(FACEBOOK, 2018) (ANSES, 2021) (APPLI UNIVLORRAINE, 2020)

Rapport de stage de fin d'année sur la prévalence des agents pathogènes transmis par les tiques dans les tiques *Ixodes ricinus* prélevées à Gardouch

Manipulations effectuées au sein de l'UMR BIPAR, au Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maisons-Alfort du 03/05/21 au 23/07/21

Rapport présenté par : MAZURIER Perrine

Année 2020-2021, DUT Génie biologique option Agronomie

MAZURIER Perrine

Rapport de stage de fin d'année sur la prévalence des agents pathogènes transmis par les tiques dans les tiques *Ixodes ricinus* prélevées à Gardouch

Comment déterminer le risque réel pour l'homme vis-à-vis de la maladie de Lyme par le taux d'exposition des chevreuils en représentant la densité et la prévalence des tiques prélevées en grand nombre dans une seule région donnée.

Remerciement

Pour commencer je remercie Monsieur Franck DAVID, président de l'Entente de Lutte et d'intervention contre les Zoonoses pour m'avoir accueilli dans leur structure.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon maître de stage, Monsieur Benoit COMBES pour m'avoir accepté au sein de son entreprise et pour avoir répondu à toutes mes questions. Ainsi qu'à Matthieu BASTIEN pour son accompagnement et son écoute.

Je tiens aussi à remercier Clémence GALON, chargée de projet scientifique et technique à l'ANSES de Maisons-Alfort, pour m'avoir accueillie et expliquée très clairement les manipulations à faire.

Ainsi que Sara MOUTAILLER, cheffe de projet de Recherche à l'ANSES Maisons Alfort, Directrice de l'UMR BIPAR pour ses conseils et sa bienveillance.

Je remercie également toutes les techniciennes et techniciens du laboratoire de l'ANSES pour m'avoir intégrée rapidement dans leur équipe, pour leurs conseils avisés et tout cela dans un cadre très chaleureux.

Je remercie aussi Monsieur Gaël CARO, mon tuteur de stage pour avoir répondu à mes interrogations durant mon stage.

Sommaire

1. Table des abréviations et des sigles

2. Présentation de l'entreprise

3. Introduction

4. Démarche méthodologie

    4.1 Matériel biologique
    4.2- Extraction ADN
    4.3- Pré-amplification de l'ADN
    4.4- PCR en temps réel microfluidiques
    4.5- PCR et Nested PCR de confirmation

5. Résultats

6. Discussion et interprétations

7. Conclusion

8. Bibliographie

9. Table des Annexes

    Annexe I : Protocole d'extraction d'ADN
    Annexe II : Exemple de protocole de PCR de confirmation
    Annexe III : Liste des amorces utilisées pour les PCR de confirmation
    Annexe IV : Tableau montrant les résultats de séquençage

1-Table des abréviations et des sigles

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

ANSES : Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Bbsl *: Borrelia burgdorferi sensu lato*

CNR : Centre National de Référence

EID : l'Entente Interdépartementale de Lutte contre la rage

ELIZ : Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses

EnvA : École nationale vétérinaire d'Alfort

ERZ : l'Entente Rage et Zoonoses

I. ricinus : Ixodes Ricinus

LNR : Laboratoire National de Référence

LR-UE : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne

EPI : épidémiologie

UMR 956 BIPAR : Unité mixte de recherche Biologie et Immunologie parasitaires (ANSES, INRAE, EnvA)

UMR 1161 : Unité mixte de recherche virologie (ANSES, EnvA, INRAE)

UZB : Unité de zoonoses bactériennes

2- Présentation de l'entreprise

J'ai réalisé mon stage au sein de l'institution interdépartementale ELIZ, Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses situé à Malzéville au Domaine de Pixérécourt. C'est une collectivité territoriale travaillant avec plusieurs départements adhérents. Créé en 1973 l'Entente Interdépartementale de Lutte contre la rage (EID) avait pour objectif de trouver les moyens de lutter contre la rage. Puis elle s'est engagée dans le suivi, la connaissance et la surveillance de lutte contre de nouvelles zoonoses dans les années 2000 comme l'échinococcose alvéolaire. Elle a ainsi changé de nom pour s'appeler l'Entente Rage et Zoonoses (ERZ). A la suite d'un conseil d'Administration en avril 2012, il a été décidé que l'ERZ deviendrait l'Entente de Lutte Interdépartemental contre les zoonoses (ELIZ). Six ans plus tard à la suite du passage en syndicat mixte ouvert l'ELIZ devient l'Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses.

Cette dernière s'occupe principalement de contrôler et surveiller les cas de rage, néanmoins, aujourd'hui elle joue un rôle important dans la surveillance épidémiologique des zoonoses sur le territoire français. Ainsi les équipes s'occupent de contrôler, de surveiller et de sensibiliser sur plusieurs maladies telles que l'échinococcose alvéolaire, la maladie de Lyme, la leptospirose et sont actuellement en train de s'intéresser aux moustiques tigres, vecteurs potentiels des virus de la dengue et du chikungunya. Chaque département choisit de participer ou non au programme proposé en le subventionnant. Quant au projet portant sur la maladie de Lyme et visant à utiliser le chevreuil comme sentinelle du risque associé aux maladies à tiques, il regroupe actuellement une vingtaine de départements et est mené en collaboration avec l'UMR BIPAR, au Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maisons-Alfort. C'est d'ailleurs dans ce cadre que s'inscrit mon stage.

L'équipe ELIZ est composée de trois personnes en permanence : Monsieur Benoît COMBES le directeur, Monsieur Matthieu BASTIEN, le directeur adjoint aux affaires scientifiques et techniques ainsi que Stéphanie FAVIER Technicienne qui s'occupe de l'administratif (cf Figure 1). De plus, cette équipe peut être renforcée par des techniciens, des services civiques et des stagiaires ingénieurs ou techniciens lorsque que les programmes l'imposent.

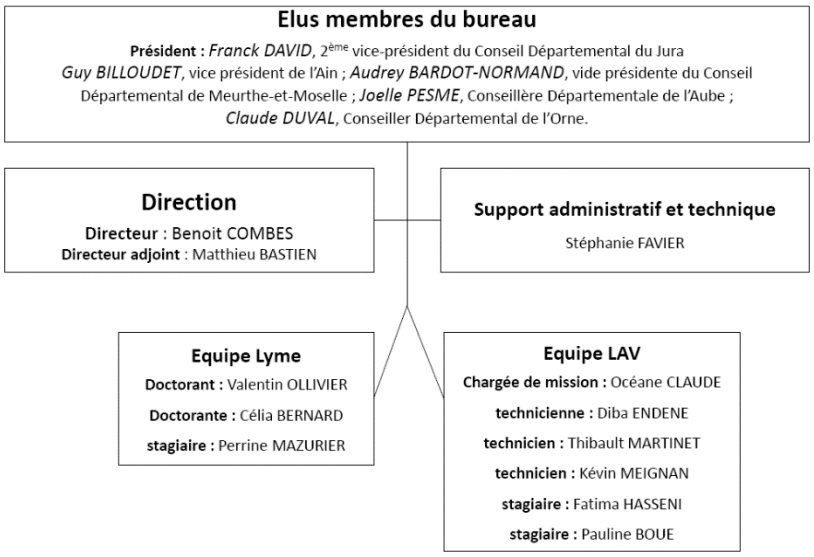

Figure 1 : Organigramme de ELIZ (Matthieu BASTIEN)

J'ai effectué toutes les expérimentations à l'ANSES de Maisons-Alfort. L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) est chargée de la sécurité sanitaire en France. Il s'agit d'un établissement public ayant pour objectif d'évaluer des risques dans différents domaines tels que l'alimentation, l'environnement et le travail. Cette dernière a été créée par la fusion de l'AFSSA (agence française de sécurité sanitaire des aliments) et de l'AFSSET (agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) en 2010. Le laboratoire de santé animale de l'ANSES se situe à Maisons-Alfort au sein du campus de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA). Il a été le premier laboratoire, au niveau mondial, créé et engagé dans la lutte contre les maladies infectieuses et contagieuses chez les animaux. Il se caractérise par une activité de référence forte (laboratoire national de référence [LNR], centre national de référence [CNR], laboratoire de référence de l'Union Européenne [LR-UE], …) et collabore avec d'autres organismes comme l'INRAE, l'EnvA et des universités. Les travaux principaux de ce laboratoire sont la maîtrise des grandes épizooties (fièvre aphteuse, fièvre catarrhale ovine…), des zoonoses bactériennes, virales et parasitaires ainsi que des maladies infectieuses animales émergentes pluri-espèces comme le virus de Schmallenberg. Il est constitué de quatre unités : EPI (épidémiologie), UZB (bactériologie), UMR BIPAR (parasitologie) et UMR Virologie (cf Figure 2)

