



HAL
open science

Phylogénie et distribution géographique de *Borrelia garinii* chez des oiseaux communs en France

Margaux François

► **To cite this version:**

Margaux François. Phylogénie et distribution géographique de *Borrelia garinii* chez des oiseaux communs en France. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04415304

HAL Id: dumas-04415304

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04415304v1>

Submitted on 24 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2023

PHYLOGÉNIE ET DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DE BORRELIA GARINII CHEZ DES OISEAUX COMMUNS EN FRANCE

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 12 décembre 2023

par

Margaux, Anouck, Elisa FRANÇOIS

sous la direction de

Valentine GUÉTIN-POIRIER

JURY

Président du jury :	M. Radu BLAGA	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Valentine GUÉTIN-POIRIER	Maître de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Pascal ARNÉ	Maître de Conférences à l'EnvA
Membre invité :	Mme Laetitia CANINI	Chercheuse à l'ANSES Maisons-Alfort
Membre invité :	Mme Maud MARSOT	Chercheuse à l'ANSES Maisons-Alfort

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version juillet 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneç	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérandère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M. Radu Blaga, Professeur à l'EnvA,
pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.
Hommage respectueux.

À Mme Valentine Guétin-Poirier, Maître de conférences à l'EnvA,
pour avoir accepté de diriger ce travail.
Sincères remerciements.

À M. Pascal Arné, Maître de conférences à l'EnvA,
pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

À Mme Laetitia Canini et Mme Maud Marsot,
pour leur patience, leur soutien et leur bienveillance.
Sincères remerciements.

À l'unité épidémiologie du Laboratoire Santé Animale de l'Anses,
pour la chaleur de leur accueil et leur bonne humeur.
Sincères remerciements.

Aux membres du projet OUTLYER, et en particulier Mme Amalia Rataud,
sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu.
Sincères remerciements.

À ma famille,
pour leur présence et leur soutien.

À mes amis, et en particulier à Garance et Amélia,
pour m'avoir accompagnée dans les moments difficiles, pour nos fous-rires, nos râleries et
votre soutien sans faille.

À Farouk,
pour ta bonne humeur constante, tes encouragements et pour avoir toujours cru en moi.

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	7
Introduction	9
Première partie : bibliographie	11
1. La maladie de Lyme, une maladie vectorielle complexe	11
A. <i>Agents pathogènes responsables de la maladie de Lyme</i>	11
B. <i>Ixodes ricinus, principale tique vectrice des Bbsl en Europe</i>	12
C. <i>Les Bbsl, des bactéries dépendantes de l'écosystème au sein duquel elles évoluent</i>	15
a. Réservoirs et hôtes non aviaires des Bbsl majoritaires en Europe	15
b. Les oiseaux, principaux réservoirs de <i>B. garinii</i>	16
c. Tolérance et portage des Bbsl chez les animaux sauvages.....	17
d. Importance de l'écosystème dans la dynamique des Bbsl	17
D. <i>Importance de la maladie de Lyme en santé publique et en santé animale</i>	18
a. Modalités d'infection de l'hôte	18
b. Symptômes et diagnostic de la maladie de Lyme chez l'homme.....	19
c. Traitement et pronostic de la maladie de Lyme chez l'homme	21
d. Données épidémiologiques disponibles en Europe et en France	22
e. Signes cliniques de la maladie de Lyme chez les animaux domestiques	24
2. Phylogénie des <i>Bbsl</i>	24
A. <i>Description du génome des Bbsl et séquences d'intérêt en phylogénie</i>	25
B. <i>Phylogénie et épidémiologie moléculaire : les principes</i>	27
a. Définition et principe de la phylogénie	27
b. Construction d'un arbre phylogénétique	28
c. Principes de l'épidémiologie moléculaire et lien avec la phylogénie	32
C. <i>La phylogénie, un outil au service d'une meilleure compréhension des Bbsl</i>	32
a. Histoire de la taxonomie des Bbsl	32
b. Phylogénie et diversité génétique des Bbsl	33
Deuxième partie : étude expérimentale	35
1. Introduction	35
2. Matériels et méthodes	36
A. <i>Collecte des données</i>	36
a. Description du programme STOC-Capture.....	37
b. Collecte des tiques	38
c. Identification morphologique des tiques	38
d. Détection des agents pathogènes au sein des larves gorgées.....	39
B. <i>Nettoyage des données et obtention des séquences consensus pour les analyses phylogénétiques</i> 40	
C. <i>Analyses phylogénétiques</i>	42
3. Résultats	43
A. <i>Description des données</i>	43
a. Description des données de terrain relatives aux oiseaux capturés, aux larves collectées et aux agents pathogènes détectés.....	43
b. Description et caractéristiques des séquences génétiques	47
B. <i>Analyses des données : diversité génétique des séquences et phylogénie</i>	48
4. Discussion.....	53
Conclusion	59
Liste des références bibliographiques	61

Annexe 1 : Espèces d'agents pathogènes et gènes ciblés par la puce microfluidique	69
Annexe 2 : Amorces utilisées dans les protocoles de PCR de confirmation des espèces de <i>Borrelia</i>	70
Annexe 3 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'algorithme Muscle, utilisé pour aligner l'ensemble des séquences et obtenir un msa (multiple sequence alignment)	71
Annexe 4 : Alignement des séquences grâce à l'arbre guide, suite à la création de la matrice des distances permettant de déterminer le degré de proximité des différentes séquences .	72
Annexe 5 : Carte présentant les pourcentages de larves positives à <i>B. garinii</i> en fonction des stations en France	73
Annexe 6 : Espèces d'oiseaux positives à <i>B. garinii</i>, et nombre d'individus porteurs de larves négatives et porteurs d'au moins une larve positive à <i>B. garinii</i> par espèce d'oiseau	74
Annexe 7 : Nombre de de larves positives et négatives à <i>B. garinii</i> par oiseau en fonction de l'espèce	75

