indolore.
Accus produit répulsif contre les tiques n'est efficace à 100%.
Les vêtements n'empêchent pas la tique de se faufiler sous le tissu.
Vous trouvez un tire tique en pharmacie et en parapharmacie.

- 2011 : 4 Panneaux
- 2015 : + 10 Panneaux
- 2016 : + 10 Panneaux
- 2017 : + 10 Panneaux



MSA d'Alsace / PS / 11-2015

msa santé
famille
retraite
services
L'essentiel & plus encore

Conclusion

A travers nos études de terrain, nous avons pu établir dans notre région d'investigation, l'Alsace, un bulletin d'épidémiologie sur deux pathogènes transmis par les tiques *B. burgdorferi* sl et *A. phagocytophilum* et nous avons pu mettre en évidence que l'évolution des densités en nymphes sur un territoire déjà colonisé n'a pas montré d'augmentation sur un pas de temps d'une dizaine d'années. Pareillement, le taux d'infection à *Borrelia burgdorferi* sl a présenté un léger pic en 2004, mais aucune tendance à l'augmentation de ces taux d'infection n'a été objectivée sur la période d'étude.

Deuxièmement, notre étude sur les facteurs environnementaux prédictifs des densités en nymphes nous a montré que, parmi les facteurs « classiques » tels le déficit de saturation en eau dans l'air, le type d'humus est une variable importante pour l'estimation de l'abondance des tiques sur un lieu. Il apparaît que la structure de la litière de type « moder » - c'est à dire avec une couche de feuilles fragmentées - est un habitat vraisemblablement très favorable à la présence, et donc, à la survie des tiques. Selon nos hypothèses, ce type d'humus serait à la fois un pourvoyeur efficace d'humidité et une protection notable contre le froid en hiver. Aussi, d'autres aspects relatifs à des compétitions entre espèces pourraient expliquer les fortes densités en tiques dans ces types d'humus.

Il nous paraît donc intéressant de confirmer ces hypothèses dans d'autres régions de France voire même d'Europe.

Nos investigations nous ont aussi permis d'évaluer globalement le risque de borréliose de Lyme sur un panel représentatif de sites fréquentés par le public (en zone péri-urbaine ou rurale). Il est apparu que certains sites sont particulièrement sensibles et de façon constante : le site de Murbach- dans la vallée de Guebwiller, où l'incidence de la borréliose de Lyme est forte- ainsi que le site d'Illkirch, situé à proximité de la plus grande agglomération d'Alsace. Il semble donc pertinent dans la logique du Plan National de Lutte contre la maladie de Lyme, de faire bénéficier à ces deux sites au moins, d'un panneau d'information comme cela est déjà prévu dans le plan.

Borrelia burgdorferi sl et dans une moindre mesure *A. phagocytophilum* ont fait l'objet de ce travail de thèse. Au delà de ces deux pathogènes transmis par les tiques, il semble aussi utile d'élargir le champ des investigations à d'autres pathogènes.

En effet, au regard des nouvelles inquiétudes que peuvent poser des pathogènes émergents tels *B. miyamotoi* ou *Candidatus Neoerhlichia mikurensis*, continuer d'évaluer les densités et les prévalences de ces microorganismes dans les tiques, restent un élément clé de prévention.

Lexique

4-poster : station de nourrissage du gibier délivrant des acaricides topiques (Piesman 2006)

Alsa(ce)tique : étude épidémiologique réalisée en Alsace entre le 1^{er} janvier 2014 et le 31 décembre 2015 sur trois maladies à transmission vectorielle : la borréliose de Lyme, l'anaplasmose granulocytaire humaine et l'encéphalite à tique.

Aménagement forestier : étude et documents sur lesquels s'appuie la gestion durable d'une forêt à partir d'analyses du milieu naturel et du contexte économique et social. L'aménagement fixe les objectifs et détermine l'ensemble des interventions (coupes, travaux,...) sur une durée de 10 à 25 ans (Boutefeu 2005)

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR

Argile : ensemble des éléments minéraux dont le diamètre est inférieur à 2 µm (Musy and Soutter 1991)

Artificialisation des sols : étalement urbain incluant la mise en place d'espaces verts urbains, d'équipements sportifs et de loisir (Laugier 2012)

Biodiversité : diversité des espèces vivantes et de leurs caractères génétiques [Larousse, 2015]

Biotope : milieu biologique déterminé offrant des conditions d'habitat stable à un ensemble d'espèces animale ou végétale [<http://www.futura-sciences.com>]

Centre National de Référence : créé par l'arrêté du 18 avril 1972, ce sont des structures situées au sein d'établissements publics ou privés de soin, d'enseignement ou de recherche, qui contribuent à la surveillance épidémiologique avec parfois une mission de laboratoire.

Chélicères : appendices buccaux ayant évolué pour s'adapter à différents régimes alimentaires.

Chitinisé : qui contient de la chitine ; chitine : substance dure imperméable qui recouvre le corps des arthropodes (Heuser and Dupuis 2008)

Compétence : capacité à transférer l'infection à un vecteur (Wood and Lafferty 2013)

Coxa : correspond à la hanche chez les *Ixodidae*, endroit d'insertion des pattes. Les épines présentes sur les coxa sont utilisées pour la diagnose.

Cuticule : constitué de l'épicuticule, de l'exocuticule et de l'endocuticule ; recouvre l'épiderme chez les Arthropodes ; responsable de la croissance par mue des Arthropodes (Heuser and Dupuis 2008)

Cryptophile : qui vit sous la strate herbacée ou dans les taillis tel *Ixodes frontalis* (Guigen and Degeilh 2001)

Damminix® : boules de coton imprégné de perméthrine (<http://www.ticktubes.com>)

Déficit de saturation en eau dans l'air : index d'humidité caractérisé par la différence entre la pression de vapeur saturante et l'actuelle pression de vapeur d'eau dans l'air. L'indice a la particularité d'être proportionnel à la capacité d'évaporation de l'air. C'est un terme général utilisé chez les arthropodes parce qu'il a une relation

directe entre la perte d'eau et l'expression de leur tolérance à la dessiccation (Estrada-Peña and de la Fuente 2014).

Dessiccation : enlèvement de l'eau contenue dans une substance, à l'aide de la chaleur, du vide, ou d'une matière hygroscopique [Petit Larousse 2015]

Diapause : arrêt anticipé du développement ou de l'activité déterminé génétiquement ou par des facteurs extérieurs annonçant des conditions défavorables (Belozarov 2008). Diminution de l'activité métabolique induit par les neurohormones (Degeilh 2007).

Diagnose : Connaissance qui s'acquiert par l'observation des signes diagnostiques [Littré]

Ecotone : zone de transition géographique entre deux écosystèmes (Despommier et al. 2006)

Endémie : persistance d'une maladie infectieuse ou sein d'une population ou d'une région. [Petit Larousse 2015]

Endophile: nidicole, qui vit à l'abri dans un habitat déterminé (ex: *I. ventalloi*) (Guigen and Degeilh 2001)

Epidémiologie: science qui étudie au sein de la population (humaine, animale, voire végétale) la fréquence et la répartition des problèmes de santé dans le temps et dans l'espace ainsi que le rôle des facteurs qui les déterminent. [Larousse 2015]

Erythème migrant: papule érythémateuse à évolution centrifuge ayant parfois un éclaircissement central [Brochure médicale <http://www.invs.sante.fr/Regions-et-territoires/L-InVS-dans-votre-region/Lorraine-Alsace/Etude-reseau-ALSA-CE-TIQUE-2014-2015>]

Exophile: pratique de la chasse à l'affût à l'extérieur, généralement au-dessus de la strate herbacée (Guigen and Degeilh 2001)

Facteurs abiotiques: facteurs relatifs au climat (Randolph 2004)

Facteurs biotiques : facteurs relatifs à l'hôte (Randolph 2004)

Fragmentation du paysage : discontinuité (fragmentation) dans l'environnement privilégié d'un organisme produisant la fragmentation de la population. Cela peut être un processus naturel ou résultant de l'action de l'Homme telle la conversion des aires sauvages en aires agricoles, la construction de routes ou l'expansion des villes (Estrada-Peña and de la Fuente 2014)

Firponil : antiparasitaire à usage topique contre les ectoparasites (<http://www.cbip-vet.be/fr/texts/FAPOOOL1GL2d.php>)

Futaie : bois dont les arbres issus de semence doivent atteindre leur pleine croissance afin d'être exploité

Hématophage : se dit d'un parasite ou d'un insecte vecteur de maladie parasitaire et qui se nourrit de sang [Petit Larousse 2015]

Horizon : couche du sol grossièrement horizontale dont un ou plusieurs caractères, suffisamment homogènes, la différencie des autres couches.

Horizon A : horizon de surface organo-minéral

Huile essentielle : parfum obtenu à partir d'un matériel botanique brut (Pages et al. 2014)

Humification : ensemble des transformations par voie biologique et chimique des matières organiques « fraîches » (arrivant au sol) en molécules nouvelles formant « l'humus » *sensu stricto*.

Indicateur de Changement écologique (ICE) : méthode de comptage de la faune sauvage (cerfs élaphe, daim, chamois, mouflon...). Celle-ci permet d'étudier les relations entre le compartiment animal et le compartiment végétal. Exemples d'ICE : ICE Abondance, ICE performance, ICE Pression sur la flore)

Gorgement : ingestion et digestion de sang

Litière : au sens strict, ensemble de débris végétaux peu transformés recouvrant le sol (donc horizon OL et même OLn) ; au sens large : ensemble des couches holorganiques.

Modèle linéaire généralisé : met en relation l'espérance d'une variable dépendante Y avec un ensemble de co-variables X_i selon certaines conditions. [INVS 2005]

Mue : changement, transformation d'un état à un autre [Petit Larousse 2015]

Non-réservoir : se dit d'une espèce incapable de transmettre le pathogène à une tique non-infectée (Estrada-Peña and de la Fuente 2014)

ONF : Office National des Forêts ; organisme chargé de gérer les forêts publiques.

Opéron : Unité de régulation d'un ensemble de gène qui seront transcrit à l'aide d'un même promoteur.

Phénologie : évolution saisonnière de l'activité de recherche d'hôte de la tique (Jouda et al. 2004)

Photopériode : nombre d'heure de jour et de nuit en un jour (Estrada-Peña and de la Fuente 2014)

Plasticité phénotypique: réponse adaptative induite par des nouveaux éléments environnementaux provoquant une pression de sélection. Celle-ci est à même de faciliter la divergence des lignées d'une même espèce du point de vue de la morphologie, de la physiologie ou du comportement (Price et al. 2003).

Quête d'un hôte (activité de) : moment dans le cycle de vie de la tique dans lequel les stades cherchent activement un hôte (Estrada-Peña et al. 2013c)

Remote sensing : ce dit de l'acquisition d'information sur un objet ou un phénomène sans établir de contact physique avec cet objet ou ce phénomène. S'oppose à l'observation de terrain. Dans le langage courant, cela se réfère à la collecte d'information grâce aux satellites ou à l'aviation (US Department of Commerce 2017)

Réplétion : état d'un organe rempli [Petit Larousse 2015]

Répulsif: composé chimique volatile induisant le déplacement des arthropodes à l'opposé de la source de répulsif (Miller et al. 2009)

Réservoir : dans le contexte de la maladie de Lyme, une espèce de vertébrés qui peut être de façon persistante et asymptomatique infecté par des spirochètes, et qui via le repas sanguin peut être la source d'infection pour des tiques naïves (Radolf et al. 2012)

Ried : désigne les paysages de prairies et de forêts régulièrement inondées par les remontées d'eau souterraine et les débordements de cours d'eau. L'Alsace comprend plusieurs ried dont le plus important en surface étant le « Ried de l'Ill » (Natura 2000 2013).