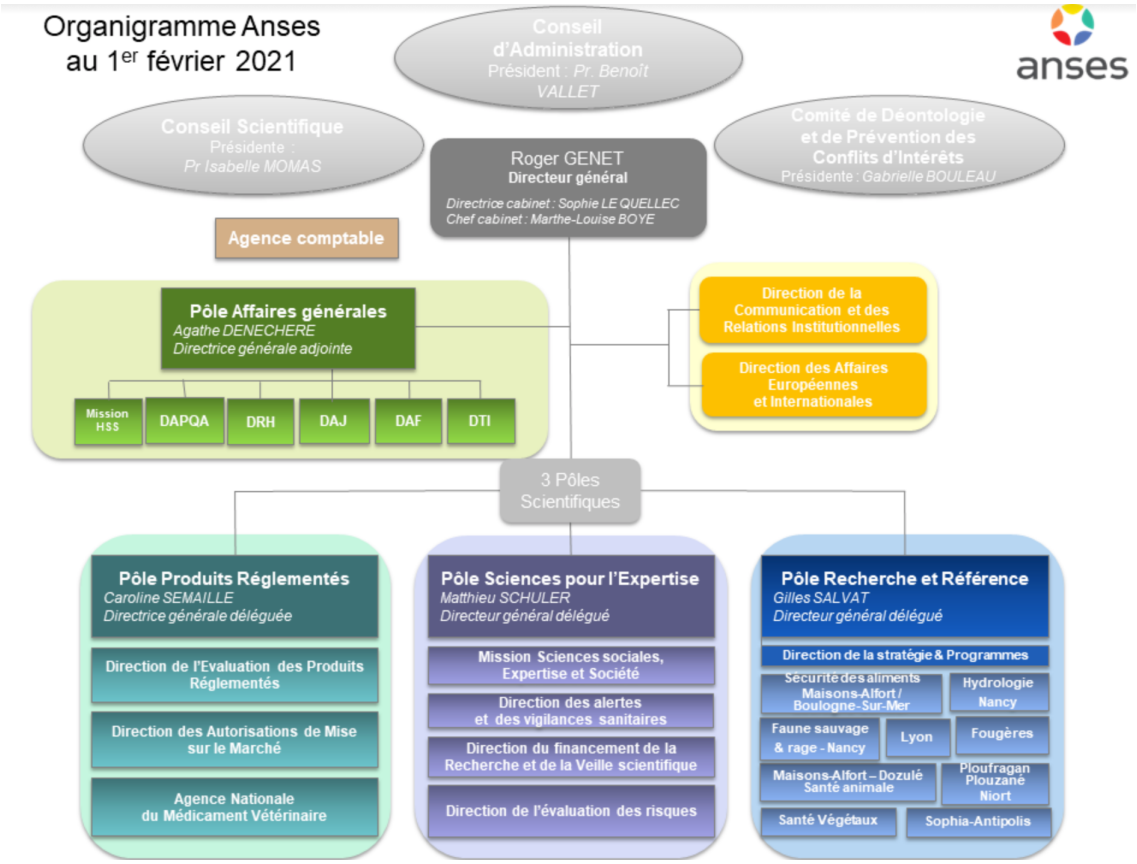

Figure 2 : Organigramme de l'ANSES au 1er février 2021 (ANSES, 2021)

3- Introduction

Dans le cadre de ma dernière année d'IUT génie biologique option Agronomie, j'ai effectué un stage d'une durée de 3 mois à l'ANSES-Laboratoire de Santé Animale-UMR BIPAR, partenaire de l'établissement ELIZ pour les projets portant sur les tiques.

Ces dernières sont des arthropodes hématophages stricts, ectoparasites des vertébrés. Elles sont présentes sur tous les continents (McCoy et Boulanger, 2015) et sont sensibles aux conditions météorologiques. A ce jour on compte 896 espèces de tiques connues divisées en trois familles : les tiques molles (famille des *Argasidae* caractérisées par un tégument souple) ; les tiques dures (famille des *Ixodidae* qui regroupe 80 % de l'ensemble des espèces et se caractérisent par un tégument rigide et lisse) et la dernière famille des *Nuttaliellidae* qui sont très rares et ne comporte qu'une seule espèce ayant une morphologie intermédiaire aux deux premières.

En Europe, les tiques dures ont une importance majeure en santé animale et humaine. Les tiques *Ixodidae* ont un mode de vie dit exophile, elles ont ainsi plus de chances de rencontrer les hommes dans les habitats semi-ouverts ou ouverts comme les forêts. Trois types de cycles existent impliquant un à trois hôtes que l'on qualifie de monophasique, diphasique et triphasique. Néanmoins, toutes les tiques passent par trois stases au cours de leur vie : la stase larvaire, la stase nymphale et enfin la stase adulte (cf Figure 3).

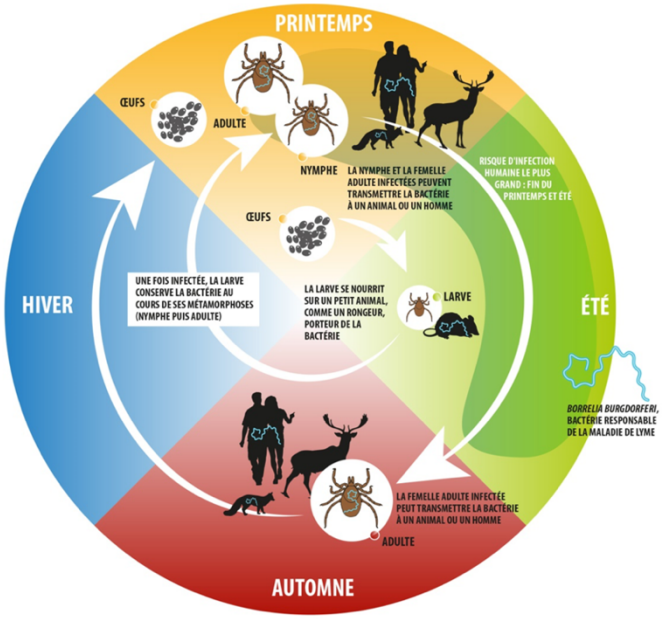

Figure 3 : Schéma représentant le cycle des tiques (*Ixodes ricinus)* (INRAE, 2020)

Néanmoins, même si les tiques ont un fort pouvoir reproducteur, la probabilité de survie des pontes est faible selon Foldvari et al en 2016. En effet, seulement 10% de la ponte deviendront des adultes (Randolph, 1998 ; Sprong et al, 2018). Hermann et Gern en 2015 expliquent que cela est dû au fait que les tiques passent 90 à 99% de leur temps soit dans leur environnement en diapause lors des conditions météorologiques défavorables soit à la recherche de leurs hôtes pour se nourrir.

La recherche d'hôtes pour se nourrir est donc essentielle aux tiques. Elles vont localiser leur hôte grâce à la chimio-sensation en captant des molécules émises par les animaux. Tous cela, en utilisant leurs chémorécepteurs situés sur l'organe de Haller qui se trouve uniquement sur leurs premières pattes (Carr et al, 2017). Puis elles vont utiliser la technique « d'embuscade » pour grimper sur la végétation alentour pour attendre le passage d'un animal ou d'un Homme. Pour

cela, elles mettent leurs pattes en avant pour pouvoir s'accrocher à leur hôte. C'est en piquant ces derniers qu'elles peuvent potentiellement les contaminer.

La tique est connue pour être le second vecteur transmettant le plus d'agents infectieux après le moustique. En Europe, la tique *Ixodes ricinus,* qui présente une très large aire de répartition et se gorge sur de nombreux hôtes est considéré comme la tique vectrice majeure. Ces dernières transmettent ainsi une grande variété d'agents pathogènes responsables d'importantes maladies du bétail, des animaux de compagnie et des humains (Nicholson et al, 2019 ; Jongejan et Uilenberg, 2004). Ces maladies que l'on nomme vectorielles font partie des zoonoses, maladies transmises de l'animal à l'homme. Ainsi parmi ces agents pathogènes zoonotiques, on trouve des bactéries du genre *Borrelia* et plus précisément du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato *(Bbsl)* transportées plus particulièrement par les tiques *Ixodes ricinus* en Europe. Ces bactéries une fois transmises à l'Homme sont responsables de la maladie de Lyme, pour laquelle il existe des antibiotiques pour traiter l'infection mais pas de vaccin pour la prévention.