Liste des figures

Figure 1 : Photographie d'une <i>Bbsl</i> vue au microscope à fond noir, par le Dr S. Bhimji (Tatum et Pearson-Shaver, 2023).....	11
Figure 2 : Photographie des différentes stases d' <i>I. ricinus</i> (gorgées ou non) sur papier millimétré (Citique, 2023).....	12
Figure 3 : Cycle de vie de la tique <i>Ixodes ricinus</i> (Lejal, 2020).....	13
Figure 4 : Activité saisonnière d' <i>Ixodes ricinus</i> en Europe centrale, au nord de l'Angleterre et en Écosse (Kurtenbach <i>et al.</i> , 2006).....	14
Figure 5 : Photographie d'un érythème migrant suite à une morsure de tique (Gathany, 2007)	19
Figure 6 : Photographie d'un lymphocytome borrélien (Palmen <i>et al.</i> , 2010).....	20
Figure 7 : Estimation du taux d'incidence annuel de la maladie de Lyme en 2016 par région en France (Vaissière <i>et al.</i> , 2018).....	23
Figure 8 : Organisation du génome de <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> (Stewart <i>et al.</i> , 2005)	25
Figure 9 : Fonctionnement du MultiLocus Sequence Typing (MLST) (Hyun-chan, 2015)	27
Figure 10 : Exemple d'arbre phylogénétique	28
Figure 11 : Représentation schématique des substitutions possibles (à gauche) et matrice de substitution Q associée au modèle GTR (à droite) (Drummond, 2023).....	29
Figure 12 : Construction d'un arbre phylogénétique par la méthode du Neighbor Joining (Dunn <i>et al.</i> , 2011).....	30
Figure 13 : Construction des arbres phylogénétiques selon le principe de parcimonie	31
Figure 14 : Schéma de l'obtention des séquences génétiques des <i>Bbsl</i> (PCR et séquençage)	40
Figure 15 : Schéma d'obtention d'une séquence consensus à partir des séquences Forward (F) et Reverse (R) d'une <i>Bbsl</i>	41
Figure 16 : Séquences non alignées (gauche) et alignement multiple des séquences (droite).....	42
Figure 17 : Exemple d'arbre phylogénétique présentant une multifurcation, avec longueur de branche représentant la distance génétique entre deux nœuds.....	43
Figure 18 : Carte présentant les pourcentages de larves positives à <i>Bbsl</i> en fonction des stations en France	45
Figure 19 : Espèces d'oiseaux positives à <i>Bbsl</i> , et nombre d'individus porteurs de larves négatives et porteurs d'au moins une larve positive à <i>Bbsl</i> par espèce d'oiseau	46
Figure 20 : Nombre de de larves positives et négatives à <i>Bbsl</i> par oiseau en fonction de l'espèce.....	47

Figure 21 : Espèces de <i>Bbsl</i> correspondant aux 96 séquences génétiques (A), espèces d'oiseaux dont sont issues les 96 larves gorgées positives à <i>Bbsl</i> (B), milieux dont sont issues les 96 larves gorgées collectées sur les 54 oiseaux capturés (C).....	48
Figure 22 : Matrice des distances génétiques des séquences	49
Figure 23 : Arbre phylogénétique construit à partir des 96 séquences génétiques de <i>Bbsl</i>	51
Figure 24 : Répartition spatiale des <i>Bbsl</i> appartenant aux clades A et B, et des <i>Bbsl</i> hors clades.	52
Figure 25 : Répartition spatiale des <i>B. garinii</i> appartenant aux sous clades A1 et A2.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1 : Espèces de petits mammifères hôtes et compétence de réservoir associée pour différentes espèces de <i>Bbsl</i> en Europe	15
Tableau 2 : Catégories utilisées pour l'habitat des oiseaux capturés, et lien avec les catégories officielles CLC	37
Tableau 3 : Nombre de larves collectées en fonction de leur espèce (ensemble des larves, puis larves positives à <i>Bbsl</i> , puis larves positives à <i>B. garinii</i>)	44

Liste des abréviations

ACVIM : American College of Veterinary Internal Medicine (Collège américain de médecine interne vétérinaire)

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Bbsl : *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Bbss : *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

CLC : Corine land cover

ELISA : Enzyme-linked immuno sorbent assay (dosage immuno-enzymatique sur support solide)

EM : Erythème migrant

F : Forward (avant)

GTR : General time reversible (généralisé réversible dans le temps)

HAS : Haute Autorité de Santé

Kpb : Kilo paires de base

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MLST : Multilocus sequence typing (typage de séquences multi-locus)

MLSA : Multilocus sequence analysis (analyse de séquences multi-locus)

Msa : Multiple sequence alignment (alignement multiple de séquences)

ospA : Outer surface protein A (protéine A de surface externe)

ospC : Outer surface protein C (protéine C de surface externe)

PCR : Polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)

R : Reverse (inverse)

STOC-Capture : Suivi temporel des oiseaux communs nicheurs par capture

Introduction

La maladie de Lyme est une maladie vectorielle due à des bactéries du genre *Borrelia* regroupées dans un complexe appelé *Borrelia burgdorferi sensu lato* (noté *Bbsl*). Ces dernières années en France, les médias ont mis en avant cette maladie, et les témoignages de personnes déclarant souffrir de maladie de Lyme se sont multipliés. Les difficultés rencontrées par les malades ainsi que leur parcours parfois long avant d'obtenir un diagnostic ont accentué la peur de la population au sujet de cette maladie (L'obs, 2014). La maladie de Lyme, qui touche inégalement toutes les régions de France métropolitaine, est aujourd'hui un enjeu de santé publique. Le nombre de cas humains diagnostiqués estimés par an en France est compris entre 25 000 et 68 530 sur la période 2009-2020, avec une tendance à l'augmentation depuis 2009 (Santé Publique France, 2021). Le diagnostic de cette maladie, qui peut être polymorphe, est parfois difficile : des erreurs ou des retards de prise en charge peuvent survenir, ce qui peut altérer la qualité de vie du patient. Bien que la maladie soit bénigne la plupart du temps, l'absence de traitement précoce peut entraîner des complications chez les personnes atteintes, et représenter un coût important pour le système de santé (Aucott *et al.*, 2009 ; Cardenas-de la Garza *et al.*, 2019). Une revue de plusieurs études s'intéressant au coût économique de la maladie de Lyme dans différents pays d'Europe a montré qu'il pouvait varier et s'élever à plusieurs dizaines de millions d'euros dans certains pays, avec l'Allemagne en tête (coût annuel estimé de la maladie à plus de 30 millions d'euros, à partir de données collectées entre 2007 et 2011) (Mac *et al.*, 2019). Ce coût varie en fonction des symptômes développés par les individus infectés, la sévérité de ces symptômes dépendant notamment de l'espèce de *Bbsl* responsable de la maladie.