Risque acarologique : densité de tiques infectées à l'affût (Brownstein et al. 2005)

Sable : ensemble des éléments minéraux dont le diamètre apparent est compris entre 50 µm et 2 mm (Musy and Soutter 1991).

Saison de production : période de temps pendant lequel la croissance des plantes indigènes est maximale.

Sclérification : durcissement de la cuticule par la création de nouvelles liaisons chitino-protéiques aboutissant à un tannage des protéines.

Silt : ensemble des éléments minéraux dont le diamètre est compris entre 2 et 50 µm. Le terme de limon est utilisé de façon équivoque, car il désigne selon les cas la fraction silteuse ou un mélange, à dominance silteuse, d'argile,* de silt et de sable* (Musy and Soutter 1991)

Spirochètes : membre du grand phylum bactérien des *Spirochaetes*, qui regroupe les bactéries de morphologie hélicoïdale avec une mobilité particulière qui leur permet de pénétrer les milieux et les tissus visqueux (Radolf et al. 2012).

Stade : en entomologie, période entre deux mues n'entraînant pas de changement morphologique majeur. Chez les tiques *Ixodina*, les trois stades correspondent aux trois stades (Perez-Eid 2007)

Stase : en entomologie, période entre deux mues responsables de la métamorphose (Perez-Eid 2007)

Station : étendue de terrain de superficie variable, homogène dans ses conditions physiques et biologiques (mésoclimat, sol, topographie, végétation spontanée).

Symbiote : (ou symbiote) microorganisme vivant engageant avec la tique des interactions longues et très étroites (Bonnet et al. 2017)

Taillis : type d'aménagement forestier dans lequel les rejets de souches de feuillus –les résineux ne donnent généralement pas de rejet- sont régulièrement émondés c'est à dire débarrasser de rameaux morts ou inutiles.

Tégument : chez les Arthropodes, le tégument comprend un épiderme simple élaborant une cuticule (Heuser and Dupuis 2008)

Télotrope : s'oppose à monotrope. Se dit d'une tique se gorgeant sur plusieurs espèces d'hôtes (ubiquiste)(Degeilh 2007).

Texture : propriétés mécaniques et tactiles du sol en relation avec la taille de ses constituants (proportion de limon, sable, argile) (Jabiol et al. 2007)

Thrombine : enzyme provoquant la coagulation par transformation du fibrinogène en fibrine [Petit Larousse 2015]

Transcriptome : identification et quantification des ARN messagers produits par un tissu (Neuberger et al. 2011)

Transovarien : passage d'un microorganisme d'une femelle adulte à une larve via l'œuf (ce qui s'observe avec les *Borrelia* des fièvres récurrentes et peu avec le complexe *Borrelia burgdorferi* sl) (Radolf et al. 2012)

Transtadial : transmission au stade de développement suivant de la tique (Radolf et al. 2012)

Trixène : (xenos en grec signifie hôte) qui nécessite trois hôtes (Degeilh 2007)

Vecteur : être vivant qui a l'occasion de relations écologiques, acquiert un pathogène sur un hôte vivant et le transmet ensuite à un autre hôte (Toma et al. 1991). Pour les vertébrés, le terme homologue est « réservoir » (Estrada-Peña and de la Fuente 2014).

Zoonose : maladie ou infection qui se transmet naturellement des animaux vertébrés à l'Homme et vice-versa (Toma et al. 1991)

Bibliographie

- Adeolu, M, Gupta, RS (2014). A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. n. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105: 1049–72.
- Aeschlimann, A (1972). *Ixodes ricinus*, Linné 1758 *Ixodoidea, Ixodidae*: Essai préliminaire de synthèse sur le biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Trop* 321–39.
- Afzelius, A (1909). Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stocholm. *Arch Dermatol Syph* 101–4.
- Akel, T, Mobarakai, N (2017). Hematologic manifestations of babesiosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16: 1–6.
- Allan, BF, Keesing, F, Ostfeld, RS (2003). Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conserv Biol* 17: 267–72.
- Alonso-Carné, J, García-Martín, A, Estrada-Peña, A (2015). Assessing the statistical relationships among water-derived climate variables, rainfall, and remotely sensed features of vegetation: implications for evaluating the habitat of ticks. *Exp Appl Acarol* 65: 107–24.
- Alonso-Carné, J, García-Martín, A, Estrada-Peña, A (2016). Modelling the phenological relationships of questing immature *Ixodes ricinus* (Ixodidae) using temperature and NDVI data. *Zoonoses Public Health* 63: 40–52.
- Amsden, JR, Warmack, S, Gubbins, PO (2005). Tick-borne bacterial, rickettsial, spirochetal, and protozoal infectious diseases in the United States: a comprehensive review. *Pharmacotherapy* 25: 191–210.
- Anderson, JF (1988). Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci* 539: 180–91.
- Anderson, JF (1991). Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 77: 23–34.
- Andren, H (1994). Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscape with different proportions of suitable habitat: a review. *Oikos* 355–66.
- Angelakis, E, Mediannikov, O, Jos, S-L, et al. (2016). *Candidatus Coxiella massiliensis* infection. *Emerg Infect Dis* 22: 285–8.
- Arsnoe, IM, Hickling, GJ, Ginsberg, HS, et al. (2015). Different populations of blacklegged tick nymphs exhibit differences in questing behavior that have implications for human lyme disease risk. *PLoS One* 10: e0127450.
- Aubry, C, Socolovschi, C, Raoult, D, et al. (2016). Bacterial agents in 248 ticks removed from people from 2002 to 2013. *Ticks Tick Borne Dis* 7: 475–81.
- Bakken, JS (1994). Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States. *JAMA* 272: 212.
- Bakken, JS, Dumler, JS (2006). Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci* 1078: 236–47.
- Bakken, JS, Dumler, S (2008). Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 22: 433–48, viii.
- Balashov, Y (1967). *Blood sucking ticks (Ixodoidea)*. *Vectors of disease of man and animal*. Miscell Pu. Leningrad.
- Baneth, G, Bourdeau, P, Bourdoiseau, G, et al. (2012). Vector-borne diseases--constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. *Parasit Vectors* 5: 55–61.

- Barandika, JF, Berriatua, E, Barral, M, *et al.* (2006). Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. *Med Vet Entomol* 20: 177–88.
- Barbour, AG (1988). Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol* 26: 475–8.
- Barbour, AG, Fish, D (1993). The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science* 260: 1610–6.
- Belozarov, V (1982). Diapause and biological rhythms in ticks. *In: Physiol. ticks*. Oxford, U.K, 469–500.
- Belozarov, VN (2008). Diapause and quiescence as two main kinds of dormancy and their significance in life cycles of mites and ticks (Chelicerata: Arachnida: Acari) Part 1 16: 79–130.
- Benezra, D, Brown, AE, Polsky, B, *et al.* (1987). Babesiosis and infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med* 107: 944.
- Benjamin, MA, Zhioua, E, Ostfeld, RS (2002). Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 39: 723–8.
- Berende, A, ter Hofstede, HJM, Vos, FJ, *et al.* (2016). Randomized Trial of Longer-Term Therapy for Symptoms Attributed to Lyme Disease. *N Engl J Med* 374: 1209–20.
- Berglund, J, Eitrem, R, Ornstein, K, *et al.* (1995). An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *N Engl J Med* 333: 1319–27.
- Beugnet, F, Marié, J-L (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol* 163: 298–305.
- Binnington, K (1972). The distribution and morphology of probable photoreceptors in eight species of ticks (*Ixodidae*). *Z ParasitKde* 321–32.
- Binnington, K, Kemp, D (1980). Role of ticks salivary glands in feeding and disease transmission. *Adv Parasitol* 315–39.
- Bissinger, BW, Roe, RM (2010). Tick repellents: Past, present, and future. *Pestic Biochem Physiol* 96: 63–79.
- Black, WC, Piesman, J (1994). Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10034–8.
- Blanco, JR, Oteo, JA (2012). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 8: 763–72.
- Blancou, J, Chomel, BB, Belotto, A, *et al.* (2005). Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control. *Vet Res* 36: 507–22.
- Boden, K, Lobenstein, S, Hermann, B, *et al.* (2016). *Borrelia miyamotoi* -associated neuroborreliosis in immunocompromised Person. *Emerg Infect Dis* 22: 1617–20.
- Boehnke, D, Brugger, K, Pfäffle, M, *et al.* (2015). Estimating *Ixodes ricinus* densities on the landscape scale. *Int J Health Geogr* 14: 23–30.
- De Boer, R, Hovius, KE, Nohlmans, MK, *et al.* (1993). The woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) as a reservoir of tick-transmitted spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in The Netherlands. *Zentralbl Bakteriologie* 279: 404–16.
- Bogovic, P, Strle, F (2015). Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin cases* 3: 430–41.
- Bonnet, SI, Binetruy, F, Hernández-Jarguín, AM, *et al.* (2017). The tick microbiome: why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 236–50.
- Boone, I, Hassler, D, Nguyen, T, *et al.* (2015). Tularaemia in southwest Germany: Three cases of tick-borne transmission. *Ticks Tick Borne Dis* 6: 611–4.

- Bouchard, C, Beauchamp, G, Leighton, PA, *et al.* (2013). Does high biodiversity reduce the risk of Lyme disease invasion? *Parasit Vectors* 6: 195.
- Boulanger, N (2009). Biologie des tiques: Leur rôle dans la maladie de Lyme et lutte contre les tiques. *Nouv Dermatol* 1–8.
- Bouquet, J, Soloski, MJ, Swei, A, *et al.* (2016). Longitudinal transcriptome analysis reveals a sustained differential gene expression signature in patients treated for acute Lyme disease. *MBio* 7: e00100-16.
- Boutefeu, B (2005). L'aménagement forestier en France : à la recherche d'une gestion durable à travers l'histoire. *VertigO*.
- Boyard, C (2007). *Facteurs environnementaux de variation de l'abondance des tiques Ixodes ricinus dans des zones d'études modèles en Auvergne*.
- Brackney, DE, Armstrong, PM (2016). Transmission and evolution of tick-borne viruses. *Curr Opin Virol* 21: 67–74.
- Brites-Neto, J, Duarte, KMR, Martins, TF (2015). Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Vet world* 8: 301–15.
- Brouqui, P, Raoult, D, Durand, JM (1995). *Ehrlichia* species as possible causative agents of blood culture-negative endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 1: 148–50.
- Brownstein, JS, Holford, TR, Fish, D (2003). A Climate-based model predicts the spatial distribution of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in the United States. *Environ Health Perspect* 111: 1152–7.
- Brownstein, JS, Skelly, DK, Holford, TR, *et al.* (2005). Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. *Oecologia* 146: 469–75.
- Brugger, K, Boehnke, D, Petney, T, *et al.* (2016). A Density map of the tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis vector *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for Germany. *J Med Entomol* 53: 1292–302.
- Büchel, K, Bendin, J, Gharbi, A, *et al.* (2015). Repellent efficacy of DEET, Icaridin, and EBAAP against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* nymphs (Acari, Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis* 6: 494–8.
- Bujak, DI, Weinstein, A, Dornbush, RL (1996). Clinical and neurocognitive features of the post Lyme syndrome. *J Rheumatol* 23: 1392–7.
- Burgdorfer, W, Barbour, A, Hayes, S, *et al.* (1982). Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? *Science (80-)* 1317–9.
- Burtis, JC, Sullivan, P, Levi, T, *et al.* (2016). The impact of temperature and precipitation on blacklegged tick activity and Lyme disease incidence in endemic and emerging regions. *Parasit Vectors* 9: 606.
- Buskirk, J Van, Ostfeld, RS (1995). Controlling Lyme disease by modifying the density and species composition of tick hosts. *Ecol Appl* 5: 1133.
- Capek, I, Vaillant, V, Mailles, A, *et al.* (2006). Les zoonoses en France : définir les priorités 195–210.
- Carroll, JF (2003). A Cautionary Note: Survival of Nymphs of Two Species of Ticks (Acari: Ixodidae) Among Clothes Laundered in an Automatic Washer. *J Med Entomol* 40: 732–6.
- Carvalho, CL, Lopes de Carvalho, I, Zé-Zé, L, *et al.* (2014). Tularaemia: a challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37: 85–96.
- Casjens, S (2000). *Borrelia* genomes in the year 2000 JMMB Symposium on Spirochete physiology. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2: 401–10.
- Casjens, S, Palmer, N, van Vugt, R, *et al.* (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 35: 490–516.