Aux États-Unis, une approche sérologique a été développée sur les cerfs de Virginie et ceux-ci montrent une réponse immunitaire détectable vis-à-vis de *Borrelia* (Magnarelli et al., 2004), ces animaux peuvent donc servir d'animaux sentinelles pour surveiller le risque lié à la maladie de Lyme dans une zone donnée. Or en France, le chevreuil est une espèce proche du cerf de Virginie, il pourrait donc être un bon candidat. De plus, il est fortement exposé aux piqûres des tiques et il est relativement simple à échantillonner grâce aux actions de chasse sur ce gibier. Mon projet de stage s'inscrit dans un projet de thèse plus large porté par Valentin Ollivier qui compare la prévalence des agents pathogènes présents dans les tiques et la sérologie des chevreuils pour ces mêmes agents pathogènes sur un site unique, Gardouch. L'ensemble de ces comparaisons permettra l'évaluation des modalités d'utilisation du chevreuil comme animal sentinelle pour caractériser le risque de transmission de certaines maladies et notamment de la maladie de Lyme à l'homme.

Dans le cadre de ce projet plus large, l'objectif de mon stage était d'analyser 1280 tiques *Ixodes ricinus* collectées entre 2014 et 2018 à Gardouch dans une zone présentant une densité élevée de chevreuil et d'y évaluer la prévalence des agents pathogènes transmis par les tiques dont Borrelia. J'ai ainsi criblé ces tiques pour la présence de 7 genres d'agents pathogènes (*Borrelia, Rickettsia, Anaplasma, Babesia, Bartonella, Theileria* et *Hepatozoon*) à l'aide d'un outil de PCR en temps réel microfluidiques afin d'évaluer la prévalence de ces agents pathogènes dans les tiques de cette zone d'étude.

4- Démarche méthodologie

4.1 Matériel biologique

Lors de ce stage, 1280 tiques, collectées sur le site de Gardouch (présentant une forte densité de chevreuil) qui se situe en Occitanie, ont été analysées. Toutes les analyses portent sur les tiques de type *I.ricinus* récoltées entre 2014 et 2018 qui ont été conservées à -80 °C avant d'effectuer les extractions d'ADN. Toutes les tiques analysées étaient des nymphes présentent dans la zone d'étude. Ce stade se gorge préférentiellement sur chevreuil et représente également le stade qui pique le plus fréquemment l'Homme.

4.2- Extraction ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit NucleoSpin DNA insect (Macherey Nagel, Allemagne). Ainsi pour pouvoir effectuer l'extraction ADN des tiques, elles ont été placées individuellement dans un tube à billes fourni dans le kit et le tampon de lyse a été ajouté pour pouvoir effectuer le broyage à l'aide du broyeur PRECELLYS 24 DUAL pivotant à 5500 rpm pendant 20 secondes. Par la suite, le surnageant a été chargé sur une colonne puis centrifugé. Ensuite les contaminants ont été éliminés de la colonne grâce à des tampons de lavage. Pour finir, afin d'augmenter le rendement en ADN, les extraits ont été élués avec le tampon d'élution chauffé à 70 °C. Les ADNs obtenus ont été conservés à -20°C pour les préserver pour la suite des analyses (Annexe I).

4.3- Pré-amplification de l'ADN

La pré-amplification a été réalisée avec le kit PreAmp Master Mix (Fluidigm, USA) et va permettre d'augmenter le signal du matériel génétique de l'agent pathogène par rapport au matériel génétique de l'hôte (la tique) : (cf Tableau 1).

Tableau 1 : Mix réalisé pour l'étape de pré-amplification pour un échantillon

	Volume en µl pour 1 échantillon
PreAmp Master mix	1
Pool 0,2x	1.25
Eau MilliQ pure et stérile	1.5

Le pool 0,2x appelé aussi amorces groupées contient les couples d'amorces Forward (sens) et Reverse (anti-sens) ciblant les agents pathogènes recherchés (cf Tableau 2)

Tableau 2 : Composition du pool 0,2x

Mix pour	44 couples d'amorces	
	Volume en µl	Volume en µl
Amorce Forward 100 µM	2	4
Amorce Reverse 100 µM	2	4
Eau MilliQ	824	1648
Volume final	1000	2000

1,25 µl d'ADN extrait précédemment a été déposé dans le mix et un témoin négatif (eau) a été ajouté à chaque série de pré-amplification. Le programme de PCR était le suivant : un cycle à 95 °C pendant 2 minutes puis 14 cycles à 95°C pendant 15 secondes et enfin 4 minutes à 60°C.
Les produits obtenus de la pré-amplification ont été dilués au 1/10e soit un ajout de 45 µl d'eau ultra pure. Les ADN pré-amplifiés et dilués ont été conservés à -20°C.

4.4- PCR en temps réel microfluidiques

Les puces microfluidiques sont une nouvelle approche de PCR en temps réel à haut débit pour détecter la présence d'un grand nombre d'agents pathogènes dans un grand nombre d'échantillons (48x48 ou 96x96) en une seule expérimentation (Michelet et al, 2014). Ainsi, 48 échantillons rencontrent 48 cibles (couple d'amorces et la sonde d'un agent pathogène recherché) individuellement, ce qui permet la réalisation de 2 304 réactions PCR en temps réel simultanément. Dans un premier temps, la puce microfluidique 48.48 (cf Figure 4) a été chargée avec 300 µl d'huile dans les compartiments dédiés sur les côtés à l'aide d'une seringue. La puce a été ensuite placée dans l'IFC Controler MX (Integrated Fluidic Circuit) pour suivre le programme « Chip prime » qui grâce à la pression, va permettre à l'huile de se diffuser dans son circuit microfluidique dédié. Puis, une plaque « cibles » (couple d'amorces et la sonde pour chaque agent pathogène) a été préparée avec 3 µl de réactif 2X Assay loading (Fluidigm, USA) pour permettre de fluidifier les réactifs et 3 µl des couples d'amorces et sondes préalablement préparés à 18 µM et 4 µM.

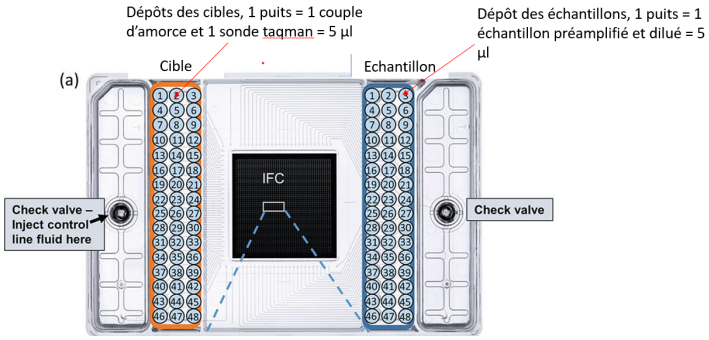

Figure 4 : Puce microfluidique 48.48

Ensuite, une plaque « échantillons » a été préparée avec, pour chaque échantillon : 3 µl du réactif Perfecta qPCR ToughMix Low ROX (QuantaBio, USA) contenant les réactifs nécessaires à la réaction de PCR en temps réel et un fluorochrome ROX permettant de normaliser la fluorescence, 0,3 µl de 20X GE Sample loading (Fluidigm, USA) pour fluidifier et améliorer le passage des réactifs dans les canaux de la puce, et 2,7 µl d'ADN pré-amplifié et dilué dans chaque puits.

Enfin, 5 µl des plaques « cibles » et « échantillons » ont été déposés dans la puce : les échantillons ont été chargés dans la partie droite de la puce et les cibles ont été chargées dans la partie gauche (cf Tableau 3).