Les *Bbsl* sont transmises à l'homme *via* une morsure de tique, tique qui s'infecte la plupart du temps en réalisant un repas sanguin sur un hôte réservoir porteur de la bactérie. Le complexe des *Bbsl* comprend un ensemble d'espèces bactériennes différentes d'un point de vue éco-épidémiologique, notamment au niveau des hôtes réservoirs ou des symptômes causés (Derdáková et Lencáková, 2005). Les symptômes développés par l'homme sont généralement bénins (érythème migrant), mais la maladie peut évoluer et prendre différentes formes. La fréquence et la gravité de ces formes varient avec l'espèce de *Bbsl* concernée. Ainsi, *Borrelia garinii* est la bactérie majoritairement responsable chez l'homme de formes neuroborrélioses pouvant être invalidantes appelées neuroborrélioses (Coipan *et al.*, 2016). En 2020, d'après Santé Publique France, sur les 710 personnes hospitalisées suite à une maladie de Lyme, près de la moitié souffrait de neuroborréliose. *B. garinii* est fréquemment retrouvée chez la tique *Ixodes ricinus*, et a pour principal réservoir les oiseaux (Wolcott *et al.*, 2021 ; Rataud *et al.*, 2022a).

La pathogénicité et la diversité des symptômes chez l'homme peuvent varier au sein même d'une espèce de *Bbsl*, en lien avec sa diversité génétique (Hanincova *et al.*, 2013 ; Cerar *et al.*, 2016). Ainsi, plusieurs études soulignent l'importance de s'intéresser à la diversité génétique des *Bbsl*, car cela permet de mieux comprendre l'histoire évolutive, la pathogénicité et l'épidémiologie de ces bactéries (Derdáková et Lencáková, 2005 ; Oppler *et al.*, 2021 ; Seifert *et al.*, 2015). La phylogénie, *via* la construction d'arbres phylogénétiques, permet de comparer la diversité génétique entre différentes séquences génétiques de *Bbsl*, et a notamment contribué à identifier de nouvelles espèces au sein du complexe. Associée à des métadonnées (localisation des *Bbsl* détectées, espèce au sein de laquelle une *Bbsl* a été mise en évidence, etc), la phylogénie permet

de mieux appréhender l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la diversité génétique de ces bactéries (Margos *et al.*, 2011 ; Qiu et Martin, 2014).

À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la diversité génétique des *Borrelia garinii* détectées chez des larves gorgées collectées sur des oiseaux en France. Les objectifs de ce travail étaient d'étudier la répartition géographique de *B. garinii* chez des oiseaux en France, puis d'étudier sa diversité génétique grâce à une analyse phylogénétique par la méthode du maximum de parcimonie.

Dans un premier temps, une recherche bibliographique a été effectuée, d'abord sur la maladie de Lyme et sur la description de l'éco-épidémiologie des *Bbsl*, en se concentrant principalement sur *B. garinii*. Ensuite, une description des principes phylogénétiques ainsi qu'une synthèse des apports de la phylogénie sur les connaissances relatives aux *Bbsl* ont été effectuées. Notre étude s'est d'abord attachée à décrire la répartition géographique de *B. garinii* portée par des oiseaux en France. Puis la diversité génétique de *B. garinii* a été étudiée grâce à une analyse phylogénétique par maximum de parcimonie. Les liens entre phylogénie et distribution géographique, phylogénie et espèce aviaire hôte ainsi que phylogénie et milieu de vie de l'hôte ont ensuite été explorés.

Première partie : bibliographie

1. La maladie de Lyme, une maladie vectorielle complexe

La maladie de Lyme a été nommée suite à une épidémie d'arthrites rhumatoïdes juvéniles survenue dans la ville de Lyme (Connecticut, USA) en 1975. En 1977, un lien entre cette maladie et une morsure de tique est suggéré (Steere *et al.*, 1977). Cependant, les premières descriptions de symptômes pouvant être associés à la maladie de Lyme en Europe datent de 1883 (Madison-Antenucci *et al.*, 2020).

A. Agents pathogènes responsables de la maladie de Lyme

Les agents pathogènes responsables de la maladie de Lyme appartiennent au genre *Borrelia*. Ce genre comprend un ensemble de bactéries spirochètes, et est divisé en deux groupes : le groupe des bactéries responsables des fièvres récurrentes et le groupe responsable de la maladie de Lyme. Les bactéries responsables de la maladie de Lyme appartiennent à un complexe appelé « *Borrelia burgdorferi sensu lato* » (*Bbsl*). Une mise à jour de la nomenclature a eu lieu récemment et préconise de garder le genre *Borrelia* seulement pour les bactéries responsables de la fièvre récurrente, et d'inclure les *Bbsl* dans un genre appelé *Borelliella* (Madison-Antenucci *et al.*, 2020).

Les *Bbsl* sont des bactéries spiralées du fait de la présence de flagelles périsplasmiques qui leur permettent de se déplacer (Steere *et al.*, 2016). Ces bactéries, qui mesurent entre 10 et 30 μm de long, sont observables au microscope à fond noir (Figure 1). Elles sont difficiles à cultiver : elles nécessitent un milieu de culture spécifique et doivent être incubées pendant plusieurs semaines (Marques, 2015).

Figure 1 : Photographie d'une *Bbsl* vue au microscope à fond noir, par le Dr S. Bhimji (Tatum et Pearson-Shaver, 2023)



Le groupe des *Bbsl* comprend une vingtaine d'espèces, toutes ne causant pas de maladie chez l'homme. *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss, *B. spielmanii* et *B. bavariensis* sont des agents pathogènes reconnus en Europe, alors que *B. bissetii*, *B. lusitaniae*, et *B. valaisiana* sont des agents pathogènes potentiels (Stanek *et al.*, 2012). En Europe, les principales espèces infectant l'humain sont *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*Bbss*), *B. afzelii* et *B. garinii* (Estrada-Peña *et al.*, 2018 ; Madison-Antenucci *et al.*, 2020). La fréquence des différentes manifestations de la maladie de Lyme varie en fonction de l'espèce de bactérie concernée. *Bbss* est ainsi plus fréquemment responsable d'arthrites, *B. afzelii* de l'acrodermatite chronique atrophiante, tandis que *B. garinii* et *B. bavariensis* sont plus fréquemment retrouvées en cas de neuroborréliose (Coipan *et al.*, 2016 ; Jahfari *et al.*, 2017). En France, près de la moitié des hospitalisations pour maladie de Lyme sont dues à des manifestations neurologiques, et les jeunes enfants (5-9 ans) ainsi que les personnes âgées (70-79 ans) sont les groupes les plus touchés (Septfons *et al.*, 2018).

B. *Ixodes ricinus*, principale tique vectrice des *Bbsl* en Europe

Dans l'hémisphère Nord, les tiques sont les principaux vecteurs de maladies (Jongejan et Uilenberg, 2004). Les tiques sont des acariens ectoparasites hématophages stricts de vertébrés regroupant trois familles, avec des cycles parasitaires variés. Ces cycles sont caractérisés par trois stases (larve-nymphes-adulte) (Figure 2), séparées chacune par une métamorphose, qui fait suite à un (ou plusieurs) repas sanguin sur un hôte, au cours desquels la tique se gorge de sang (Boulanger et McCoy, 2015).