- CDC (2015). Preventing tick bites [WWW Document]. URL www.cdc.gov/ticks/avoid/on_people.html
- Center for Disease Control (2016). Annual Cases of Anaplasmosis in the United States [WWW Document]. URL www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/index.html
- Charrel, RN, Attoui, H, Butenko, AM, *et al.* (2004). Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10: 1040–55.
- Chauvin, A, Moreau, E, Bonnet, S, *et al.* (2009). Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* 40: 37–55.
- Choochote, W, Chaithong, U, Kamsuk, K, *et al.* (2007). Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 78: 359–64.
- Christensen JH, Hewitson B, Busuioac A, Chen A Gao X, Held I, Jones R, Kolli RK, Kwon WT, Laprise R, Magana Rueda L, Mearns L, Menendez CG, Raisanen J, Rinke A, Sarr A, WP (2007). 2007: Regional Climate Projections. In: *Clim. Chang. 2007 The Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fourth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.* (Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, MH ed.). United Kingdom and New York.
- Cinco, M, Barbone, F, Grazia Ciufolini, M, *et al.* (2004). Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. *Clin Microbiol Infect* 10: 1056–61.
- Clark, RP, Hu, LT (2008). Prevention of lyme disease and other tick-borne infections. *Infect Dis Clin North Am* 22: 381–96, vii.
- Coburn, J, Leong, J, Chaconas, G (2013). Illuminating the roles of the *Borrelia burgdorferi* adhesins. *Trends Microbiol* 21: 372–9.
- Coipan, EC, Jahfari, S, Fonville, M, *et al.* (2013). Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 36.
- Comstedt, P, Hanner, M, Schüller, W, *et al.* (2014). Design and Development of a Novel Vaccine for Protection against Lyme Borreliosis. *PLoS One* 9: e113294.
- Comstedt, P, Jakobsson, T, Bergström, S (2011). Global ecology and epidemiology of *Borrelia garinii* spirochetes. *Infect Ecol Epidemiol* 1: 9645–55.
- Connally, NP, Durante, AJ, Yousey-Hindes, KM, *et al.* (2009). Peridomestic Lyme disease prevention. *Am J Prev Med* 37: 201–6.
- Cook, MJ (2015). Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Int J Gen Med* 8: 1–8.
- Craine, NG, Nuttall, PA, Marriott, AC, *et al.* (1997). Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. *Folia Parasitol (Praha)* 44: 155–60.
- Crippa, M, Rais, O, Gern, L (2002). Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2: 3–9.
- Crooks, E, Randolph, SE (2006). Walking by *Ixodes ricinus* ticks: intrinsic and extrinsic factors determine the attraction of moisture or host odour. *J Exp Biol* 209: 2138–42.
- Cunningham, AA (2005). A walk on the wild side--emerging wildlife diseases. *BMJ* 331: 1214–5.
- Daniel, M, Cerny, V, Dusbábek, F (1972). Stratification of overwintering engorged larvae and nymphs of *Ixodes ricinus* (L.). *Wiadomości Parazytol* 18: 727–30.
- Daniel, M, Malý, M, Danielová, V, *et al.* (2015). Abiotic predictors and annual seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*, the major disease vector of Central Europe. *Parasit Vectors* 8: 478.
- Daniels, TJ, Fish, D, Schwartz, I (1993). Reduced abundance of *Ixodes scapularis* (Acari:

- Ixodidae*) and Lyme disease risk by deer exclusion. *J Med Entomol* 30: 1043–9.
- Dantas-Torres, F, Chomel, BB, Otranto, D (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol* 28: 437–46.
- Dantas-Torres, F, Lia, RP, Capelli, G, *et al.* (2013). Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Exp Appl Acarol* 61: 119–27.
- Dautel, H, Dippel, C, Werkhausen, A, *et al.* (2013). Efficacy testing of several *Ixodes ricinus* tick repellents: Different results with different assays. *Ticks Tick Borne Dis* 4: 256–63.
- Dautel, H, Kahl, O, Knülle, W (1991). The soft tick *Argas reflexus* (F.) (*Acari, Argasidae*) in urban environments and its medical significance in Berlin (West). *J Appl Entomol* 111: 380–90.
- Davidson, MM, Williams, H, Macleod, JA (1991). Louping ill in man: a forgotten disease. *J Infect* 23: 241–9.
- Dean, CB (1992). Testing for overdispersion in Poisson and Binomial regression models. *J Am Stat Assoc* 82: 451–7.
- Deblinger, RD, Wilson, ML, Rimmer, DW, *et al.* (1993). Reduced abundance of immature *Ixodes dammini* (*Acari: Ixodidae*) following incremental removal of deer. *J Med Entomol* 30: 144–50.
- Degeilh, B (2007). Scientific basis for prevention. *Médecine Mal Infect* 37: 360–7.
- Despommier, D, Ellis, BR, Wilcox, BA (2006). The role of ecotones in emerging infectious diseases. *Ecohealth* 3: 281–9.
- Dister, SW, Fish, D, Bros, SM, *et al.* (1997). Landscape characterization of peridomestic risk for Lyme disease using satellite imagery. *Am J Trop Med Hyg* 57: 687–92.
- Diuk-Wasser, M a, Vourc'h, G, Cislo, P, *et al.* (2010). Field and climate-based model for predicting the density of host-seeking nymphal *Ixodes scapularis*, an important vector of tick-borne disease agents in the eastern United States. *Glob Ecol Biogeogr* 504–14.
- Diuk-Wasser, M a, Hoen, AG, Cislo, P, *et al.* (2012). Human risk of infection with *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent, in eastern United States. *Am J Trop Med Hyg* 86: 320–7.
- Diuk-Wasser, MA, Vannier, E, Krause, PJ (2016). Coinfection by *Ixodes* tick-borne pathogens: ecological, epidemiological, and clinical consequences. *Trends Parasitol* 32: 30–42.
- Dobson, ADM, Randolph, SE (2011). Modelling the effects of recent changes in climate, host density and acaricide treatments on population dynamics of *Ixodes ricinus* in the UK. *J Appl Ecol* 48: 1029–37.
- Dufour, B, Hendrikx, P, Toma, B (2006). The design and establishment of epidemiological surveillance systems for high-risk diseases in developed countries. *Rev Sci Tech* 25: 187–98.
- Dumont, P, Fourie, JJ, Soll, M, *et al.* (2015). Repellency, prevention of attachment and acaricidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against the main vector of canine babesiosis in Europe, *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasit Vectors* 8: 50.
- Dunning Hotopp, JC, Lin, M, Madupu, R, *et al.* (2006). Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet* 2: e21.
- Dusbábek, F, Daniel, M, Cerný, V (1971). Stratification of engorged *Ixodes ricinus* larvae overwintering in soil. *Folia Parasitol (Praha)* 18: 261–6.
- Edouard, S, Koebel, C, Goehringer, F, *et al.* (2012). Emergence of human granulocytic anaplasmosis in France. *Ticks Tick Borne Dis* 3: 403–5.

- Eriksson, BI, Smith, H, Yasothan, U, *et al.* (2008). Dabigatran etexilate. *Nat Rev Drug Discov* 7: 557–8.
- Estrada-Peña, A (2003). The relationships between habitat topology, critical scales of connectivity and tick abundance *Ixodes ricinus* in a heterogeneous landscape in northern Spain. *Ecography (Cop)* 5: 661–71.
- Estrada-Peña, A (2001). Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Spain. *J Med Entomol* 38: 361–70.
- Estrada-Peña, A (2008). Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitol Res* 103: 87–95.
- Estrada-Peña, A, Alexander, N, Wint, GRW (2016). Perspectives on modelling the distribution of ticks for large areas: so far so good? *Parasit Vectors* 9: 179.
- Estrada-Peña, A, Castellá, J, Morel, PC (1994). Cuticular hydrocarbon composition, phenotypic variability, and geographic relationships in allopatric populations of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) from Africa and the Caribbean. *J Med Entomol* 31: 534–44.
- Estrada-Peña, A, Farkas, R, Jaenson, TGT, *et al.* (2013a). Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. *Exp Appl Acarol* 59: 351–66.
- Estrada-Peña, A, Gray, JS, Kahl, O, *et al.* (2013b). Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens--methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 29.
- Estrada-Peña, A, de la Fuente, J (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res* 108C: 104–28.
- Estrada-Peña, A, Martinez, JM, Sanchez Acedo, C, *et al.* (2004). Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med Vet Entomol* 18: 387–97.
- Estrada-Peña, A, Ruiz-Fons, F, Acevedo, P, *et al.* (2013c). Factors driving the circulation and possible expansion of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the western Palearctic. *J Appl Microbiol* 114: 278–86.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - Health Communication Unit - Eurosurveillance editorial (2012). *Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European free trade Association countries*. Stockholm.
- Evans, G (1992). *Principles of acarology*. CAB intern. Oxon UK.
- Falco, RC, Fish, D (1991). Horizontal movement of adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) attracted to CO₂-baited traps. *J Med Entomol* 28: 726–9.
- Falco, RC, McKenna, DF, Daniels, TJ, *et al.* (1999). Temporal relation between *Ixodes scapularis* abundance and risk for Lyme disease associated with erythema migrans. *Am J Epidemiol* 149: 771–6.
- Farkas, R, Estrada-Peña, A, Jaenson, TG, *et al.* (2013). Biology and distribution of tick vectors. In: *Ticks tick-borne Dis. Geogr. Distrib. Control Strateg. Euro-Asia Reg.* (Salman, M, Tarrès-Call, J eds). CABI N Osworthy: Oxford, 12–3.
- Faulde, M, Uedelhoven, W (2006). A new clothing impregnation method for personal protection against ticks and biting insects. *Int J Med Microbiol* 296: 225–9.
- Faulde, MK, Robbins, RG (2008). Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s.l. infection-induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. *Exp Appl Acarol* 44: 137–45.
- Faulde, MK, Rutenfranz, M, Hepke, J, *et al.* (2014). Human tick infestation pattern, tick-