Tableau 3 : Tableau des cibles avec les noms des agents pathogènes recherchés suivi du gène ciblé par les amorces et la sonde

	1	2	3	4	5	6
A	*Borrelia burgdorferi* sensu stricto _ rpoB	*Borrelia garinii* _ rpoB	*Borrelia afzelii* _ fla	*Borrelia valaisiana*_ ospA	*Borrelia lusitaniae* _ rpoB	*Borrelia spielmanii* _ fla
B	*Borrelia bissettii* _ rpoB	*Borrelia miyamotoi* _ glpQ	*Borrelia* spp. _ 23S	*Anaplasma marginale* _ msp 1	*Anaplasma platys*_ groEL	*Anaplasma phagocytophilum*_ msp2
C	*Anaplasma ovis*_ msp4	*Anaplasma centrale*_ groEL	*Anaplasma bovis*_ groEL	*Anaplasma* spp. _ 16S	*Ehrlichia* spp. 16S	*Ehrlichia canis*_ gltA
D	*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis _ groEL	*Rickettsia conorii* _ ITS	*Rickettsia slovaca*_ ITS	*Rickettsia massiliae*_ ITS	*Rickettsia helvetica*_ ITS	*Rickettsia aeschlimannii*_ ITS
E	*Rickettsia felis*_ orfB	*Rickettsia* spp. _ gltA	*Bartonella henselae* _pap31	*Bartonella* spp._ ssrA	*Francisella tularensis*_ tul4	*Francisella tularensis* _fopA
F	*Coxiella burnettii* _ IS1111	*Coxiella burnettii* _ icd	Apicomplexa_ 18S	*Babesia microti*_CCTeta	*Babesia canis*_3subspe_hsp70	*Babesia ovis*_18S
G	*Babesia bovis*_CCTeta	*Babesia caballi*_rap1	*Babesia venatorum*_ 18S (EU1)	*Babesia divergens*_ hsp70	*Babesia canis_18S*	*Theileria* spp. _18S
H	*Hepatozoon* spp._18S	*Ixodes ricinus*_ITS2	Tique spp _ 16S	*Dermacentor reticulatus*_ITS2	*Dermacentor* marginatus_ ITS2	E. coli (témoin PCR)

La puce a été placée dans l'IFC Controler MX pour suivre un programme de 1 heure nommé « Load Mix » qui permet de charger les réactifs dans les canaux microfluidiques. Une fois chargés, les valves d'interfaces de la puce s'ouvrent afin de permettre à tous les réactifs de s'homogénéiser dans les chambres réactionnelles. Une fois ce programme fini, la puce a été placée dans le BIOMARK, qui est un système de PCR en temps réel automatisé équipé d'une caméra et d'un thermocycleur. Le programme de PCR en temps réel se compose d'un cycle de 2 min à 50 °C, un cycle de 10 min à 95°C suivi de 40 cycles en 2 étapes. La première est un cycle de 15 secondes à 95°C et la seconde d'un cycle de 1 min à 60°C, à la fin duquel la fluorescence est mesurée. Les résultats obtenus sont analysés grâce au logiciel Fluidigm Time PCR analysis (cf Figure 5). Pour cela, les niveaux de CT et de fluorescences sont vérifiés et seuls les échantillons ayant un CT inférieur à 30 et une fluorescente supérieure à 0,02 ΔRN sont conservés.

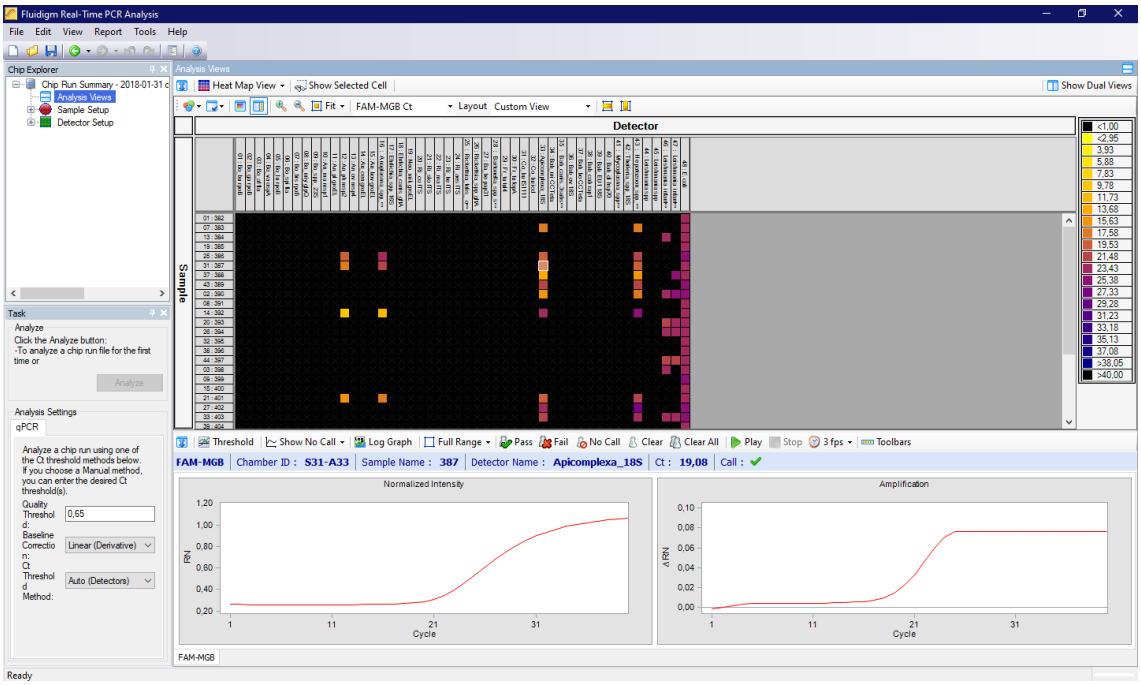

Figure 5 : Logiciel Fluidigm Time PCR analysis

4.5 – PCR et Nested PCR de confirmation

Des PCR et/ou Nested PCR de confirmation sont ensuite réalisées pour valider par séquençage Sanger les échantillons détectés positifs sur la puce microfluidique. Pour cela le kit PCR Phusion High fidelity (Thermo scientific, USA) est utilisé selon les recommandations du fournisseur (cf Annexe II). Ici nous avons ajouté 15 µl du mix et 5 µl d'ADN et utilisé différentes amorces en fonction des agents pathogènes recherchés (cf Annexe III). Par la suite, tous les échantillons ont été mis à migrer sur du gel d'agarose à 2% à 100 Volt pendant 1h45 puis ont été révélés avec l'appareil GelDoc XR+ de BIORAD. Pour certains échantillons négatifs sur gel pour les agents pathogènes *Rickettsia, Babesia, Anaplasma* et *Bartonella* lors du premier test de confirmation, un deuxième test est effectué avec une autre PCR et/ou Nested PCR. Les échantillons positifs sont envoyés à la société Eurofins (Cologne, Allemagne) qui a réalisé le séquençage Sanger. Les séquences obtenues sont analysées avec le logiciel BioEdit et comparées aux bases de données sur le site NCBI.

5 – Résultats

Au total 1280 extractions d'ADN ont été effectuées. Cela a nécessité l'exploitation de 28 puces microfluidiques 48x48. L'analyse des puces sur le logiciel Real Time PCR analysis de Fluidigm, a permis de détecter les différents agents pathogènes présents dans les tiques *I. ricinus* récoltées à Gardouch. Les différentes séquences d'ADN envoyé par Eurofins ont été analysées pour permettre de confirmer/identifier l'espèce de l'agent pathogène avec un taux d'identité variant de 98 à 100% (cf Annexe IV).
Nous avons pu observer que certains agents pathogènes n'ont pas été détectés. Notamment le genre *Bartonella* qui est totalement absent. C'est également le cas pour *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia bissettii* et *Borrelia spielmanii*, ainsi que pour *Rickettsia conorii*, *Ricketssia slovaca*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii* et *Rickettsia felis*. En ce qui concerne les espèces Anaplasma et Ehrlichia : *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma bovis* et *Ehrlichia_canis* sont absents. Pour finir, *Babesia microti*, *Babesia ovis*, *Babesia bovis*, *Babesia caballi, Babesia canis* (gène *hsp70*), *Theileria spp* et *Hepatozoon spp* sont également négatifs.
Au total 5 genres et 12 espèces d'agents pathogènes ont été détectés dans les tiques analysées et leur taux de prévalence a été calculées de manière globale (cf Tableau 4) ainsi que par mois et année de collecte entre 2014 et 2018 (cf Tableau 5).