Le genre *Ixodes* (famille des Ixodidés ou tiques dures) comprend environ 250 espèces (Jongejan et Uilenberg, 2004), parmi lesquelles *Ixodes ricinus*. C'est l'espèce de tique la plus fréquente en Europe (Gray *et al.*, 2021), et le vecteur principal des *Bbsl* responsables de la maladie de Lyme. Cette tique est dite triphasique, c'est-à-dire qu'elle va réaliser des repas sanguins sur trois hôtes différents, avec entre les hôtes une phase de « vie libre » au sol où se réalise la métamorphose (Figure 3).

Figure 2 : Photographie des différentes stases d'*I. ricinus* (gorgées ou non) sur papier millimétré (Citique, 2023)

La rangée du haut présente les stases non gorgées d'*I. ricinus*, et la rangée du bas les stases gorgées, avec de gauche à droite l'ordre de succession des différentes stases. La croix rouge représente le fait que le mâle adulte n'est jamais gorgé de sang.

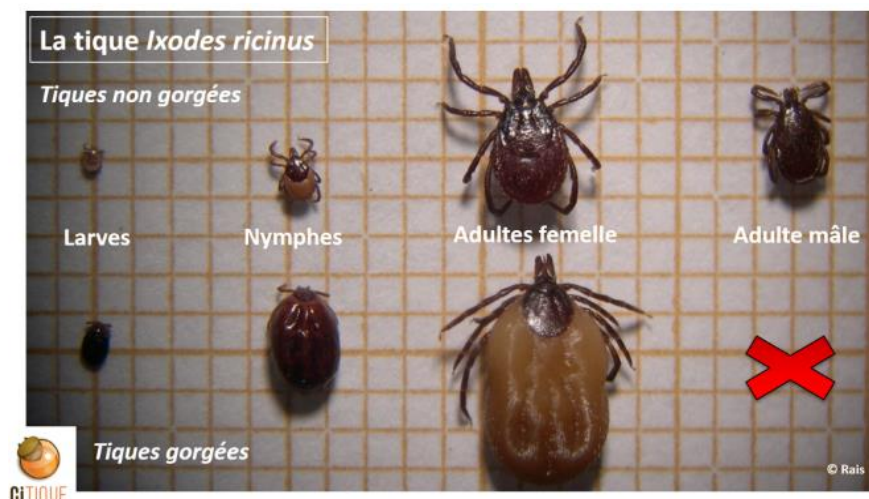
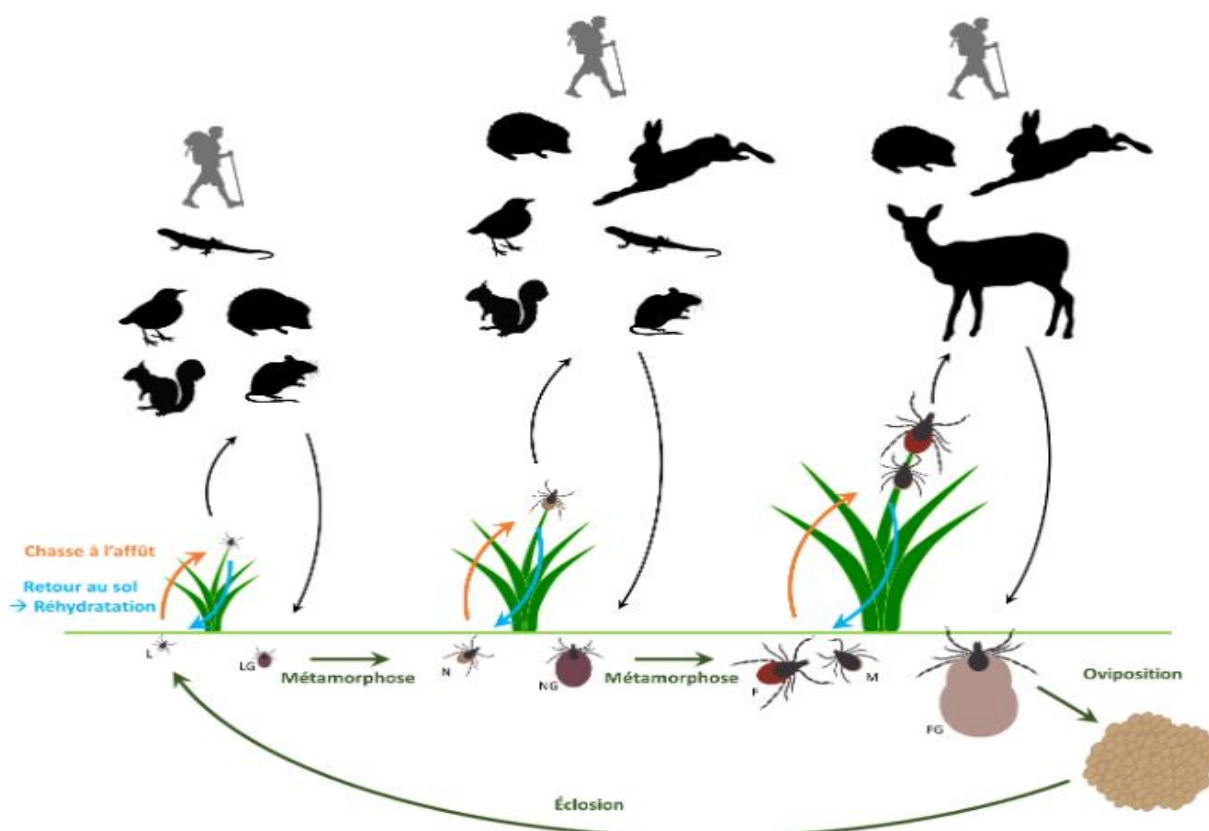


Figure 3 : Cycle de vie de la tique *Ixodes ricinus* (Lejal, 2020)

L = Larve, N = Nymphe, F = Femelle, M = Mâle | LG, NG, FG = Larve, Nymphe, Femelle Gorgée.

Les silhouettes en noir représentent les hôtes préférentiels d'*I. ricinus* en fonction de sa stase. La silhouette grise représente l'homme, qui peut être un hôte occasionnel pour *I. ricinus*.