- bite rate, and associated *Borrelia burgdorferi* s.l. infection risk during occupational tick exposure at the Seedorf military training area, northwestern Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 594–9.
- Faulde, MK, Uedelhoven, WM, Malerius, M, *et al.* (2006). Factory-based permethrin impregnation of uniforms: residual activity against *Aedes aegypti* and *Ixodes ricinus* in battle dress uniforms worn under field conditions, and cross-contamination during the laundering and storage process. *Mil Med* 171: 472–7.
- Faulde, MK, Uedelhoven, WM, Robbins, RG (2003). Contact toxicity and residual activity of different permethrin-based fabric impregnation methods for *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*), *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*), and *Lepisma saccharina* (Thysanura: *Lepismatidae*). *J Med Entomol* 40: 935–41.
- Feder, HM, Johnson, BJB, O’Connell, S, *et al.* (2007). A Critical Appraisal of “Chronic Lyme Disease.” *N Engl J Med* 357: 1422–30.
- Fehr, JS, Bloemberg, G V, Ritter, C, *et al.* (2010). Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neorhlichia mikurensis*. *Emerg Infect Dis* 16: 1127–9.
- Fernández-Soto, P, Pérez-Sánchez, R, Alamo-Sanz, R, *et al.* (2006). Spotted fever group rickettsiae in ticks feeding on humans in northwestern Spain: is *Rickettsia conorii* vanishing? *Ann NY Acad Sci* 1078: 331–3.
- Ferquel, E, Garnier, M, Marie, J, *et al.* (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl Environ Microbiol* 72: 3074–82.
- Foley, JE, Foley, P, Jecker, M, *et al.* (1999). Granulocytic ehrlichiosis and tick infestation in mountain lions in California. *J Wildl Dis* 35: 703–9.
- Foppa, IM, Krause, PJ, Spielman, A, *et al.* (2002). Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis* 8: 722–6.
- Fotso Fotso, A, Mediannikov, O, Diatta, G, *et al.* (2014). MALDI-TOF Mass Spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crocidurae/Ornithodoros sonrai* paradigm. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2984.
- Francischetti, IMB, Mather, TN, Ribeiro, JMC (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb Haemost* 91: 886–98.
- Francischetti, IMB, Sa-Nunes, A, Mans, BJ, *et al.* (2009). The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 2051–88.
- Francischetti, IMB, Valenzuela, JG, Andersen, JF, *et al.* (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99: 3602–12.
- Frank, D, Fish, D, Moy, F (1998). Landscape features associated with Lyme disease risk in a suburban residential environment. *Landsc Ecol* 27–36.
- Franzen, P, Berg, A-L, Aspan, A, *et al.* (2007). Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Rec* 160: 122–5.
- Fraser, CM, Casjens, S, Huang, WM, *et al.* (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580–6.
- Froberg, MK, Dannen, D, Bakken, JS (2004). Babesiosis and HIV. *Lancet (London, England)* 363: 704.
- Gaede, K, Knülle, W (1997). On the mechanism of water vapour sorption from unsaturated atmospheres by ticks. *J Exp Biol* 200: 1491–8.

- Garg, R, Juncadella, IJ, Ramamoorthi, N, *et al.* (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J Immunol* 177: 6579–83.
- Gargili, A, Palomar, AM, Midilli, K, *et al.* (2012). *Rickettsia* species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 938–41.
- Garin, C, Bujadoux, A (1922). Paralyse par les tiques. *J Med Lyon* 71: 765–7.
- Garnett J.M, Neeta P. Connally, Kirby C. Stafford, III, MLC (2011). Evaluation of deer-targeted interventions on Lyme disease incidence in Connecticut. *Public Health Rep.*
- Gatewood, AG, Liebman, K a, Vourc'h, G, *et al.* (2009). Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Appl Environ Microbiol* 75: 2476–83.
- Gern, L (2004). *Société neuchâteloise des sciences naturelles.*
- Gern, L (2008). *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme borreliosis: life in the wild. *Parasite* 15: 244–7.
- Gern, L, Estrada-Peña, A, Frandsen, F, *et al.* (1998). European Reservoir Hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für Bakteriologie* 287: 196–204.
- Gern, L, Morán Cadenas, F, Burri, C (2008). Influence of some climatic factors on *Ixodes ricinus* ticks studied along altitudinal gradients in two geographic regions in Switzerland. *Int J Med Microbiol* 298: 55–9.
- Gern, L, Rais, O (1996). Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 33: 189–92.
- Gern, L, Rouvinez, E, Toutoungi, LN, *et al.* (1997). Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitologica (Praha)* 44: 309–14.
- Gern, L, Siegenthaler, M, Hu, CM, *et al.* (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur J Epidemiol* 10: 75–80.
- Gern, L, Toutoungi, LN, Hu, CM, *et al.* (1991). *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med Vet Entomol* 5: 431–5.
- Gherman, CM, Mihalca, AD, Dumitrache, MO, *et al.* (2012). CO2 flagging - an improved method for the collection of questing ticks. *Parasit Vectors* 5: 125.
- Gilbert, L, Aungier, J, Tomkins, JL (2014). Climate of origin affects tick (*Ixodes ricinus*) host-seeking behavior in response to temperature: implications for resilience to climate change? *Ecol Evol* 4: 1186–98.
- Gilbert, L, Maffey, GL, Ramsay, SL, *et al.* (2012). The effect of deer management on the abundance of *Ixodes ricinus* in Scotland. *Ecol Appl* 22: 658–67.
- Ginsberg, HS, Ewing, CP (1989). Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 7: 313–22.
- Ginsberg, HS, Zhioua, E, Mitra, S, *et al.* (2004). Woodland type and spatial distribution of nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Environ Entomol* 33: 1266–73.
- Girard, L (2017). L'urbanisation dévore de nouveau les terres agricoles françaises [WWW Document]. *Le Monde*. URL www.lemonde.fr/economie/article/2017/05/30/l-urbanisation-devore-de-nouveau-les-terres-agricoles-francaises_5136027_3234.html
- Glass, GE, Amerasinghe, FP, Morgan, JM, *et al.* (1994). Predicting *Ixodes scapularis* abundance on white-tailed deer using geographic information systems. *Am J Trop Med Hyg* 51: 538–44.

- Gorenflot, A, Moubri, K, Precigout, E, *et al.* (1998). Human babesiosis. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 489–501.
- Gray, J, von Stedingk, L, Granström, M (2002). Zoonotic babesiosis. *Int J Med Microbiol* 108–11.
- Gray, JS (1981). The fecundity of *Ixodes ricinus* (L.) (Acarina: *Ixodidae*) and the mortality of its developmental stages under field conditions. *Bull Entomol Res* 71: 533.
- Gray, JS (1985). A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. *Exp Appl Acarol* 1: 35–44.
- Gray, JS (2008). *Ixodes ricinus* seasonal activity: Implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. *Int J Med Microbiol* 298: 19–24.
- Gray, JS, Dautel, H, Estrada-Peña, a, *et al.* (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 593232.
- Gray, JS, Kahl, O, Janetzki-Mittman, C, *et al.* (1994). Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. *Exp Appl Acarol* 18: 485–91.
- Gray, JS, Kahl, O, Robertson, JN, *et al.* (1998). Lyme borreliosis habitat assessment. *Zentralbl Bakteriol* 287: 211–28.
- Grech-Angelini, S, Stachurski, F, Lancelot, R, *et al.* (2016). First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Vet Parasitol* 216: 33–7.
- Guerra, M, Walker, E, Jones, C, *et al.* (2002). Predicting the risk of Lyme disease: habitat suitability for *Ixodes scapularis* in the north central United States. *Emerg Infect Dis* 8: 289–97.
- Guglielmone, AA, Nava, S (2014). Names for *Ixodidae* (Acari: *Ixodoidea*): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names--with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa* 3767: 1–256.
- Guglielmone, AA, Robbins, RG, Apanaskevich, DA, *et al.* (2010). Zootaxa, The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: *Ixodida*) of the world:... 28: 1–28.
- Guigen, C, Degeilh, B (2001). Les tiques d'intérêt médical: rôle vecteur et diagnose de laboratoire. *RFL* 23–36.
- Guo, BP, Norris, SJ, Rosenberg, LC, *et al.* (1995). Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infect Immun* 63: 3467–72.
- Guy, EC, Stanek, G (1991). Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 44: 610–1.
- Hai, VV, Almeras, L, Socolovschi, C, *et al.* (2014). Monitoring human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: available tools and promising future methods. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 607–19.
- Hancock, PA, Brackley, R, Palmer, SCF (2011). Modelling the effect of temperature variation on the seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* tick populations. *Int J Parasitol* 41: 513–22.
- Hanincová, K, Taragelová, V, Koci, J, *et al.* (2003). Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol* 69: 2825–30.
- Hansmann, Y (2009). Treatment and prevention of Lyme disease. In: *Lyme borreliosis Biol. Clin. Asp.* (Lipsker, D, Jaulhac, B eds). Karger: Strasbourg, 200–2006.
- Hatcher, JC, Greenberg, PD, Antique, J, *et al.* (2001). Severe babesiosis in Long Island: review of 34 cases and their complications. *Clin Infect Dis* 32: 1117–25.
- Hauss, Y (2015). *Les données alsaciennes du changement climatique.*
- Haut Conseil de la Santé Publique (2017). Borréliose de Lyme. Modes de transmission [WWW Document]. 10 février 2016. URL

- <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=564>
- HCSP (2014). *Borréliose de Lyme. État des connaissances*. Paris.
- Heine, S, Thiet, W, Liebisch, G (2007). Anaplasmosse beim Hund-Fallbericht. *Prakt Tierarzt* 88: 20–7.
- Hellwage, J, Meri, T, Heikkilä, T, *et al.* (2001). The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 276: 8427–35.
- Hengge, UR, Tannapfel, A, Tyring, SK, *et al.* (2003). Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis* 3: 489–500.
- Herrmann, C, Gern, L (2013). Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) nymphs under cold conditions is negatively influenced by frequent temperature variations. *Ticks Tick Borne Dis* 4: 445–51.
- Herrmann, C, Gern, L (2015). Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors* 8: 6.
- Herrmann, C, Voordouw, MJ, Gern, L (2013). *Ixodes ricinus* ticks infected with the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, have higher energy reserves. *Int J Parasitol* 43: 477–83.
- Herwaldt, BL, Cacciò, S, Gherlinzoni, F, *et al.* (2003). Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 9: 942–8.
- Heuser, S, Dupuis, H (2008). Atlas de Biologie Animale Tome 2-Les grandes fonctions. 81.
- Heylen, D, Tijssse, E, Fonville, M, *et al.* (2013). Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.l. in a bird tick community. *Environ Microbiol* 15: 663–73.
- Heyman, P, Cochez, C, Hofhuis, A, *et al.* (2010). A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 33–50.
- Hildebrandt, A, Franke, J, Meier, F, *et al.* (2010). The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. *Ticks Tick Borne Dis* 1: 105–7.
- Hildebrandt, A, Hunfeld, K-P, Baier, M, *et al.* (2007). First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 595–601.
- Hoang Johnson, DK, Petersen, JM, Theel, ES, *et al.* (2016). *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Ver Hoef, JM, Boveng, PL (2007). Quasi-Poisson vs. negative binomial regression: how should we model overdispersed count data? *Ecology* 88: 2766–72.
- Hofhuis, A, van der Giessen, J, Borgsteede, F, *et al.* (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveill* 11: 2978–9.
- Hornok, S, Krawczyk, A (2016). First record of *Ixodes ariadnae* in Western Europe, Belgium — Short communication. *Acta Vet Hung* 64: 467–71.
- Hovius, JWR, van Dam, AP, Fikrig, E (2007). Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends Parasitol* 23: 434–8.
- Hovius, JWR, de Wever, B, Sohne, M, *et al.* (2013). A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet* 382: 658.
- Hua, CM, Cheminade, Y, Perret, J-L, *et al.* (2003). Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Med Microbiol* 293: 421–6.
- Hubálek, Z, Halouzka, J (1998). Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in