Tableau 4 : Taux de prévalence des agents pathogènes détectés dans les tiques collectées

Agents Pathogènes	Nombres de tiques infectées	Taux de prévalence (%)
Borrelia :		
Borrelia spp.	35 dont :	
Borrelia spp. *(pas d'espèce déterminée)*	1	0,08
Borrelia burgdorferi sensu stricto	1	0,08
Borrelia garinii	4	0,31
Borrelia afzelii	6	0,47
Borrelia valaisiana	3	0,23

Borrelia miyamotoi	21	1,64
Rickettsia : *Rickettsia* spp. (sans espèce déterminée) *Rickettsia helvetica* *Rickettsia monacensis*	35 dont : 7 25 3	 0,55 1,95 0,23
Anaplasma : *Anaplasma* spp. *Anaplasma phagocytophilum* Ehrlichia : *Ehrlichia* spp. *(pas d'espèce déterminée)* *Ehrlichia muris* *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis	 60 dont : 60 6 1 4	 4,69 0,47 0,08 0,31
Babesia : *Apicomplexa* *Babesia venatorum* *Babesia divergens* *Babesia canis* (gene 18S)	31 dont : 26 4 1	 2,03 0,31 0,08

Ici, une tique présente une co-infection entre *Borrelia miyamotoi* et *Borrelia garinii* (0,08%, IC 95% : 0,00-0,23%).

Tableau 5 : Prévalence des agents pathogènes dans les tiques en fonction du mois et de l'année de collecte

Mois-Année	Agents Pathogènes	Taux de prévalence de tiques infectées (%)
Avril-2014	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	4,0 4,00 2,00 6,00 6,00 6,00
Mai- 2014	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	5,00 5,00 2,50 2,50 2,50
Juin-2014	*Ehrlichia* spp. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	4,00 4,00 2,00 2,00 2,00
Juillet-2014	*Borrelia afzelii* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	3,45 3,45 6,90 6,90

Aout- 2014	Pas de pathogène détecté	
Septembre- 2014	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	16,67 16,67
Octobre- 2014	Pas de pathogène détecté	
Novembre- 2014	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum* *Babesia divergens*	6,06 6,06 3,03 3,03 6,06 9,09 6,06 3,03
Janvier- 2015	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	2,08 2,08 2,08 2,08 2,08
Février- 2015	*Ehrlichia* spp. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis	3,85 3,85
Mars-2015	*Borrelia afzelii* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	2,00 2,00 2,00 2,00
Avril-2015	*Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia divergens*	16 20 2,00 2,00
Mai-2015	*Borrelia garinii* *Borrelia valaisiana* *Borrelia* spp. *Apicomplexa* *Babesia canis* (gène 18S)	2,00 2,00 4,00 2,00 2,00
Juin-2015	*Borrelia afzelii* *Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Apicomplexa* *Babesia divergens*	2,00 2,00 4,00 2,00 2,00 2,00 2,00
Juillet-2015	*Borrelia afzelii* *Borrelia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	4,00 4,00 4,00 4,00
Septembre-2015	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp.	4,00

	Apicomplexa *Babesia venatorum*	4,00 4,00 4,00
Octobre-2015	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	3,33 3,33 6,67 6,67
Novembre-2015	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	4,00 4,00 4,00 4,00
Décembre-2015	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	6,52 6,52 2,17 2,17 2,17 2,17
Février-2016	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp. *Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	2,00 2,00 4,00 4,00 2,00 12,00 12,00 8,00 8,00
Mars-2016	*Borrelia afzelii* *Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Apicomplexa*	2,00 2,00 4,00 4,00 4,00 4,00
Juillet-2016	Pas de pathogène détecté	
Aout-2016	*Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp.	50,00 50,00
Septembre-2016	Pas de pathogène détecté	
Octobre-2016	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	3,85 3,85 26,92 26,92 7,69 7,69 3,85 3,85

Novembre-2016	*Borrelia garinii* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp.	3,70 3,70 7,41 7,41 3,70 3,70
Décembre-2016	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum* *Babesia divergens*	2,63 2,63 5,26 5,26 2,63 2,63 7,89 5,26 2,63
Janvier-2017	*Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp.	100 100
Février-2017	*Borrelia valaisiana* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	2,00 4,00 10,00 10,00
Mars-2017	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp.	4,00 4,00 4,00 4,00 2,00 4,00
Avril-2017	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp.	2,00 2,00 2,00 2,00 2,00
Mai-2017	*Borrelia afzelii* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	2,00 2,00 10,00 10,00 2,00 2,00 2,00
Juillet-2017	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	54,55 54,55
Aout-2017	Pas de pathogène détecté	
Septembre-2017	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	9,09 9,09

Octobre-2017	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	9,09 9,09
Novembre-2017	*Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	3,85 3,85 7,69 7,69 3,85 3,85 3,85
Janvier-2018	*Borrelia burgdorferi sensu stricto* *Borrelia garinii* *Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp. *Apicomplexa* *Babesia venatorum*	2,56 2,56 5,13 7,69 10,26 10,26 2,56 2,56 2,56
Mars-2018	*Borrelia garinii* *Borrelia miyamotoi* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia* spp.	6,67 6,67 6,67 26,67 26,67 6,67
Avril-2018	*Borrelia valaisiana* *Borrelia* spp. *Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp. *Rickettsia helvetica* *Rickettsia* spp.	2,56 2,56 2,56 2,56 5,13 5,13
Mai-2018	Pas de pathogène détecté	
Juin-2018	*Anaplasma phagocytophilum* *Anaplasma* spp.	2,78 2,78
Aout-2018	Pas de pathogène détecté	
Octobre-2018	Pas de pathogène détecté	
Novembre-2018	*Ehrlichia* spp. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis	20,00 20,00
Décembre-2018	*Ehrlichia* spp.	20,00

6- Discussion et interprétations

Au cours de ces 3 mois, j'ai acquis de nouvelles compétences en réalisant un projet dans son intégralité. En effet, j'ai pu découvrir comment manipuler dans un laboratoire : être organisée, être précise, respecter les protocoles… Et surtout j'ai découvert une nouvelle technique

d'analyse : les PCR en temps réel microfluidiques. En effet, l'ANSES fait partie de l'une des deux seules institutions en Europe à posséder un appareil Biomark pour effectuer ces analyses. J'ai aussi eu l'opportunité de participer à une collecte de tiques pendant 1 journée. Ainsi, j'ai pu découvrir la technique de collecte du « drap blanc » et l'effectuer dans le parc Schlumberger et les buttes d'Orgemont dans le Val d'Oise ainsi qu'au parc de la poudrerie en Seine Saint Denis.

Concernant les résultats obtenus, nous avons mis en évidence que les tiques présentes à Gardouch contiennent principalement des agents pathogènes de cinq genres : *Borrelia, Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia et Babesia*.

Parmi les *Borrelia spp*, ont été retrouvés : *Borrelia spp* sans espèce déterminée (0,08%, IC 95% : 0,00-0,23%), *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (0,08%, IC 95% : 0,00-0,23%), *Borrelia garinii* (0,31%, IC 95% : 0. 01-0,62%), *Borrelia afzelii* (0,47%, IC 95% : 0,09-0,84%), *Borrelia valaisiana* (0,23%, IC 95% : 0,00-0,50%) et *Borrelia miyomotoi* (1,64%, IC 95% : 0,94-2,34%). Rappelons que ces agents pathogènes, à l'exception de *Borrelia miyomotoi*, sont responsables de la maladie de Lyme, néanmoins sur les 5 années d'études les prévalences restent faibles (moins de 0.5%) ce qui semble cohérent avec les données obtenues par Valentin OLLIVER suite à des analyses sérologiques des chevreuils, indiquant que la zone de Gardouch ne possède pas beaucoup de chevreuils contaminés. Cela coïncide également avec les données récoltées ailleurs en France comme sur le site de la forêt de Sénart où six espèces de Borrelia sont également présentes : *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (1,5%, IC 95% : 0,8-2,5%), *Borrelia garinii* (1,1%, IC 95% : 0. 6-2,0%), *Borrelia afzelii* (1,1%, IC 95% : 0,6-2,0%), *Borrelia valaisiana* (0,6%, IC 95% : 0,2-1,3%), Borrelia miyomotoi, détecté à 1,2% (IC 95% : 0,6-2,1%) ainsi que *Borrelia spielmanii* (0,4%, IC 95% : 0,1-1,0%) (Lejal et al, 2019). Nous pouvons également préciser que le genre Borrelia est retrouvé 23 mois sur les 46 mois échantillonnés à Gardouch, contre 23 mois sur les 30 échantillonnés à Sénart. Ici, il est aussi important de préciser que nous avons comptabilisé une tique présentant *Borrelia burgdorferi sensu lato*, néanmoins l'espèce n'a pas pu être confirmée car le séquençage n'a pas pu être discriminant entre 2 espèces (*Borrelia burgdorferi sensu lato* ou *stricto* et *Borrelia findanlensis*). De plus, une tique a présenté une co-infection entre *Borrelia miyamotoi* et *Borrelia garinii* (0,08%, IC 95% : 0,00-0,23%) ; le nombre de tiques infectées pour le genre Borrelia est donc bien 34 et non 35.