L'œuf éclot dans le milieu puis la larve se met à l'affût (par exemple en haut d'un brin d'herbe) d'où elle se fixe sur un hôte et réalise son premier repas sanguin, qui dure de 2 à 5 jours. Elle tombe ensuite au sol et se métamorphose en nymphe, qui après avoir trouvé un second hôte se nourrit sur celui-ci (3-5 jours), puis tombe et se métamorphose en adulte. L'adulte cherche et se nourrit sur un troisième hôte (7-10 jours), puis tombe une nouvelle fois au sol. La rencontre entre le mâle et la femelle adultes et la reproduction peuvent s'effectuer soit sur le troisième hôte soit au sol. Puis la femelle pond ses œufs au niveau du sol et décède peu de temps après. Contrairement au mâle qui se nourrit peu, la femelle se gorge de sang à chaque repas, le corps d'une adulte gorgée pouvant atteindre un volume 10 fois supérieur à celui d'une adulte à jeun. *I. ricinus* peut aussi entrer en diapause (fort ralentissement du métabolisme), lorsque les conditions environnementales ne lui sont pas favorables. Cette diapause peut durer jusqu'à 10 mois, et peut par exemple permettre à une larve qui se serait nourrie en fin d'été de passer l'hiver, et de se métamorphoser en nymphe à l'été suivant. Ainsi, la durée de vie d'*I. ricinus* peut varier de 2 à 6 ans (Boulanger et McCoy, 2015 ; Kahl et Gray, 2023).

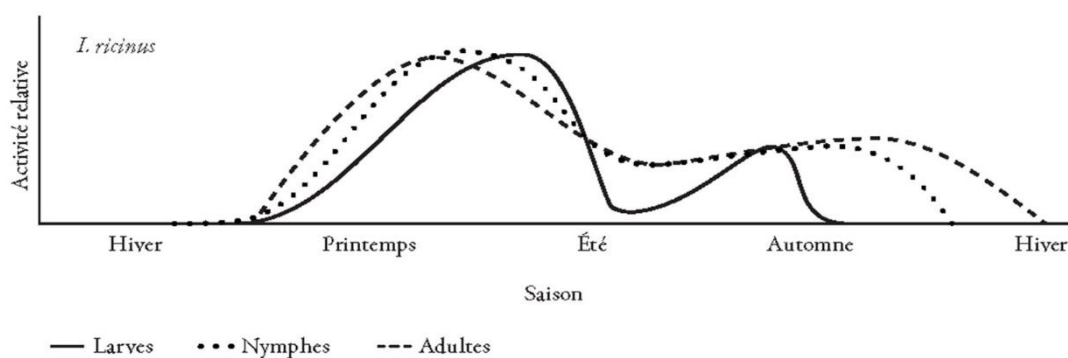
Les tiques ont des préférences trophiques¹ plus ou moins marquées en fonction des espèces (Figure 3). *I. ricinus* fait partie des tiques les plus « généralistes », c'est-à-dire qu'elle se

¹ Attrait et appétence pour un certain type d'hôte

nourrit sur une grande variété d'hôtes (cycle hétéroxène), homme inclus. Elle a en effet été retrouvée sur plus de 300 hôtes différents (Gray *et al.*, 2002). Ainsi, *I. ricinus* peut se nourrir sur les petits et moyens mammifères (notamment les rongeurs), sur les grands mammifères comme les ongulés (et préférentiellement sur les cervidés), sur les oiseaux et moins fréquemment sur les reptiles (Hofmeester *et al.*, 2016). Sa capacité à se nourrir sur un hôte en particulier dépend de plusieurs facteurs, notamment de sa résistance à la dessiccation. Celle-ci est plus élevée chez les adultes que chez les larves, ce qui leur permet de se mettre à l'affût en hauteur et donc d'atteindre des hôtes plus grands. Ainsi, les stases larve et nymphe sont plus fréquemment retrouvées chez les petits mammifères et les oiseaux, alors que les adultes sont plus fréquemment retrouvées chez les grands mammifères (Boulanger et McCoy, 2015).

Ixodes ricinus est une tique dite exophile, dont les phases de vie libre se déroulent dans des espaces ouverts ou semi-ouverts (forêts, prairies), et où l'humidité est suffisante (idéalement > 80 %). Cela conditionne aussi les types d'hôtes qu'elle est amenée à rencontrer le plus fréquemment : rongeurs, oiseaux et cerfs. L'activité des tiques est variable en fonction de l'espèce et de la stase. Chez *I. ricinus*, les nymphes et les adultes sont les plus actives au printemps, et ont une activité modérée en été et en automne, alors que le pic d'activité des larves est un peu plus tardif, entre le printemps et l'été, avec un second pic d'activité plus faible en automne (Figure 4).

Figure 4 : Activité saisonnière d'*Ixodes ricinus* en Europe centrale, au nord de l'Angleterre et en Écosse (Kurtenbach *et al.*, 2006)



I. ricinus est vectrice de nombreux agents pathogènes et peut les transmettre aux hôtes sur lesquels elle se nourrit. Une tique peut acquérir un agent pathogène selon plusieurs mécanismes : soit en réalisant un repas sanguin sur un hôte infecté (infection systémique), soit de manière non systémique. L'infection peut alors se faire par co-repas, si la tique partage un même repas sanguin contaminé localement par une tique voisine infectée, ou par transmission transovarienne de la tique infectée à ses descendants (Boulanger et McCoy, 2015). Cependant, la transmission transovarienne des *Bbsl* est négligeable chez *I. ricinus* (Richter *et al.*, 2012). L'importance de la transmission par co-repas est plus discutée (Voordouw, 2015), mais elle reste marginale par rapport à la transmission systémique (Richter *et al.*, 2002).

Il est à noter que différentes espèces de tiques pourraient être impliquées dans la circulation des *Bbsl* chez les différents hôtes. En effet, les oiseaux peuvent être infestés par la tique *I. ricinus*, mais aussi par des tiques ornithophiles, dont *Ixodes arboricola* et *Ixodes frontalis*. Bien que ces trois espèces diffèrent de par leur milieu de vie et leur pic d'activité, elles partagent certains hôtes aviaires sur lesquels elles se nourrissent (Rataud, 2022). Il a été montré que ces tiques ornithophiles pouvaient être porteuses de *Bbsl* (Heylen *et al.*, 2013). Bien que des résultats

contradictoires aient été obtenus quant à leur compétence vectorielle² (Heylen *et al.*, 2014b), qui pourrait varier en fonction de l'espèce d'oiseau et de bactérie concernées, ces tiques pourraient participer au maintien des *Bbsl* au sein de la communauté aviaire, et *Ixodes ricinus* pourrait servir d'intermédiaire en transmettant les *Bbsl* des oiseaux aux mammifères (Heylen *et al.*, 2017b).