- host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res* 84: 167–72.
- Hubálek, Z, Halouzka, J, Juricová, Z, *et al.* (2006). Effect of forest clearing on the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. *Med Vet Entomol* 20: 166–72.
- Hubálek, Z, Rudolf, I (2012). Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 111: 9–36.
- Humair, PF, Gern, L (1998). Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop* 69: 213–27.
- Humair, PF, Postic, D, Wallich, R, *et al.* (1998). An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl Bakteriol* 287: 521–38.
- Humair, PF, Turian, N, Aeschlimann, A, *et al.* (1993). *Borrelia burgdorferi* sensu lato en a focus of Lyme borreliosis: The epizootic contribution of small mammals. *Folia Parasitol (Praha)* 65–70.
- Ivanova, LB, Tomova, A, González-Acuña, D, *et al.* (2014). *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ Microbiol* 16: 1069–80.
- Jabiol, B, Brêthes, A, Ponge, J-F, *et al.* (2007). *L'humus sous toutes ses formes*. ENGREF/AGR.
- Jado, I, Oteo, JA, Aldámiz, M, *et al.* (2007). *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis* 13: 1405–7.
- Jaenson, TGT, Jaenson, DGE, Eisen, L, *et al.* (2012). Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors* 5: 8.
- Jahfari, S, Fonville, M, Hengeveld, P, *et al.* (2012). Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasit Vectors* 5: 74.
- Jahfari, S, Ruyts, SC, Frazer-Mendelewska, E, *et al.* (2017). Melting pot of tick-borne zoonoses: the European hedgehog contributes to the maintenance of various tick-borne diseases in natural cycles urban and suburban areas. *Parasit Vectors* 10: 134.
- Jenkins, A, Kristiansen, BE, Allum, AG, *et al.* (2001). *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia spp.* in *Ixodes* ticks from southern Norway. *J Clin Microbiol* 39: 3666–71.
- Johnson, RC, Schmid, GP, Hyde, FW, *et al.* (1984). *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34: 496–7.
- Jones, CJ, Kitron, UD (2000). Populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) are modulated by drought at a Lyme disease focus in Illinois. *J Med Entomol* 37: 408–15.
- Jones, LD, Davies, CR, Steele, GM, *et al.* (1987). A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* 237: 775–7.
- Jongejan, F, Uilenberg, G (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl: S3-14.
- Jore, S, Vanwambeke, SO, Viljugrein, H, *et al.* (2014). Climate and environmental change drives *Ixodes ricinus* geographical expansion at the northern range margin. *Parasit Vectors* 7: 11.
- Jore, S, Viljugrein, H, Hofshagen, M, *et al.* (2011). Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. *Parasit Vectors* 4: 84.
- Jouda, F, Perret, J, Gern, L (2004). *Ixodes ricinus* density and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sl infection along and altitudinal gradient. *J Med Entomol* 162–9.
- Kahl, O, Alidousti, I (1997). Bodies of liquid water as a source of water gain for *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 21: 731–46.

- Kahl, O, Gern, L, Eisen, L, *et al.* (2002). Ecological research on *Borrelia burgdorferi* s.l.: terminology and some methodological pitfalls. In: *Lyme borreliosis Biol. Epidemiol. Control* (Gray, J, Kahl, O, Lane, R, *et al.* eds). New York, 29–46.
- Kahl, O, Janetzki-Mittmann, C, Gray, JS, *et al.* (1998). Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralbl Bakteriol* 287: 41–52.
- Kahl, O, Knülle, W (1988). Wirtssuchchaktivität der Schildzecke, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) und ihre Durchseuchung mit Lyme-spirochäten und den Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME)-virus in Berlin (West). *Mitt Dtsch Ges Allg Engew Entomol* 223–5.
- Kaiser, R (2008). Tick-borne encephalitis. *Infect Dis Clin North Am* 22: 561–75, x.
- Kalluri, S, Gilruth, P, Rogers, D, *et al.* (2007). Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathog* 3: 1361–71.
- Kawahara, M, Rikihisa, Y, Isogai, E, *et al.* (2004). Ultrastructure and phylogenetic analysis of “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1837–43.
- Kaya, AD, Parlak, AH, Ozturk, CE, *et al.* (2008). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers and farmers in Duzce, north-western Turkey. *New Microbiol* 31: 203–9.
- Kazimírová, M, Štibrániová, I (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 43.
- Keesing, F, Brunner, J, Duerr, S, *et al.* (2009). Hosts as ecological traps for the vector of Lyme disease. *Proc Biol Sci* 276: 3911–9.
- Killilea, ME, Sweit, A, Lane, RS, *et al.* (2008). Spatial dynamics of lyme disease: a review. *Ecohealth* 5: 167–95.
- Kilpatrick, HJ, LaBonte, AM, Stafford, KC (2014). The relationship between deer density, tick abundance, and human cases of Lyme disease in a residential community. *J Med Entomol* 51: 777–84.
- Kitron, U, Kazmierczak, JJ (1997). Spatial analysis of the distribution of Lyme disease in Wisconsin. *Am J Epidemiol* 145: 558–66.
- Klompen, H, Lekveishvili, M, Black, WC (2007). Phylogeny of parasitiform mites (Acari) based on rRNA. *Mol Phylogenet Evol* 43: 936–51.
- Knap, N, Durmisi, E, Saksida, A, *et al.* (2009). Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Vet Parasitol* 164: 275–81.
- Knülle, W, Dautel, H (1997). Cold hardiness, supercooling ability and causes of low-temperature mortality in the soft tick, *Argas reflexus*, and the hard tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodoidea) from Central Europe. *J Insect Physiol* 43: 843–54.
- Koebel, C, Kern, A, Edouard, S, *et al.* (2012). Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 72: 214–8.
- Koedel, U, Fingerle, V, Pfister, H-W (2015). Lyme neuroborreliosis—epidemiology, diagnosis and management. *Nat Rev Neurol* 11: 446–56.
- Kosik-Bogacka, DI, Kuźna-Grygiel, W, Jaborowska, M (2007). Ticks and mosquitoes as vectors of *Borrelia burgdorferi* s. l. in the forested areas of Szczecin. *Folia Biol (Praha)* 55: 143–6.
- Kraiczy, P, Skerka, C, Kirschfink, M, *et al.* (2001). Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H.

- Eur J Immunol* 31: 1674–84.
- Krause, PJ, Fish, D, Narasimhan, S, *et al.* (2015). *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin Microbiol Infect.*
- Krause, PJ, Gewurz, BE, Hill, D, *et al.* (2008). Persistent and relapsing babesiosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 46: 370–6.
- Krause, PJ, Telford, SR, Spielman, A, *et al.* (1996). Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA* 275: 1657–60.
- Kurtenbach, K, Hanincová, K, Tsao, JI, *et al.* (2006). Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat Rev Microbiol* 4: 660–9.
- Kurtenbach, K, De Michelis, S, Etti, S, *et al.* (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. *Trends Microbiol* 10: 74–9.
- L'Hostis, M (1998). Aspects vétérinaires des maladies transmises par les tiques: exemple de la babésiose bovine. *Med Mal Infect* 359–62.
- L'Hostis, M, Dumon, H, Fusade, A, *et al.* (1996). Seasonal incidence of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) on rodents in western France. *Exp Appl Acarol* 20: 359–68.
- L'Hostis, M, Seegers, H (2002). Tick-borne parasitic diseases in cattle: current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. *Vet Res* 33: 599–611.
- Labuda, M, Nuttall, PA (2004). Tick-borne viruses. *Parasitology* 129 Suppl: S221-45.
- Lane, RS, Piesman, J, Burgdorfer, W (1991). Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annu Rev Entomol* 36: 587–609.
- Langmuir, AD (1963). The surveillance of communicable diseases of national importance. *N Engl J Med* 268: 182–92.
- Lani, R, Moghaddam, E, Haghani, A, *et al.* (2014). Tick-borne viruses: a review from the perspective of therapeutic approaches. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 457–65.
- Laugier, R (2012). *L'étalement urbain en France.*
- Lauterbach, R, Wells, K, O'Hara, RB, *et al.* (2013). Variable strength of forest stand attributes and weather conditions on the questing activity of *Ixodes ricinus* ticks over years in managed forests. *PLoS One* 8: e55365.
- Lecointre, G, Le Guyader, H (2006). *Classification phylogénétique du vivant.* Paris.
- Lees, AD (1946). The water balance in *Ixodes ricinus* L. and certain other species of ticks. *Parasitology* 37: 1–20.
- Lees, AD, Milne, A (1951). The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L). *Parasitology* 41: 189–208.
- MacLeod, J (1936). *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. An analysis of the ecological complexes controlling distribution and activities. *Parasitology* 295–319.
- Leonovich, SA (1990). Fine structural features of sensory systems in ticks and mites: evolutionary and ethological Aspects. *In: Sens. Syst. Commun. Arthropods.* Birkhäuser Basel: Basel, 44–8.
- Leonovich, SA (2004). Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in *Ixodes ricinus* ticks and their possible role in host perception. *Exp Appl Acarol* 32: 89–102.
- Levi, T, Kilpatrick, AM, Mangel, M, *et al.* (2012). Deer, predators, and the emergence of Lyme disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10942–7.
- Liang, FT, Jacobs, MB, Bowers, LC, *et al.* (2002). An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. *J Exp Med* 195: 415–22.

- Lindgren, E, Tälleklint, L, Polfeldt, T (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* 108: 119–23.
- Lindquist, L, Vapalahti, O (2008). Tick-borne encephalitis. *Lancet (London, England)* 371: 1861–71.
- Lindström, A, Jaenson, TGT (2003). Distribution of the common tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in different vegetation types in Southern Sweden. *J Med Entomol* 40: 375–8.
- Lipschütz, B (1913). Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Arch Dermatol* 349–56.
- von Loewenich, FD, Geissdörfer, W, Disqué, C, et al. (2010). Detection of “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol* 48: 2630–5.
- LoGiudice, K, Ostfeld, RS, Schmidt, KA, et al. (2003). The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 567–71.
- MacDonald, AJ, Hyon, DW, Brewington, JB, et al. (2017). Lyme disease risk in southern California: abiotic and environmental drivers of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) density and infection prevalence with *Borrelia burgdorferi*. *Parasit Vectors* 10: 7.
- Macleod, J (1932). The Bionomics of *Ixodes ricinus* L., The “Sheep Tick” of Scotland. *Parasitology* 24: 382–400.
- MacLeod, J (1935). *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. *Parasitology* 27: 123.
- Madeddu, G, Mancini, F, Caddeo, A, et al. (2012). *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. *Emerg Infect Dis* 18: 702–4.
- Maioli, G, Pistone, D, Bonilauri, P, et al. (2012). Etiological agents of rickettsiosis and anaplasmosis in ticks collected in Emilia-Romagna region (Italy) during 2008 and 2009. *Exp Appl Acarol* 57: 199–208.
- Mancini, F, Di Luca, M, Toma, L, et al. (2014). Prevalence of tick-borne pathogens in an urban park in Rome, Italy. *Ann Agric Environ Med* 21: 723–7.
- Mannelli, A, Bertolotti, L, Gern, L, et al. (2011). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol Rev* 36: 837–61.
- Mans, BJ, de Klerk, D, Pienaar, R, et al. (2011). *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PLoS One* 6: e23675.
- Mansfield, KL, Johnson, N, Phipps, LP, et al. (2009). Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol* 90: 1781–94.
- Mapholi, NO, Marufu, MC, Maiwashe, A, et al. (2014). Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 475–83.
- Margos, G, Vollmer, S a, Ogden, NH, et al. (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol* 11: 1545–63.
- Marques, A (2008). Chronic Lyme Disease: A Review. *Infect Dis Clin North Am* 22: 341–60.
- Marsot, M, Henry, P-Y, Vourc’h, G, et al. (2012). Which forest bird species are the main hosts of the tick, *Ixodes ricinus*, the vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, during the breeding season? *Int J Parasitol* 42: 781–8.
- Martinot, M, Zadeh, MM, Hansmann, Y, et al. (2011). Babesiosis in immunocompetent