Parmi le genre *Rickettsia,* 2 espèces différentes ont été identifiées : *Rickettsia helvetica* (1,95%, IC 95% : 1,20-2,71%) et *Rickettsia monacensis* (0,23%, IC 95% : 0,00-0,50%) ; ainsi que quelques échantillons pour lesquels l'espèce incriminée n'a pas pu être déterminée (0.55%, IC 95% : 0,14-0,95%). Ici nous remarquons que l'espèce *Rickettsia helvetica* présente la plus forte prévalence ce qui est cohérent avec les données récoltées en France à Sénart (Lejal et al, 2019), où l'espèce *Rickettsia helvetica* est le plus répandue puisqu'elle a été détectée à 4,5% (IC 95% : 3,3-6,0%). De plus, cette espèce est retrouvée 15 mois sur 46 à Gardouch contre 16 mois sur 30 à Sénart. La forêt de Gardouch pourrait donc posséder moins de tiques contaminées par cet agent pathogène.

Concernant le genre *Anaplasma*, une seule espèce a été détectée : *Anaplasma phagocytophilum* à 4,69 % (IC 95 % : 3,53-5,85 %). Ce résultat concorde avec ceux retrouvés en forêt de Sénart avec 5,3% de ce pathogène retrouvé sur un total de 5,4% (IC 95 % : 4,1-7,0 %)

d'Anaplasma détectés (Lejal et al, 2019). Cela expliquerait qu'il est retrouvé 26 mois sur 46 à Gardouch, soit plus de la moitié de la durée de collecte contre 14 mois sur 30 à Sénart, soit un peu moins de la moitié de la durée de collecte. Le site de Gardouch semblerait donc être un lieu plus propice à la présence d'Anaplasma ce qui est également en accord avec les données de Valentin OLLIVIER concernant la sérologie des chevreuils. Concernant le genre *Ehrlichia*, 2 espèces ont été identifiées : *Ehrlichia muris* (0,08%, IC 95% : 0,00-0,23%) et *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (0,31%, IC 95% : 0,00-0,23%) ; ainsi que quelques échantillons pour lesquels l'espèce incriminée n'a pas pu être déterminée 0,47% (IC 95% : 0,09-0,84%) des tiques.

Enfin, 3 espèces de Babesia ont été détectées : *Babesia venatorum* (2,03%, IC 95% : 1,26-2,80%), *Babesia divergens* (0,31%, IC 95% : 0,01-0,62%) et *Babesia canis* (gène 18S) (0,08%, IC 95% : 0,01-0,62%). Ici, l'espèce dominante est *Babesia venatorum* suivi de *Babesia divergens*. Ces résultats sont à nouveau en accord avec les études menées en France notamment à Sénart où l'espèce *Babesia venatorum* est détecté à 1,5% (IC 95% : 0,8-2,5%) et *Babesia divergens* à 0,1% (IC 95% : 0,003-0,6%) (Lejal et al, 2019).

Dans cette étude, 25.78% des tiques collectées entre 2014 et 2018 sur le site de Gardouch sont positives pour au moins un agent pathogène. Et ce taux d'infection varie d'un mois sur l'autre et d'une année sur l'autre selon l'agent pathogène analysé. Cela est également le cas dans d'autres études qui ont fait ces suivis de taux d'infection tous les mois sur plusieurs années (Lejal et al, 2019). Les fluctuations de ces taux de prévalence en France ou en Europe en fonction des mois et/ou des années peuvent s'expliquent par des changements des facteurs abiotiques comme : la température, l'humidité relative et les précipitations... En effet, la présence continue d'hôtes pourrait faciliter la circulation des espèces dominantes ou encore maintenir des faibles taux pour les espèces qui sont le moins répandues (Lejal et al, 2019). Cela concorde avec les résultats de Valentin OLLIVIER, en effet un chevreuil peut être testé positif pour un pathogène comme *Borrelia* une année puis redevenir négatif l'année suivante, ce qui explique la fluctuation du taux d'infection par l'agent pathogène du genre *Borrelia*.
L'outil de PCr microfluidiques nous permet également de détecter les co-infections présentes au sein des tiques : c'est-à-dire de détecter plusieurs agents pathogènes présents au sein d'une même tique. Dans notre échantillonnage nous avons pu mettre en évidence une tique avec une co-infection entre *Borrelia miyamotoi* et *Borrelia garinii*. Mais il est important de préciser que les résultats obtenus à ce stade ne permettent pas de confirmer les co-infections au sein d'une tique par deux (ou plus) agents pathogènes du même genre, par exemple deux espèces de *Borrelia* du groupe *Borrelia burgdorferi* sensu lato. En effet, ici le séquençage nous a permis de déterminer uniquement l'espèce majoritaire. Ainsi, la détection de plusieurs espèces du même genre n'est pas possible avec les techniques classiques de séquençage. A l'avenir, pour pouvoir confirmer les co-infections, une méthode plus complexe devra être réalisée comme le clonage des produits de PCR avant séquençage.
Ainsi, mes résultats vont être inclus dans la thèse de Valentin OLLIVER qui compare la prévalence des tiques et la sérologie des chevreuils. En effet, ces résultats nous renseigneront sur la variabilité spatiale du niveau d'infection des tiques et permettra de la mettre en relation avec la séroprévalence des chevreuils du même site qu'est Gardouch. L'ensemble de ces comparaisons permettra l'évaluation des modalités d'utilisation du chevreuil comme sentinelle pour

caractériser le risque de transmission de certaines maladies et notamment de la maladie de Lyme à l'homme.
De plus, si la question de la réponse immunitaire est validée, Valentin OLLIVIER pourra cartographier le risque que représentent les tiques dans un maximum de région en France. A ce jour, les résultats de Valentin OLLIVIER montrent une corrélation entre la séroprévalence des chevreuils et la prévalence des tiques. Néanmoins, les détails des résultats ne peuvent être apportés dans ce rapport car les données de Valentin OLLIVIER n'étant pas publiées, elles sont donc encore confidentielles.

7- Conclusion

Pour conclure, 1280 nymphes de tiques Ixodes ricinus collectées sur chevreuil de la forêt de Gardouch entre 2014 et 2018 ont été analysées. Tout d'abord, des extractions d'ADN ont été effectuées, suivi des PCR de pré-amplification. Par la suite, des PCR en temps réel microfluidiques ont été effectuées sur les échantillons pré-amplifiés. Suite à l'analyse des puces, des PCR de confirmation ont été réalisées puis les produits de PCR ont été envoyés à Eurofins en Allemagne pour le séquençage. Les séquences obtenues ont été analysées et le taux de prévalence des tiques infectées a ensuite été calculé. Ainsi, nous avons pu observer que les principaux agents pathogènes présents sont du genre : Borrelia, Rickettsia, Anaplasma, Ehrlichia et Babesia. En effet, pour le genre *Borrelia* nous retrouvons : *Borrelia spp* sans espèce déterminée (0,08%), *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (0,08%), *Borrelia garinii* (0,31%), *Borrelia afzelii* (0,47%), *Borrelia valaisiana* (0,23%) *et Borrelia miyomotoi* (1,64%) ; pour le genre Rickettsia : *Rickettsia* sans espèce déterminée (0.55%), *Rickettsia helvetica* (1,95%) et *Rickettsia monacensis* (0,23%) ; Pour le genre Anaplasma, seul *Anaplasma phagocytophilium* (4,69 %) a été détecté, sans oublier le genre Ehrlichia : *Ehrlichia spp* sans espèces déterminée (0,47%), *Ehrlichia muris* (0,08%) et *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (0,31%) ; enfin, pour le genre Babesia : *Babesia venatorum* (2,03%), *Babesia divergens* (0,31%) et *Babesia canis* (gène 18S) (0,08%). De plus, tous ces taux de prévalence d'infections concordent avec ceux retrouvés en France et notamment avec l'étude menée en forêt de Sénart. Ils sont aussi en accord avec les résultats de Valentin OLLIVIER puisque la forêt de Gardouch ne compte pas un grand nombre de chevreuils porteurs d'anticorps de la maladie de Lyme, sans oublier que ce dernier retrouve également un taux élevé d'Anaplasma dans ses expériences. Ces résultats vont donc être fournis et inclus dans la thèse de Valentin OLLIVIER pour qu'il puisse cartographier les zones à risques dues à la présence des tiques, et publier son article et sa thèse en 2022.