C. Les *Bbsl*, des bactéries dépendantes de l'écosystème au sein duquel elles évoluent

a. Réservoirs et hôtes non aviaires des *Bbsl* majoritaires en Europe

Un réservoir peut être défini comme une population (ou un ensemble de populations épidémiologiquement connectées) dans laquelle un agent pathogène est maintenu de manière persistante et depuis laquelle l'infection est transmise à une population cible, différente ou non du réservoir (Haydon *et al.*, 2002). Ainsi, une population d'une espèce donnée réservoir pour *Bbsl* est capable d'être infectée par ces bactéries *via* une morsure de tique, d'assurer leur réplication et de les transmettre ensuite à une tique naïve.

Les réservoirs principaux des *Bbsl* sont les petits mammifères (notamment les rongeurs), et les oiseaux (Stanek *et al.*, 2012). Bien que les tiques adultes du genre *Ixodes* aient une préférence plus marquée pour les grands mammifères tels que les cervidés, ceux-ci ne sont pas des réservoirs pour les *Bbsl* (Telford *et al.*, 1988). Concernant les petits mammifères, les espèces réservoirs préférentielles des *Bbsl* varient en fonction des espèces de bactéries concernées (Tableau 1).

Tableau 1 : Espèces de petits mammifères hôtes et compétence de réservoir associée pour différentes espèces de *Bbsl* en Europe

Espèce hôte	Compétence de réservoir	Espèces de <i>Bbsl</i> concernées	Référence
Mulots du genre <i>Apodemus</i>	Confirmée	<i>B. afzelii</i>	(Hu <i>et al.</i> , 1997 ; Wolcott <i>et al.</i> , 2021)
Campagnol roussâtre (<i>Myodes glareolus</i>)	Confirmée	<i>B. afzelii</i>	(Wolcott <i>et al.</i> , 2021)
Écureuil roux (<i>Sciurus vulgaris</i>)	Suspectée Non connue	<i>B. afzelii</i> , <i>Bbss</i> <i>B. garinii</i>	(Humair et Gern, 1998 ; Pisanu <i>et al.</i> , 2014)
Campagnol agreste (<i>Microtus agrestis</i>)	Non connue	<i>B. afzelii</i>	(Mysterud <i>et al.</i> , 2019b)
Musaraigne commune (<i>Sorex araneus</i>)	Non connue	<i>B. afzelii</i>	(Mysterud <i>et al.</i> , 2019b)
Tamias de Sibérie* (<i>Tamias sibiricus barberi</i>)	Non connue	<i>B. afzelii</i> , <i>Bbss</i>	(Marsot <i>et al.</i> , 2011)

* Espèce envahissante en France

² Aptitude du vecteur à s'infecter, à permettre le développement de l'agent pathogène et à le retransmettre

b. Les oiseaux, principaux réservoirs de *B. garinii*

- *Rôle des différentes espèces d'oiseaux dans le portage de tiques*

En fonction notamment de leur abondance respective et de leurs habitudes de vie en période de reproduction (hauteur du nid, hauteur d'alimentation, etc), certaines espèces d'oiseaux sont plus souvent en contact avec des tiques généralistes comme *I. ricinus*, et ont une charge en tique plus élevée. Ainsi, chez les oiseaux, on estime que 20 % des individus sont porteurs de 80 % des tiques (Woolhouse *et al.*, 1997 ; Heylen, 2016). Au sein des passériformes, la famille des *Turdidae* comprend des espèces telles que le Merle noir (*Turdus merula*) et la Grive musicienne (*Turdus philomelos*), qui figurent souvent parmi les espèces d'oiseaux les plus infestées (Klaus *et al.*, 2016 ; Klitgaard *et al.*, 2019). Le pourcentage d'individus infestés chez ces deux espèces est variable selon les études mais peut dépasser 70 % (Michalik *et al.*, 2008 ; Dubska *et al.*, 2009 ; Gryczyńska et Welc-Falęciak, 2016). Par exemple, dans une étude conduite en Pologne sur 226 oiseaux appartenant à neuf espèces différentes, 46,5 % des 114 individus infestés étaient des Merles noirs (n = 25) ou des Grives musiciennes (n = 29). Cent pourcent des Merles noirs et 97 % des grives musiciennes capturés étaient infestés par des tiques, avec une charge en tiques moyenne respectivement de 11,3 et 7 tiques par individu (Michalik *et al.*, 2008). En comparaison, 25 % (n = 24) des Rougegorges familiers (*Erithacus rubecula*) capturés étaient infestés. Ce pourcentage était de 19 % (n = 59) pour la Mésange charbonnière (*Parus major*). Leur charge en tiques moyenne étaient identiques, avec 0,6 tiques par individu. Une autre étude a montré des pourcentages d'infestation plus importants chez ces deux espèces, respectivement de 47,2 % pour le Rougegorge familier (197 individus capturés) et de 58 % pour la Mésange charbonnière (69 individus capturés) (Dubska *et al.*, 2009).

Les passereaux (ordre des Passériformes) sont donc un ordre d'intérêt pour l'étude de la charge en tiques des oiseaux. Ce sont en effet les oiseaux les plus représentés en France métropolitaine, avec environ 250 espèces sur les 625 présentes sur le sol français (Lepage, 2023). La majorité des oiseaux appartenant à cet ordre sont des oiseaux chanteurs de petite taille. Ils vivent majoritairement dans la strate arbustive, préférant les milieux buissonnants ou les zones humides, qui sont des milieux favorables aux tiques. Bien qu'une partie de ces espèces migrent sur de longues distances, environ 44 % de celles-ci sont sédentaires (ou migratrices sur de courtes distances). La période de reproduction de ces oiseaux s'étend d'avril à juillet, avec des individus qui retournent ou qui restent sur leur lieu de naissance pour s'accoupler et pondre leurs œufs (Rataud, 2022). Pendant cette période, les oiseaux jouent un rôle dans la dynamique des populations locales de tiques, qui peuvent se nourrir sur ceux-ci.

- *Importance des espèces d'oiseaux réservoirs pour les Bbsl*

Il a été démontré, via des expériences de laboratoire (xénodiagnose), que certaines espèces aviaires jouaient un rôle important dans l'acquisition des *Bbsl* par les tiques. Le Merle noir et la Mésange charbonnière (*Parus major*) sont des réservoirs pour *B. garinii* et *B. valaisiana* (Humair *et al.*, 1998 ; Heylen *et al.*, 2014a). Le Merle noir est aussi une espèce réservoir pour *B. turdi* (Heylen *et al.*, 2017b). La Grive musicienne est considérée comme une espèce réservoir pour *B. garinii*, bien que sa compétence de réservoir³ n'ait pas été évaluée en laboratoire. Des tiques infectées par ces *Bbsl*, mais aussi par *B. afzelii*, ont été retrouvées chez plusieurs autres espèces d'oiseaux (Heylen *et al.*, 2017a). Cependant, les tiques infectées par *B. afzelii* étaient des

³ Aptitude de l'hôte à s'infecter, à permettre le développement de l'agent pathogène et à le retransmettre

nymphes ou des adultes qui auraient donc pu être infectées lors de leur repas sanguin précédent sur un hôte différent. Ainsi, la détection de ces tiques infectées n'est pas suffisante pour démontrer le rôle de réservoir de ces oiseaux.