- patients, Europe. *Emerg Infect Dis* 17: 114–6.
- Matuschka, FR, Allgöwer, R, Spielman, A, *et al.* (1999). Characteristics of garden dormice that contribute to their capacity as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *Appl Environ Microbiol* 65: 707–11.
- Matuschka, FR, Eiffert, H, Ohlenbusch, A, *et al.* (1994). Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. *J Infect Dis* 170: 122–7.
- Matuschka, FR, Fischer, P, Heiler, M, *et al.* (1992). Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* 165: 479–83.
- Matuschka, FR, Heiler, M, Eiffert, H, *et al.* (1993). Diversionary role of hoofed game in the transmission of Lyme disease spirochetes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 693–9.
- Matuschka, FR, Schinkel, TW, Klug, B, *et al.* (2000). Relative incompetence of European rabbits for Lyme disease spirochaetes. *Parasitology* 121: 297–302.
- Mead, PS (2015). Epidemiology of Lyme Disease. *Infect Dis Clin North Am* 29: 187–210.
- Medlock, JM, Hansford, KM, Bormane, A, *et al.* (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors* 6: 1.
- Meer-Scherrer, L, Adelson, M, Mordechai, E, *et al.* (2004). *Babesia microti* infection in Europe. *Curr Microbiol* 48: 435–7.
- Mehlhorn, H (2011). Ixodid ticks: world record holders in starvation and blood engorging. *In: Prog. Parasitol.* 336.
- Merhej, V, Raoult, D (2011). Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos Soc* 86: 379–405.
- De Michelis, S, Sewell, HS, Collares-Pereira, M, *et al.* (2000). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 38: 2128–33.
- Miller, JR, Siegert, PY, Amimo, FA, *et al.* (2009). Designation of chemicals in terms of the locomotor responses they elicit from insects: an update of Dethier *et al.* (1960). *J Econ Entomol* 102: 2056–60.
- Milne, A (1950). The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L.; microhabitat economy of the adult tick. *Parasitology* 40: 14–34.
- Ministère des Solidarités et de la Santé (2017). Maladie de Lyme - Maladies infectieuses - Ministère des Solidarités et de la Santé [WWW Document]. 26 avril 2017. URL <http://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-infectieuses/maladie-de-lyme>
- Moniuszko, A, Dunaj, J, Czupryna, P, *et al.* (2015). Neorhlichiosis - a new tick-borne disease - is there a threat in Poland? *Przegląd Epidemiol* 69: 23–6, 131–3.
- Morán Cadenas, F, Rais, O, Jouda, F, *et al.* (2007). Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J Med Entomol* 44: 683–93.
- Mulder, S, van Vliet, AJH, Bron, WA, *et al.* (2013). High risk of tick bites in Dutch gardens. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13: 865–71.
- Musy, A, Soutter, M (1991). *Physique du sol*. PPUR presses polytechniques.
- Narasimhan, S, Rajeevan, N, Liu, L, *et al.* (2014). Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe* 15: 58–71.
- Natura 2000 (2013). *Rhin, Ried, Bruch*.
- Neelakanta, G, Li, X, Pal, U, *et al.* (2007). Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog* 3: e33.
- Nelder, MP, Russell, CB, Sheehan, NJ, *et al.* (2016). Human pathogens associated with the blacklegged tick *Ixodes scapularis*: a systematic review. *Parasit Vectors* 9: 265.

- Neuberger, EWI, Moser, DA, Simon, P (2011). Principle considerations for the use of transcriptomics in doping research. *Drug Test Anal* 3: 668–75.
- Nicholson, MC, Mather, TN (1996). Methods for evaluating Lyme disease risks using geographic information systems and geospatial analysis. *J Med Entomol* 33: 711–20.
- Nilsson, K (2009). Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *J Infect* 58: 79–82.
- Obsomer, V, Wirtgen, M, Linden, A, *et al.* (2013). Spatial disaggregation of tick occurrence and ecology at a local scale as a preliminary step for spatial surveillance of tick-borne diseases: general framework and health implications in Belgium. *Parasit Vectors* 6: 190.
- Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (2016). Le Chevreuil [WWW Document]. URL <http://www.oncfs.gouv.fr/Connaitre-les-especes-ru73/Le-Chevreuil-ar977>
- Office National des Forêts (2016). Les forêts françaises [WWW Document]. URL nf.fr/gestion_durable/sommaire/milieu_vivant/patrimoine/forets_francaises/20071001-133331-958050/@@index.html
- Ogden, NH, Lindsay, LR, Beauchamp, G, *et al.* (2004). Investigation of relationships between temperature and developmental rates of tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field. *J Med Entomol* 41: 622–33.
- Ogden, NH, Lindsay, LR, Hanincová, K, *et al.* (2008). Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol* 74: 1780–90.
- Ogden, NH, Lindsay, LR, Morshed, M, *et al.* (2009). The emergence of Lyme disease in Canada. *CMAJ* 180: 1221–4.
- Ogden, NH, Nuttall, PA, Randolph, SE (1997). Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitology* 115: 591–9.
- Ostfeld, RS (2009). Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 1: 40–3.
- Ostfeld, RS, Brunner, JL (2015). Climate change and *Ixodes* tick-borne diseases of humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Ostfeld, RS, Canham, CD, Oggenfuss, K, *et al.* (2006a). Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in Lyme disease risk. *PLoS Biol* 4: e145.
- Ostfeld, RS, Levi, T, Jolles, AE, *et al.* (2014). Life history and demographic drivers of reservoir competence for three tick-borne zoonotic pathogens. *PLoS One* 9: e107387.
- Ostfeld, RS, Price, A, Hornbostel, VL, *et al.* (2006b). Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. *Bioscience* 56: 383.
- Ozdenerol, E (2015). GIS and Remote Sensing Use in the Exploration of Lyme Disease Epidemiology. *Int J Environ Res Public Health* 12: 15182–203.
- Pages, F, Dautel, H, Duvallet, G, *et al.* (2014). Tick repellents for human use: prevention of tick bites and tick-borne diseases. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14: 85–93.
- Pal, U, Li, X, Wang, T, *et al.* (2004a). TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119: 457–68.
- Pal, U, de Silva, AM, Montgomery, RR, *et al.* (2000). Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest* 106: 561–9.
- Pal, U, Yang, X, Chen, M, *et al.* (2004b). OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J Clin Invest* 113: 220–30.

- Palmer, GH, Bankhead, T, Lukehart, SA (2009). “Nothing is permanent but change” † - antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 11: 1697–705.
- Parola, P, Paddock, CD, Raoult, D (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 18: 719–56.
- Parola, P, Raoult, D (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 32: 897–928.
- Pastula, DM, Smith, DE, Beckham, JD, *et al.* (2016). Four emerging arboviral diseases in North America: Jamestown Canyon, Powassan, chikungunya, and Zika virus diseases. *J Neurovirol* 22: 257–60.
- Patrican, LA (1997). Absence of Lyme disease spirochetes in larval progeny of naturally infected *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) fed on dogs. *J Med Entomol* 34: 52–5.
- Pekova, S, Vydra, J, Kabickova, H, *et al.* (2011). *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69: 266–70.
- Pepin, KM, Eisen, RJ, Mead, PS, *et al.* (2012). Geographic variation in the relationship between human Lyme disease incidence and density of infected host-seeking *Ixodes scapularis* nymphs in the Eastern United States. *Am J Trop Med Hyg* 86: 1062–71.
- Perez-Eid, C (2007). *Les tiques: identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Monographi. Lavoisier, coll.
- Perkins, ME (1992). Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol Today* 8: 28–32.
- Perkins, SE, Cattadori, IM, Tagliapietra, V, *et al.* (2006). Localized deer absence leads to tick amplification. *Ecology* 87: 1981–6.
- Perret, J-L, Guerin, PM, Diehl, PA, *et al.* (2003). Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol* 206: 1809–15.
- Perret, JL, Guigoz, E, Rais, O, *et al.* (2000). Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res* 86: 554–7.
- Petry, WK, Foré, SA, Fielden, LJ, *et al.* (2010). A quantitative comparison of two sample methods for collecting *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) in Missouri. *Exp Appl Acarol* 52: 427–38.
- Pfäffle, M, Littwin, N, Muders, S V, *et al.* (2013). The ecology of tick-borne diseases. *Int J Parasitol* 43: 1059–77.
- Pichon, B, Estrada-Pena, A, Kahl, O, *et al.* (2006). Detection of animal reservoirs of tick-borne zoonoses in Europe. *Int J Med Microbiol* 129–30.
- Piesman, J (1989). Transmission of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Exp Appl Acarol* 7: 71–80.
- Piesman, J (2006). Strategies for reducing the risk of Lyme borreliosis in North America. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl: 17–22.
- Piesman, J, Donahue, JG, Mather, TN, *et al.* (1986). Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field-collected larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 23: 219.
- Piesman, J, Eisen, L (2008). Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol* 53: 323–43.
- Platonov, AE, Karan, LS, Kolyasnikova, NM, *et al.* (2011). Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis* 17: 1816–23.
- Portillo, A, Santibáñez, S, García-Álvarez, L, *et al.* (2015). Rickettsioses in Europe. *Microbes Infect* 17: 834–8.
- Poupon, M-A, Lommano, E, Humair, P-F, *et al.* (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi*

- sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 72: 976–9.
- Price, TD, Qvarnström, A, Irwin, DE (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proc Biol Sci* 270: 1433–40.
- Pritt, BS, Mead, PS, Johnson, DKH, *et al.* (2016a). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 16: 556–64.
- Pritt, BS, Respicio-Kingry, LB, Sloan, LM, *et al.* (2016b). *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int J Syst Evol Microbiol* 66: 4878–80.
- Pruneau, L, Moumène, A, Meyer, DF, *et al.* (2014). Understanding *Anaplasmataceae* pathogenesis using “Omics” approaches. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 86–93.
- Pucek, Z, Jędrzejewski, W, Jędrzejewska, B, *et al.* (1993). Rodent population dynamics in a primeval deciduous forest (Białowieża National Park) in relation to weather, seed crop, and predation. *Acta Theriol (Warsz)* 38: 199–232.
- R core team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [WWW Document]. URL <http://www.r-project.org/>.%0DRéseau Sentinelle : <https://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb%0D>
- Radolf, JD, Caimano, MJ, Stevenson, B, *et al.* (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 10: 87–99.
- Radulović, Z, Chochlakis, D, Tomanović, S, *et al.* (2011). First detection of spotted fever group *Rickettsiae* in ticks in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 111–5.
- Ramamoorthi, N, Narasimhan, S, Pal, U, *et al.* (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436: 573–7.
- Ramos, RAN, Campbell, BE, Whittle, A, *et al.* (2015). Occurrence of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis*.
- Ramos, RAN, Giannelli, A, Lia, RP, *et al.* (2014). Incidence of *Cercopithifilaria baina* in dogs and probability of co-infection with other tick-borne pathogens. *PLoS One* 9: e88198.
- Rand, PW, Lubelczyk, C, Holman, MS, *et al.* (2004). Abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) after the complete removal of deer from an isolated offshore island, endemic for Lyme Disease. *J Med Entomol* 41: 779–84.
- Rand, PW, Lubelczyk, C, Lavigne, GR, *et al.* (2003). Deer density and the abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 40: 179–84.
- Randolph, S. (1997). Abiotic and biotic determinants of the seasonal dynamics of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* in South Africa. *Med Vet Entomol* 11: 25–37.
- Randolph, SE (2004). Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* 129: S37–65.
- Randolph, SE (2010). Human activities predominate in determining changing incidence of tick-borne encephalitis in Europe. *Euro Surveill* 15: 24–31.
- Randolph, SE, Green, RM, Hoodless, a N, *et al.* (2002). An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 32: 979–89.
- Rauter, C, Hartung, T (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe : a metaanalysis prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe : a metaanalysis 71:7203-