Pour finir, mener un projet quasiment à son terme est très satisfaisant. J'ai pu découvrir comme dit précédemment des techniques innovantes. De plus, je n'ai pas rencontré de difficultés durant mes manipulations grâce à un encadrement de qualité de la part de tout le laboratoire. Cela m'a permis de mettre en pratique les manipulations de pipettes apprises en cours ainsi que le travail en équipe, sujet sur lequel nous travaillons depuis notre première année. Maintenant, je sais que je peux travailler dans un laboratoire. Néanmoins, même si le domaine de la recherche est intéressant, je sais que je ne pourrai pas en faire un projet professionnel. En effet, je préfère m'orienter vers la santé humaine mais non pas à l'échelle moléculaire mais plutôt à l'échelle d'un organisme entier (l'Homme). Ce stage me confirme dans mon changement de voie pour la santé humaine via des études de kinésithérapie.

Bibliographie

ANSES, 2021. *Organigramme ANSES au 1 er février 2021*. Disponible sur : Organisation de l'Agence (anses.fr) [consulté le 27 mai 2021]

APPLI UNIVLORRAINE, 2020. *Logo IUTNB*. Disponible sur : https://arche.univ-lorraine.fr/mod/folder/view.php?id=584762 [consulté le 24 mai 2021]

BONNET.S, JOUGLIN.L, MALANDRIN.L, BECKER.C, AGOULON.M, CHAUVIN.A, 2007.Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinusticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology, vol 134, Issue 2* [consulté le 8 juillet 2021]

CARR A., MITCHELL III D., DHAMMI A., BISSINGER B.W, SONENSHINE, D.E, ROE R.M, 2017. Tick Haller's Organ,a New Paradigm for Arthropod Olfaction : How Ticks Differ from Insects. *International Journal of Molecular Sciences,* 18,1563 [consulté le 24 mai 2021].

CHOI.YEON-JOO, JANG.WON-JONG, KIM. JONG-HYUN, RYU.JI-SUN, LEE.SEUNG-HYUN, PARK.KYUNG-HEE, PAIK.HYUNG-SUK, KOH.YOUNG-SANG, CHOI.MYUNG-SIK, KIM.IK-SANG, 2005. Spotted Fever Group and Typhus Group Rickettsioses in Humans, South Korea. *Emerg Infect DIS, vol 1* [consulté le 8 juillet 2021]

FACEBOOK, 2018. *ELIZ - Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses.*
Disponible sur : https://www.facebook.com/ELIZ-Entente-de-Lutte-et-dIntervention-contre-les-Zoonoses-306269840226416/photos/a.306269956893071/306270250226375 [consulté le 24 mai 2021]

FOLDVARI G., 2016. Life cycle and ecology of *Ixodes ricinus* : the roots of public health importance. *In Ecology and Control of Vector-borne diseases (*eds M.A.H. Braks, S.E. van Wieren, W. Takken, H. Sprong), 31-40. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands [consulté le 25 mai 2021]

FUENTE.J, MASSUNG.RF, WONG.SJ, CHU.FK, LUTZ.H, MELI.M, VON LOEWENICH.FD, GRZEZCZUK.A, TORINA.A, CARACAPPA.S, MANGOLD.A, NARANJO.V, STUEN.S, KOCAN. KM, 2005.Sequence Analysis of the *msp4* Gene of *Anaplasma phagocytophilum* Strains. Journal of clinical microbiology [consulté le 8 juillet 2021]

HERMANN C., GERN.L, 2015. Search for blood or water is influenced by Borrelia burgdorferi Ixodes ricinus. *Parasite& Vectors*, 8,6. [consulté le 24 mai 2021]

INRAE, 2020. Le cycle des tiques (*Ixodes ricinus).* Disponible sur : https://www.inrae.fr/actualites/portrait-tiques [consulté le 22 mai 2021]
JONGEJAN F., UILENBERG G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology,* 129 : S3-S14 [consulté le 24 mai 2021]

LEJAL E., MARSOT.M, CHALVET-MONFRAY.K, COSSON.J-F, MOUTAILLER.S, VAYSSIER-TAUSSAT.M, POLLET.T, 2019. A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest. *Parasite& Vectors* [consulté le 8 juillet 2021]

LOH.S-M., GOFTON.A, LO.N, GILLETT.A, RYAN.U, J.IRWIN.P, OSKAM.C, 2016. Novel *Borrelia* species detected in echidna ticks, *Bothriocroton concolor*, in Australia. Parasite& Vectors 9 [consulté le 8 juillet 2021]

MAGGI.R, BREITSCHWERDT. E, 2005. Potential Limitations of the 16S-23S rRNA Intergenic Region for Molecular Detection of *Bartonella* Species. Journal of Clinical Microbiology [consulté le 8 juillet 2021]

MAGNARELLI, IJDO.JW, RAMAKREISHAN.U, HENDERSON.DW, STAFFORD.KC, FIKRIG.E, 2004. USE OF RECOMBINANT ANTIGENS OF BORRELIA BURGDORFERI AND ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM IN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS TO DETECT ANTIBODIES IN WHITE-TAILED DEER. *Journal of Wildlife Diseases, 40 p 249-258* [consulté le 8 juillet 2021]

MASATANI.T, HAYASHI.K, ANDOH.M, TATENO.M, ENDO.Y, ASADA.M, KUSAKISAKO.K, TANAKA.T, GOKUDEN.M, HOZUMI.N, NAKADOHZONO.F, MATSUO.T, 2017. Detection and molecular characterization of *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in hard ticks collected from Kagoshima, the southern region in Japan. *Ticks and tick-borne Diseases, vol 8 p 581-587* [consulté le 8 juillet 2021]

MCCOY K., BOULANGER N., 2015. Tiques et maladies à tiques Biologie, écologie évolutive, épidémiologie. IRD Édition [consulté le 24 mai 2021]

MICHELET L., DELANNOY S., DEVILLERS E. UMHANG G, ASPAN A., JUREMALM M., ET AL, 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infections Microbiology,* 4 [consulté le 5 juin 2021].

NICHOLSON W.L, SONENSHINE D.E, NODEN B.H, BROWN R.N., 2019. Ticks (Ixodida). *In Medical and Veterinary Entomology,* 603-672 [consulté le 24 mai 2021]

NORMAN.AF, REGNERY.R, JAMESON.P, GREENE.C, KRAUSE.DEC, 1995. Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene , Vol. 33, No.7 [consulté le 8 juillet 2021]

RAR.V, FOMENKO.N, DOBROTVORSKY.A, LIVANOVA.N, RUDAKOVA.S, FEDOROV.E, ASTANIN.V, MOROZOVA.O, 2005. Tickborne Pathogen detection,Western Siberia, Russia. *Emerging Infectious Diseases, vol 11* [consulté le 8 juillet 2021]

REGNERY.RL, SPRUILL.CL, PLIKAYTIS BD, 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* [consulté le 8 juillet 2021]

SPRONG H., AZAGI T.,HOORNSTRA D., NIJHOF A.M, KNORR S.,BAARSMA M.E, HOVIUS J.W, 2018. Control of Lyme borreliosis ans other Ixodes ricinus-borne diseases. *Parasites &Vectors,* 11, 145 [consulté le 27 mai 2021].

Table des Annexes

Annexe I : Protocole d’extraction d’ADN
Annexe II : Exemple de protocole de PCR de confirmation
Annexe III : Liste des amorces utilisées pour les PCR de confirmation
Annexe IV : Tableau montrant les résultats de séquençage

Annexe I : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Nucleospin DNA insect (Macherey Nagel, Allemagne)

[Lyse]
1- Ajouter 100 µl de tampon d'élution BE dans le tube à vis contenant la tique + 40 µl du tampon de lyse MG + 10 µl de proteinase K liquide.
2- Broyage : mettre les tubes dans le broyeur Precellys et lancer le programme : 5500 mouvements pendant 20 sec. Si le broyage n'est pas satisfaisant, refaire un cycle, à condition que les bouchons des tubes ne soient pas fêlés (risque de rupture du tube).
3- Centrifuger les tubes 30 sec à 11000g pour enlever les bulles et nettoyer le bouchon (ne pas centrifuger plus longtemps ou plus vite).