En milieu naturel, certaines espèces (notamment certaines espèces de *Turdidae*) peuvent présenter des pourcentages supérieurs à 50 % de larves positives à *Bbsl* (Michalik *et al.*, 2008 ; Dubska *et al.*, 2009). Une étude a montré que sur 40 espèces d'oiseaux capturés en Europe centrale, le Merle noir et la Grive musicienne portaient 95 % de l'ensemble des larves positives à *Bbsl*, dont plus de 90 % étaient porteuses de *B. garinii* ou *B. valaisiana* (Taragel'ová *et al.*, 2008). Ces espèces d'oiseaux sont donc des espèces importantes en santé publique puisque les larves qu'elles portent deviennent des nymphes infectées, qui sont ensuite susceptibles de transmettre la maladie à l'homme.

c. Tolérance et portage des *Bbsl* chez les animaux sauvages

La pathogénicité des *Bbsl* chez les différentes espèces réservoirs, ainsi que leur persistance dans l'organisme des hôtes et leur durée d'infectiosité⁴ sont peu connues. Les espèces réservoirs ne seraient pas ou peu sensibles à ces bactéries, mais certaines espèces telles que la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) peuvent développer de l'arthrite ou des cardites suite à une infection expérimentale (Moody *et al.*, 1994 ; Voordouw *et al.*, 2015). Le stress induit par la migration de certains oiseaux pourrait réactiver une infection latente à *Bbsl* chez certains individus, qui seraient ensuite capables de transmettre cette infection aux tiques se nourrissant sur eux. C'est notamment le cas pour la Grive mauvis (*Turdus iliacus*) (Gylfe *et al.*, 2000). Une autre étude réalisée sur le Merle noir suggère qu'une réactivation d'une infection par *Bbsl* est possible chez cette espèce suite à un stress (détection des *Bbsl* dans le sang de ces oiseaux), sans toutefois que ces oiseaux soient ensuite capables de retransmettre cette infection à des tiques naïves (Norte *et al.*, 2022). Une étude réalisée sur le Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*) a montré que l'infectiosité de ces oiseaux diminuait au bout de deux mois, et devenait nulle à partir de six mois (Richter *et al.*, 2000). Cette étude a aussi montré que ces oiseaux pouvaient s'infecter à nouveau au contact d'une tique infectée par *Bbsl*. Chez les rongeurs, la durée d'infectiosité semble varier en fonction des espèces concernées : elle diminuerait fortement au bout de quelques semaines chez la souris à pattes blanches (Lindsay *et al.*, 1997). Le campagnol roussâtre ou certaines espèces de mulots seraient quant à eux infectieux tout au long de leur vie (Lindsay *et al.*, 1997).

d. Importance de l'écosystème dans la dynamique des *Bbsl*

In fine, la transmission et le maintien des *Bbsl* dans un environnement donné sont dépendants de l'écosystème au sein duquel ces *Bbsl* évoluent. *Ixodes ricinus* est la principale tique vectrice des *Bbsl* en Europe, elle s'infecte principalement en réalisant un repas sanguin sur un hôte infecté. Ainsi, le nombre et les espèces de tiques présentes dans l'écosystème vont influencer sur la transmission des *Bbsl* aux hôtes. La densité d'une espèce animale hôte donnée ainsi que sa charge en tiques contribuent à la production de tiques dans le milieu.

Les préférences trophiques d'*I. ricinus* en fonction de sa stase (larvaire, nymphale, adulte), ainsi que la compétence de réservoir de ses hôtes pour *Bbsl* vont contribuer à l'expansion ou au contraire à la régression des différentes espèces de *Bbsl* au sein de l'écosystème. Les rongeurs et les oiseaux sont les hôtes principaux des stases larvaires et nymphales d'*I. ricinus*. Certaines de

⁴ Capacité de l'hôte à transmettre des *Bbsl* aux tiques durant leur repas sanguin

ces espèces sont des réservoirs pour *Bbsl. B. garinii* et *B. afzelii*, les deux *Bbsl* majoritairement retrouvées en Europe, ont pour réservoirs respectifs les oiseaux et les rongeurs. Certaines espèces d'oiseaux comme le Merle noir ou la Grive musicienne jouent un rôle important dans la circulation de *B. garinii*, car elles ont une charge en tique importante et qu'elles infectent un grand nombre de tiques qui se nourrissent sur elles.

En fonction du nombre d'espèces et d'individus compétents et non compétents présents dans l'écosystème, des effets de dilution (diminution du nombre de tiques infectées suite à l'augmentation du nombre d'individus non compétents dans le système), ou au contraire d'amplification (augmentation du nombre de tiques infectées suite à l'augmentation du nombre d'individus compétents dans le système) peuvent être observés, mais ces effets dépendent de nombreux facteurs et des controverses existent quant à leur importance relative dans les différents écosystèmes étudiés (Ratti *et al.*, 2021). Les modifications de ces écosystèmes, notamment à cause du changement climatique, pourraient donc entraîner une modification du risque d'infection pour l'homme, en modifiant la composition de la faune sauvage et son interaction avec *Bbsl*.

Les différences écologiques et épidémiologiques constatées entre les espèces de *Bbsl* sont liées à leur diversité génétique, certains gènes jouant notamment un rôle crucial dans l'interaction entre la bactérie et son hôte. Cette variabilité génétique explique les différences existant entre les *Bbsl* quant à leur capacité d'infection de différents types d'hôte (Oppler *et al.*, 2021).