- Reis, C, Cote, M, Paul, REL, *et al.* (2011). Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 907–16.
- Reye, AL, Hübschen, JM, Sausy, A, *et al.* (2010). Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol* 76: 2923–31.
- Reye, AL, Stegny, V, Mishaeva, NP, *et al.* (2013). Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS One* 8: e54476.
- Richter, D, Allgöwer, R, Matuschka, F-R (2002). Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg Infect Dis* 8: 1421–5.
- Richter, D, Allgöwer, R, Matuschka, F-R (2003). Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii* (In Reply to Randolph and Gern). *Emerg Infect Dis* 9: 895–6.
- Richter, D, Matuschka, F-R (2012). “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” *Anaplasma phagocytophilum*, and lyme disease spirochetes in questing european vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin Microbiol* 50: 943–7.
- Rigaud, E, Jaulhac, B, Garcia-Bonnet, N, *et al.* (2016). Seroprevalence of seven pathogens transmitted by the *Ixodes ricinus* tick in forestry workers in France. *Clin Microbiol Infect* 22: 735.e1-735.e9.
- Rijpkema, S, Golubić, D, Molkenboer, M, *et al.* (1996). Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol* 20: 23–30.
- Rizzoli, A, Hauffe, H, Carpi, G, *et al.* (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 16: 19906.
- Rizzoli, A, Hauffe, HC, Tagliapietra, V, *et al.* (2009). Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. *PLoS One* 4: e4336.
- Rizzoli, A, Silaghi, C, Obiegala, A, *et al.* (2014). *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Heal* 2: 251–75.
- Rodhain, F, Perez-Eid, C (1985). *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Maloine. Paris.
- Rosef, O, Paulauskas, A, Radzijeuskaja, J (2009). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta Vet Scand* 51: 47.
- Rudenko, N, Golovchenko, M, Grubhoffer, L, *et al.* (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* 2: 123–8.
- Rudolph, D, Knülle, W (1979). Mechanisms contribution to water balance in non-feeding ticks and their ecological implications. In: *Recent Adv. Acarol.* (Rodriguez, J ed.). New York, 375–83.
- Ruebush, TK, Juranek, DD, Chisholm, ES, *et al.* (1977). Human babesiosis on Nantucket Island. Evidence for self-limited and subclinical infections. *N Engl J Med* 297: 825–7.
- Ruiz-Fons, F, Fernández-de-Mera, IG, Acevedo, P, *et al.* (2012). Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Appl Environ Microbiol* 78: 2669–76.
- Ruiz-Fons, F, Gilbert, L (2010). The role of deer as vehicles to move ticks, *Ixodes ricinus*, between contrasting habitats. *Int J Parasitol* 40: 1013–20.

- Rymaszewska, A, Piotrowski, M (2013). Use of DNA sequences for *Rickettsia* identification in *Ixodes ricinus* ticks: the first detection of *Rickettsia monacensis* in Poland. *Microbes Infect* 15: 140–6.
- Salkeld, DJ, Cinkovich, S, Nieto, NC (2014). Tick-borne pathogens in northwestern California, USA. *Emerg Infect Dis* 20: 493–4.
- Santé Publique France (2015). Réseau Sentinelles; France; Surveillance continue [WWW Document]. 2017. URL <https://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?page=maladies&mal=18>
- Santé Publique France (2017). Données épidémiologiques / Borréliose de lyme / Maladies à transmission vectorielle / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil [WWW Document]. URL <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Borreliose-de-lyme/Donnees-epidemiologiques>
- Santé Publique France (2017). Etude réseau ALSA(CE)TIQUE 2014-2015 / Grand Est / Santé publique France dans votre région / Régions et territoires / Accueil [WWW Document]. 27 Sept 2016. URL <http://invs.santepubliquefrance.fr/Regions-et-territoires/Sante-publique-France-dans-votre-region/Grand-Est/Etude-reseau-ALSA-CE-TIQUE-2014-2015>
- Sarih, M, Jouda, F, Gern, L, *et al.* (2003). First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3: 133–9.
- Sato, Y, Nakao, M (1997). Transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected immature *Ixodes persulcatus* during cofeeding on mice. *J Parasitol* 83: 547–50.
- Sauer, JR, McSwain, JL, Bowman, AS, *et al.* (1995). Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol* 40: 245–67.
- Schotthoefer, AM, Frost, HM (2015). Ecology and epidemiology of Lyme borreliosis. *Clin Lab Med* 35: 723–43.
- Schramm, F, Grillon, A, Martino, S De, *et al.* (2013). La borréliose de Lyme. *Rev Francoph des Lab* 2013: 35–49.
- Schulze, TL, Jordan, RA, Hung, RW (1997a). Biases associated with several sampling methods used to estimate abundance of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 34: 615–23.
- Schulze, TL, Jordan, RA, Hung, RW (1997b). Biases associated with several sampling methods used to estimate abundance of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 34: 615–23.
- Sekeyova, Z, Subramanian, G, Mediannikov, O, *et al.* (2012). Evaluation of clinical specimens for *Rickettsia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Anaplasma*, *Franciscella* and *Diplorickettsia* positivity using serological and molecular biology methods. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64: 82–91.
- Simon, JA, Marrotte, RR, Desrosiers, N, *et al.* (2014). Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evol Appl* 7: 750–64.
- Skrabalo, Z, Deanovic, Z (1957). Piroplasmiasis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop* 9: 11–6.
- Skuballa, J, Oehme, R, Hartelt, K, *et al.* (2007). European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp., Germany. *Emerg Infect Dis* 13: 952–3.
- Socolovschi, C, Mediannikov, O, Raoult, D, *et al.* (2009). Update on tick-borne bacterial diseases in Europe. *Parasite* 16: 259–73.
- Solberg, VB, Neidhardt, K, Sardelis, MR, *et al.* (1992). Quantitative evaluation of sampling

- methods for *Ixodes dammini* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 29: 451–6.
- Sonenshine, D (1991). *Biology of ticks*. Oxford Uni. New York.
- Sonenshine, D, DeMar, T, Carson, K (1986). Chemically mediated behavior in acari: Adaptations for finding host and mates. *J Chem Ecol* 1091–106.
- Sonenshine, DE (2006). Tick pheromones and their use in tick control. *Annu Rev Entomol* 51: 557–80.
- Sonenshine, DE, Mather, TN (1993). *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. Oxford Uni. Oxford, U.K.
- Sonenshine, DE, Roe, M (2014). *Biology of Ticks*. 2nd ed. Oxford University Press: New York.
- Sormunen, JJ, Penttinen, R, Klemola, T, *et al.* (2016). Tick-borne bacterial pathogens in southwestern Finland. *Parasit Vectors* 9: 168.
- Spielman, A, Wilson, ML, Levine, JF, *et al.* (1985). Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. *Annu Rev Entomol* 30: 439–60.
- Stafford, KC (1994). Survival of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) at different relative humidities. *J Med Entomol* 31: 310–4.
- Stafford, KC, Denicola, AJ, Kilpatrick, HJ (2003). Reduced abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and the tick parasitoid *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) with reduction of white-tailed deer. *J Med Entomol* 40: 642–52.
- Stafford III, KC (2007). *Tick Management Handbook An integrated guide for homeowners, pest control operators, and public health officials for the prevention of tick-associated disease Revised Edition The Connecticut Agricultural Experiment Station Acknowledgements*.
- Stanek, G, Fingerle, V, Hunfeld, K-P, *et al.* (2011). Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 17: 69–79.
- Stanek, G, Reiter, M (2011). The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect* 17: 487–93.
- Stanek, G, Wormser, GP, Gray, J, *et al.* (2012). Lyme borreliosis. *Lancet* 379: 461–73.
- Steere, A, Hardin, J, Malawista, S (1978). Lyme arthritis: a new clinical entity. *Hosp Pr* 143–58.
- Steere, AC, Sikand, VK, Meurice, F, *et al.* (1998). Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Lipoprotein A with adjuvant. *N Engl J Med* 339: 209–15.
- Stewart, PE, Byram, R, Grimm, D, *et al.* (2005). The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* 53: 1–13.
- Strickman, D (2009). *Prevention of bug bite, stings and disease*. Oxford Uni.
- Strnad, M, Hönig, V, Růžek, D, *et al.* (2017). Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol* AEM.00609-17.
- Stuen, S (2003). *Anaplasma phagocytophilum* infection in sheep and wild ruminants in Norway. A study on clinical manifestation, distribution and persistence.
- Stuen, S, Granquist, EG, Silaghi, C (2013). *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 31.
- Suss, J (2008). Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13: 717–27.
- Svendsen, CBS (2011). Is sarcoidosis a rickettsiosis? *Dan Med Bull* 58: B4249.

- Swanson, SJ, Neitzel, D, Reed, KD, *et al.* (2006). Coinfections acquired from ixodes ticks. *Clin Microbiol Rev* 19: 708–27.
- Swart, A, Ibañez-Justicia, A, Buijs, J, *et al.* (2014). Predicting tick presence by environmental risk mapping. *Front public Heal* 2: 238–44.
- Tack, W, Madder, M, Baeten, L, *et al.* (2012). The abundance of *Ixodes ricinus* ticks depends on tree species composition and shrub cover. *Parasitology* 139: 1273–81.
- Tack, W, Madder, M, Baeten, L, *et al.* (2013). Shrub clearing adversely affects the abundance of *Ixodes ricinus* ticks. *Exp Appl Acarol* 60: 411–20.
- Tagliapietra, V, Rosà, R, Arnoldi, D, *et al.* (2011). Saturation deficit and deer density affect questing activity and local abundance of *Ixodes ricinus* (Acari, *Ixodidae*) in Italy. *Vet Parasitol* 183: 114–24.
- Tälleklint-Eisen, L, Lane, RS (2009). Spatial and temporal variation in the density of *Ixodes pacificus* (Acari: *Ixodidae*) nymphs. [http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X\(2009\)029\[0272:SATVIT\]20CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X(2009)029[0272:SATVIT]20CO;2) 2: 272–80.
- Tälleklint, L, Jaenson, TG (1993). Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents. *J Med Entomol* 30: 273–6.
- Tälleklint, L, Jaenson, TG (1994). Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*), in Sweden. *J Med Entomol* 31: 880–6.
- Taragel'ová, V, Koci, J, Hanincová, K, *et al.* (2008). Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 74: 1289–93.
- Taylor, LR (1961). Aggregation, Variance and the Mean. *Nature* 189: 732–5.
- Telford, SR, Goethert, HK, Molloy, PJ, *et al.* (2015). *Borrelia miyamotoi* disease. *Clin Lab Med* 35: 867–82.
- Telford, SR, Mather, TN, Moore, SI, *et al.* (1988). Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *Am J Trop Med Hyg* 39: 105–9.
- Toma, B, Bénot, J, Dufour, B, *et al.* (1991). *Glossaire d'épidémiologie animale*. Point vété. Maison-Alfort.
- Tomkins, JL, Aungier, J, Hazel, W, *et al.* (2014). Towards an evolutionary understanding of questing behaviour in the tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One* 9: e110028.
- Trollmo, C, Meyer, AL, Steere, AC, *et al.* (2001). Molecular mimicry in Lyme arthritis demonstrated at the single cell level: LFA-1 alpha L is a partial agonist for outer surface protein A-reactive T cells. *J Immunol* 166: 5286–91.
- Tsatsaris, A, Chochlakis, D, Papadopoulos, B, *et al.* (2016). Species composition, distribution, ecological preference and host association of ticks in Cyprus. *Exp Appl Acarol* 70: 523–42.
- US Department of Commerce, NO and AA (2017). What is remote sensing? [WWW Document]. URL <https://oceanservice.noaa.gov/facts/remotesensing.html>
- Vail, SG, Smith, G (1998). Air temperature and relative humidity effects on behavioral activity of blacklegged tick (Acari: *Ixodidae*) nymphs in New Jersey. *J Med Entomol* 35: 1025–8.
- Vandenesch, A, Turbelin, C, Couturier, E, *et al.* (2014). Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. *Eurosurveillance* 19: 20883–91.
- Vannier, E, Gewurz, BE, Krause, PJ (2008). Human babesiosis. *Infect Dis Clin North Am* 22: 469–88, viii–ix.
- Vassallo, M, Paul, REL, Pérez-Eid, C (2000a). Temporal distribution of the annual nymphal stock of *Ixodes ricinus* ticks. *Exp Appl Acarol* 24: 941–9.
- Vassallo, M, Pichon, B, Cabaret, J, *et al.* (2000b). Methodology for sampling questing