[Fixation de l'ADN]
4- Ajouter 600µl de tampon MG et vortexer 3 sec (les billes doivent être agitées dans le tube), puis centrifuger les tubes 30 sec à 11000g.

5- Mettre un micro tube contenant le volume nécessaire de tampon d'élution (BE) à chauffer à 70°C.

6- Transférer le lysat dans la colonne verte et centrifuger 30 sec à 11000g. Jeter l'éluât et mettre la colonne dans un nouveau tube de collection.

[Lavages]
7- Ajouter 500 µl de tampon BW et centrifuger pendant 30 sec à 11000g. Eliminer l'éluât.
8- Ajouter 500 µl de tampon B5 et centrifuger 30 sec à 11000g. Eliminer l'éluât.

[Assèchement de la membrane]
9- Centrifuger la colonne à sec 30 sec à 11000g pour sécher la membrane.
10- Mettre la colonne dans un micro-tube 1.5ml annoté.

[Elution]
11- Ajouter 30 µl de tampon d'élution BE chaud. Bien le déposer au centre de la membrane, sans la toucher.
12- Incuber 3 min à T°C ambiante (permet à la membrane de se réhydrater et de libérer l'ADN) et centrifuger 1 min à 11000g.
13- Ajouter 20 µl de tampon d'élution BE chaud comme précédemment.
14- Incuber 3 min à T°C ambiante et centrifuger 1 min à 11000g.
15- Jeter la colonne et conserver ADN à -20°C.

Annexe II : Exemple de protocole de PCR de confirmation pour le genre Babesia

Plan des barrettes des échantillons ADN :

	1	2
A	43	665
B	129	691
C	142	822
D	157	831
E	204	Témoin négatif eau PCR 1
F	214	Témoin négatif eau PCR 2
G	434	
H	523	

Mix PCR (Kit Phusion High fidelity (Thermo scientific, USA)) pour 15 puits :
Distribuer 15 µl mix et 5 µl d'ADN.

Séquences des amorces utilisées :

Cible : gene 18S rRNA

PCR1

BTH 18S 1st F GTGAAACTGCGAATGGCTCATTAC 63,6°C

BTH 18S 1st R AAGTGATAAGGTTCACAAAACTTCCC 62.9°C

PCR2

BTH 18S 2nd F GGCTCATTACAACAGTTATAGTTTATTTG 63.3°C

BTH 18S 2nd R CGGTCCGAATAATTCACCGGAT 62.1°C (potentiel HairPin=HP)

Calcul TM : 58°C (pour les deux)

Taille amplicon : 1500 bp soit 1.5 KB donc durée extension de 45sec

Programme (le même pour PCR1 et PCR2) :

	Température	Durée	Nbre de cycles
Denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation Hybridation Extension	98°C **58°C** 72°C	10 s 30 s **45 s**	35
Extension	72°C	10min	1
stockage	4°C	Infini	

Annexe III : Liste des amorces utilisées pour les PCR de confirmation

Pathogènes	Gène ciblé	Noms des amorces	Séquence (5'->3')	Taille de l'amplicon (pb)	Référence
Borrelia	*flaB*	PCR 1 : amorces FlaB280F FlaRL PCR 2 : amorces FlaB373F FlaLL	5'-GCAGTTCARTCAGGTAACGG-3' 5'-GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT-3' 5'GCATCAACTGTRGTTGTAACATTAACAGG-3' 5'-ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT-3'	645	Loh et al., 2016
Rickettsia	*gltA*	PCR 1 : amorces Rsfg 877 Rsfg 1258	5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3' 5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3'	381	Regnery et al, 1991
Bartonella	*gltA*	PCR 1 : amorces Bart781 Bart1137	5'-GGG GAC CAG CTC ATG GTG G-3' 5'-AAT GCA AAA AGA ACA GTA AAC A-3'	380-400	Norman et al, 1995 J
Babesia	18rRNA	PCR 1: amorces BTH18S1F BTH181SR PCR 2: amorces BTH18S2F BTH18S2R	5'-GTGAAACTGCGAATGGCTCATTAC-3' 5'-AAGTGATAAGGTTCACAAAACTTCCC-3' 5'GGCTCATTACAACAGTTATAGTTTATTTG-3' 5'-CGGTCCGAATAATTCACCGGAT-3'	1500	Masatani et al., 2017
Anaplasma	16S riboso-mal RNA	PCR 1 : amorces EHR 1 EHR 2	5´-GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3´ 5´AGTA(T/C)CG(A/G)ACCAGATAGCCGC-3´)	693	Rar et al., 2005

		PCR 2 : amorces EHR3 EHR2	5´-TGCATAGGAATCTACCTAGTAG-3´ 5´AGTA(T/C)CG(A/G)ACCAGATAGCCGC-3´	629	
Rickettsia	*OmpB*	PCR 1 : amorces Rc.rompB.4362p Rc.rompB.4836n PCR 2 : amorces Rc.rompB.4496p Rc.rompB.4762n	5’-GTCAGCGTTACTTCTTCGATGC-3’ 5’-CCGTACTCCATCTTAGCATCAG-3’ 5’-CCAATGGCAGGACTTAGCTACT-3’ 5’-AGGCTGGCTGATACACGGAGTAA-34	475	Yeon-Joo Choi et al 2005
Babesia	ARN 18S	PCR 1 : amorces BABGF2 BABGR2	5’-GYY TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3’ 5’-CCA AAG ACT TTG ATT TCT CTC-3’	559	Bonnet et al 2007
Bartonella	16S-23S rRNA	PCR 1: amorces ITS321s ITS983as	5’ AGA TGA TGA TCC CAA GCC TTC TGG 3’ 5’ TGT TCT YAC AAC AAT GAT GAT G 3’	684	Maggi et al 2005
Anaplasma	*msp4*	PCR 1 : amorces MSP4AP5 MSP4AP3	5'-ATG AAT TAC AGA GAA TTG CTT GTA GG-3' 5'-TTA ATT GAA AGC AAA TCT TGC TCC TAT G-3’	849	José de la Fuente, *et al.* 2005

Annexe IV : Tableau montrant les résultats de séquençage

Numéro d'échantillon	Amorces PCR (pathogène)	QUERY(%)	Id(%)	e-value	Résultats
294	FlaB (Borrelia)	99	99,10	0	*Borrelia afzelii*
409	FlaB (Borrelia)	98	99,45	4E-86	*Borrelia valaisiana*
512	FlaB (Borrelia)	100	99,76	0	*Borrelia afzelii*
746	FlaB (Borrelia)	99	99,29	0	*Borrelia afzelii*
796	FlaB (Borrelia)	100	98,79	2E-119	*Borrelia garinii*
1167	FlaB (Borrelia)	100	98,79	8E-119	*Borrelia garinii*
1209	FlaB (Borrelia)	100	98,30	6E-79	*Borrelia valaisiana*
868	FlaB (Borrelia)	100	99,76	0	*Borrelia burgdorferi sensus lato ou stricto ou Borrelia finlandensis*
1138	FlaB (Borrelia)	99	99,01	0	*Borrelia garinii*
158	EHR (Ehrlichia)	100	100	1E-76	*Ehrlichia muris*
155	EHR (Ehrlichia)	100	100	0	*Ehrlichia spp*
271	EHR (Anaplasma)	99	99,43	0	*Anaplasma phagocytophilum*
597	EHR (Anaplasma)	100	99,47	0	*Anaplasma phagocytophilum*
777	EHR (Anaplasma)	98	99,48	0	*Anaplasma phagocytophilum*
46	Rsfg (Rickettsia)	100	100	1E-178	*Rickettsia helvetica*
24	Rsfg (Rickettsia)	100	100	0	*Rickettsia monacensis*
775	Rsfg (Rickettsia)	100	100	5E-157	*Rickettsia helvetica*
942	Rsfg (Rickettsia)	100	100	4E-173	*Rickettsia monacensis*
1166	Rsfg (Rickettsia)	100	100	3E-169	*Rickettsia monacensis*

43	BTH et BabG (Babesia)	100 et 100	99,53 et 98,41	0 et 8E-155	*Babesia venatorum*