- nymphs of *Ixodes Ricinus* (Acari: *Ixodidae*), the principal vector of Lyme disease in Europe. *J Med Entomol* 37: 335–9.
- Vayssier-Taussat, M, Moutailler, S, Michelet, L, *et al.* (2013). Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe. *PLoS One* 8: e81439.
- Vázquez, M, Muehlenbein, C, Cartter, M, *et al.* (2008). Effectiveness of personal protective measures to prevent Lyme disease. *Emerg Infect Dis* 14: 210–6.
- Voordouw, MJ (2015). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* 142: 290–302.
- Vorou, RM, Papavassiliou, VG, Tsiodras, S (2007). Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. *Epidemiol Infect* 135: 1231–47.
- Vourc'h, G, Abrial, D, Bord, S, *et al.* (2016). Mapping human risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis, in a periurban forest in France. *Ticks Tick Borne Dis* 7: 544–652.
- Wagemakers, A, Staarink, PJ, Sprong, H, *et al.* (2015). *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.*
- Waladde, S, Rice, M (1982). The sensory basis of tick feeding behavior. In: *Physiol. ticks* (Obenchain, F, Galun, R eds). New York, 71.
- Wedderburn, R (1974). Quasi-likelihood functions, generalized linear function models, and the Gauss-Newton method. *Biometrika* 439–47.
- Welinder-Olsson, C, Kjellin, E, Vaht, K, *et al.* (2010). First case of human “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol* 48: 1956–9.
- White, DJ, Talarico, J, Chang, HG, *et al.* (1998). Human babesiosis in New York State: Review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. *Arch Intern Med* 158: 2149–54.
- Wielinga, PR, Fonville, M, Sprong, H, *et al.* (2009). Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003–2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 119–22.
- Wilking, H, Stark, K (2014). Trends in surveillance data of human Lyme borreliosis from six federal states in eastern Germany, 2009–2012. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 219–24.
- Wilske, B (2003). Diagnosis of lyme borreliosis in europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3: 215–27.
- Wilson, K (2001). Heterogeneities in macroparasite infections: pattern and processes. In: *Ecol. Wildl. Dis.* 6–44.
- Wood, CL, Lafferty, KD (2013). Biodiversity and disease: a synthesis of ecological perspectives on Lyme disease transmission. *Trends Ecol Evol* 28: 239–47.
- Xu, G, Fang, QQ, Keirans, JE, *et al.* (2003). Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J Parasitol* 89: 452–7.
- Yang, Z, Hardin, JW, Addy, CL, *et al.* (2007). Testing approaches for overdispersion in poisson regression versus the generalized poisson model. *Biom J* 49: 565–84.
- Younsi, H, Postic, D, Baranton, G, *et al.* (2001). High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *Eur J Epidemiol* 17: 53–6.
- Zhioua, E, Heyer, K, Browning, M, *et al.* (1999). Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* variety kurstaki to *Ixodes scapularis* (Acari: *Ixodidae*). *J Med Entomol* 36: 900–2.
- Zilber, L (1939). Spring-summer tick-borne encephalitis. *Arkiv Biol Nauk* 255–61.

Annexes

ANNEXE 1 :

Définition des cas selon l'EUCALB en 1996 pour l'enquête épidémiologique du Réseau Sentinelle de 2001 à 2003 :

(http://www.invs.sante.fr/publications/2005/lyme_alsace/rapport_lyme.pdf)

Les cas certains correspondaient à la définition de la maladie de Lyme adoptée par EUCALB en 1996 après consultation d'experts et de biologistes de 12 pays européens.

Ont été définis comme cas certains :

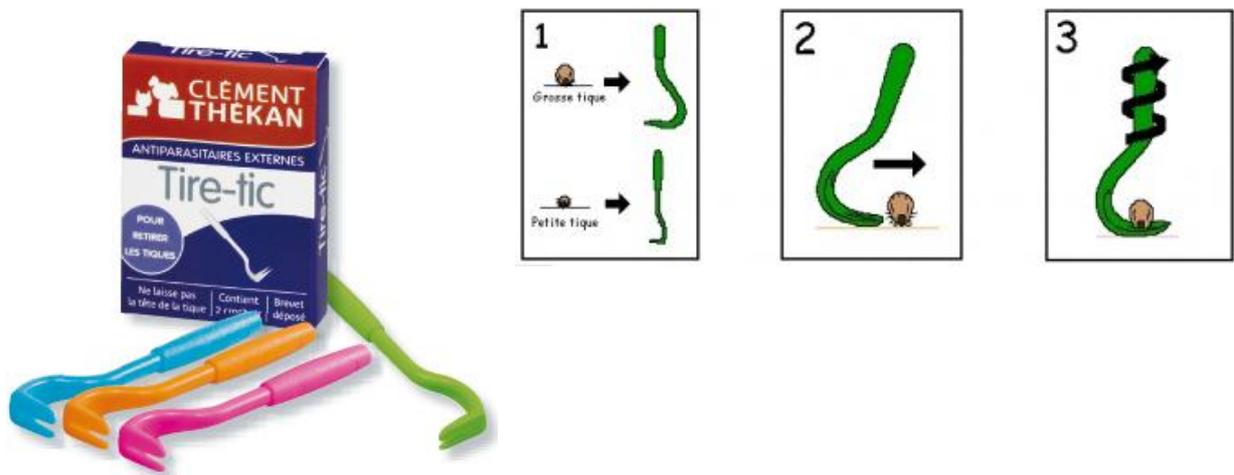
- érythème cutané migrant (EM) de diamètre supérieur ou égal à 5 cm vu et diagnostiqué par le médecin dans les trois mois après la morsure de tique ou après le début des signes cliniques ;
- ou arthrite avec sérologie positive ;
- ou atteinte cardiaque avec sérologie positive ;
- ou atteinte cutanée secondaire avec sérologie positive ;
- ou atteinte neurologique avec sérologie positive (sanguine ou dans le LCR) avec présence de lymphocytose dans le LCR et/ou synthèse intrathécale des anticorps.

Ont été définis cas possibles :

- EM signalé à l'anamnèse mais non vu par le médecin ;
- Ou EM diagnostiqué plus de trois mois après la morsure de tique ou après les premiers signes cliniques ;
- Ou arthralgie avec sérologie positive ;
- Ou atteinte neurologique avec sérologie positive (sanguine ou dans le LCR) mais avec absence de lymphocytose ou de synthèse intrathécale des anticorps ;
- Ou toute forme secondaire et/ou tertiaire avec sérologie négative en ELISA et positive en Western-blot

Ont été exclus les cas qui ne répondaient pas à ces définitions, ou dont le diagnostic était antérieur au début de l'étude, ou ayant une sérologie positive sans signe clinique ou présentant des manifestations secondaires ou tertiaires avec sérologie ELISA et/ou Western Blot négatifs.

ANNEXE 2 : Photographie d'un Tire-Tic® (<http://www.carevox.fr/medicaments-soins/article/conseils-pour-enlever-une-tique-et>)



ANNEXE 3: Photos prises par les géologues : profil d'un sol investigué : épaisseur de l'horizon A (3 cm) exemple du site de Rimbach



ANNEXE 4 : Densités en nymphes infectées pour les différents sites investigués en mai et juin 2013 et 2014

Mois	Lieu	Densité en nymphes infectées par 100 m ²		
		2013	2014	
Mai	Illkirch	1	3	
	Pourtalès	2	0	
	Dannemarie	1	0,3	
	Daubensand	NR	7	
	Vallée de Guebwiller			
	Rimbach	11	0,7	
	Appenthal	9	11,7	
	Murbach	35	8,2	
	Vallée de Munster			
	Wasserbourg	10	2,7	
	Firtsplan	14	2,5	
	Sattel	NA	1,6	
Chêne Voltaire	6	0		
Juin	Illkirch	6	2,0	
	Pourtalès	10	7,2	
	Dannemarie	<1	0,3	
	Daubensand	<1	0,3	
	Vallée de Guebwiller			
	Rimbach	13	0,7	
	Appenthal	17	3,3	
	Murbach	62	13,2	
	Vallée de Munster			
	Wasserbourg	6	1,2	
	Firtsplan	39	1,8	
	Sattel	4	0,5	
Chêne Voltaire	0	1,3		

MALADIES VECTORIELLES

Les connaître pour se protéger



MALADIE DE LYME

ET PRÉVENTION DES PIQÛRES DE TIQUES

Epidémiologie vectorielle de la borréliose de Lyme en France

Résumé

Les maladies à tiques posent un problème majeur que se soit du point de vue de la santé animale ou de la santé humaine. Parmi ces pathologies, la borréliose de Lyme est la maladie à transmission vectorielle la plus fréquente de l'Hémisphère Nord et, en France, l'Alsace représente l'une des régions avec la plus forte incidence.

Ce travail de thèse a eu pour objectif d'évaluer les densités en nymphes ainsi que les taux d'infection à *Borrelia burgdorferi* s1 et *Anaplasma phagocytophilum* dans cette région. Nous avons comparé nos résultats à ceux établis dans cette même région en 2003 et 2004. De plus nous avons étudié les facteurs environnementaux potentiellement responsables de la variabilité inter-site de la densité en nymphes et également cartographié le risque de borréliose de Lyme en Alsace.

Notre travail, qui pour l'instant a été conduit en Alsace, tend à s'étendre à d'autres régions de France. Il nous paraît pertinent de poursuivre les études de terrains sur certains sites pris en compte dans ce travail de façon à objectiver les tendances observées dans notre région.

Mots-clés : *I. ricinus*, borréliose de Lyme, facteurs environnementaux, Alsace

Abstract

Vector-borne diseases are today a major threat for human and animal health. Among those diseases, Lyme borreliosis is the most frequent vector-borne disease occurring in the Northern hemisphere, and the numbers of humans affected have been increasing in some parts of the world. In France, Lyme borreliosis is endemic to several regions including the Alsace region. The aim of this work was to investigate nymph densities and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* s1 and *Anaplasma phagocytophilum* in this region. We compared our results to those obtained by Ferquel et al. in 2003 and 2004. We studied environmental factors involved in inter-site nymph density variability and mapped Lyme borreliosis nymph density in Alsace.

For instance our work that has been conducted in Alsace, is now extended in other region of France. It will be interesting to validate our results with data from other area.

Keywords : *I. ricinus*, Lyme, borreliosis environmental factors, Alsace