D. Importance de la maladie de Lyme en santé publique et en santé animale

La maladie de Lyme est la maladie vectorielle la plus fréquente dans l'hémisphère Nord (Rochlin et Toledo, 2020). Elle peut notamment toucher l'homme et certains animaux domestiques (chien, cheval...). Le nombre de cas humains diagnostiqués estimés par an en France est compris entre 25 000 et 68 530 sur la période 2009-2020, avec une tendance à l'augmentation depuis 2009 (Santé Publique France, 2021). L'ampleur de l'augmentation de son incidence est actuellement controversée puisqu'elle pourrait être en partie due à une meilleure détection de la maladie et à un meilleur taux de déclaration (Sykes et Makiello, 2017). Cependant, les tiques transmettant la maladie de Lyme sont en expansion à travers l'Europe (Dantas-Torres, 2015). La diffusion et l'augmentation du nombre de tiques vectrices pourraient représenter un risque accru pour l'homme, bien que ce risque dépende de nombreux facteurs tels que l'utilisation des sols (transformation de la forêt en terrain agricole par exemple) ou la composition de la faune sauvage (Li *et al.*, 2019).

a. Modalités d'infection de l'hôte

Une tique naïve pour *Bbsl* s'infecte en réalisant un repas sanguin sur un hôte infecté. Les *Bbsl* restent ensuite dans le système digestif de la tique. Lors du repas sanguin suivant, les *Bbsl* se multiplient et migrent au niveau des glandes salivaires de la tique. Les *Bbsl* sont transmises à l'hôte lorsque la tique injecte sa salive dans la peau de celui-ci, ce qui diminue notamment la réaction immunitaire de l'hôte au niveau du site d'injection pendant la durée du repas sanguin (Tilly *et al.*, 2008 ; Coburn *et al.*, 2021). Les *Bbsl* migrent ensuite vers les tissus voisins de la peau ou dans diverses localisations (notamment les articulations) par voie hématogène. La majorité des symptômes et des dommages tissulaires provoqués par *Bbsl* serait due à la réaction immunitaire de l'hôte contre cette bactérie (Coburn *et al.*, 2021). La réponse immunitaire de l'hôte n'est pas toujours suffisante pour éliminer les *Bbsl*, et celles-ci peuvent échapper au système immunitaire de l'hôte, persistant ainsi dans l'organisme.

b. Symptômes et diagnostic de la maladie de Lyme chez l'homme

La maladie de Lyme est une maladie qui peut provoquer de nombreux symptômes chez l'homme, parfois peu spécifiques. Le diagnostic de cette maladie combine les aspects cliniques et épidémiologiques (antécédent de morsure de tique, métier ou loisir à risque de contact avec une tique...), auxquels s'ajoutent parfois des tests diagnostiques. Cependant, les personnes malades ne se souviennent pas toujours d'avoir été mordues par une tique. La sérologie peut être utilisée afin de détecter des anticorps anti-*Bbsl* chez le patient. Une sérologie en deux temps est généralement réalisée, avec d'abord un test ELISA, puis un Western blot lorsque le test ELISA est positif ou douteux. Néanmoins, ces tests ne permettent pas de différencier une infection active d'une infection ancienne (Marques, 2015). De plus, certaines personnes ne développent jamais de symptômes suite à l'infection : en Europe, près de 50 % des personnes infectées pourraient être asymptomatiques (Radolf *et al.*, 2021). Ainsi, le diagnostic de la maladie de Lyme peut être difficile à établir.

La liste des symptômes possibles et des recommandations diagnostiques associées présentée ci-dessous est issue de la fiche de recommandation de la Haute Autorité de Santé (HAS) concernant la maladie de Lyme et publiée en juin 2018 (Haute Autorité de Santé, 2018), ainsi que d'une revue des recommandations européennes et nord-américaines concernant le diagnostic de cette maladie (Eldin *et al.*, 2019).

La maladie de Lyme peut évoluer selon trois phases : la phase localisée précoce, la phase précoce disséminée et la phase tardive disséminée.

- *Phase localisée précoce*

La phase localisée précoce est caractérisée par l'apparition d'un érythème migrant (EM) au bout de quelques jours à plusieurs semaines après une morsure de tique. C'est une lésion circulaire qui peut s'étendre de manière centrifuge et dont le centre tend à s'éclaircir avec le temps, donnant un aspect caractéristique en forme de cible dans les formes les plus classiques (Figure 5). Cette lésion disparaît généralement en quelques mois. Le diagnostic est ici clinique, la sérologie n'est pas recommandée en raison de son manque de sensibilité lors de la phase précoce (40-60 % de sensibilité) (Eldin *et al.*, 2019).

Figure 5 : Photographie d'un érythème migrant suite à une morsure de tique (Gathany, 2007)



- *Phase précoce disséminée*

La phase précoce disséminée apparaît lorsque les *Bbsl* ont migré dans l'organisme. On la qualifie de précoce car les symptômes débutent moins de six mois après la morsure de tique ou après les premiers symptômes (EM). Lors de cette phase, le patient peut présenter différentes manifestations, parfois associées à des signes généraux peu spécifiques (fièvre, asthénie, myalgie, etc) :

- Un EM à localisation multiple, caractérisé par plusieurs lésions érythémateuses sur le corps du patient. Le diagnostic de l'EM multiple est clinique, celui-ci apparaît généralement plusieurs jours à plusieurs semaines après la morsure.
- Un lymphocytome borrélien, qui est une manifestation rare mais typique de la borréliose de Lyme. Il apparaît généralement entre un et deux mois après la morsure. C'est une lésion nodulaire (plus rarement en plaque) dont la couleur peut varier du rose au violet, qui est le plus souvent localisée dans certaines parties précises du corps telles que le lobe de l'oreille ou la poitrine (Figure 6).

Figure 6 : Photographie d'un lymphocytome borrélien (Palmen et al., 2010)



En cas de lymphocytome borrélien, le consensus pour le diagnostic est de réaliser une sérologie en deux temps. La sensibilité de la sérologie est estimée entre 70 et 95 % (Eldin *et al.*, 2019). Une biopsie de la lésion peut aussi être effectuée, notamment en cas de sérologie négative ou douteuse afin de réaliser une analyse histologique ainsi qu'une PCR pour la détection des *Bbsl*.

- Une neuroborréliose précoce, affection neurologique apparaissant généralement entre un et trois mois après la morsure de tique, et qui peut toucher le système nerveux central ou périphérique d'un individu. En Europe, la forme la plus fréquente est la méningoradiculite (inflammation des méninges rachidiennes et des racines nerveuses), qui cause notamment des douleurs résistantes aux analgésiques ainsi qu'une parésie. Des maux de tête sont présents chez près de la moitié des patients. La paralysie faciale est fréquente lors de neuroborréliose. Le diagnostic repose sur l'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR), pour mettre en évidence une élévation des taux de protéines et de leucocytes, ainsi qu'une synthèse intrathécale d'anticorps anti-*Bbsl* (sensibilité supérieure à 80 %) (Eldin *et al.*, 2019). La HAS recommande aussi de réaliser une sérologie en deux temps en complément de cette analyse.

- L'arthrite de Lyme, pouvant toucher une ou plusieurs articulations touche préférentiellement les genoux. Cette manifestation de la maladie peut être précoce ou tardive, et survenir entre quelques jours et plusieurs années après apparition de l'EM. Sans traitement, l'évolution se fait par poussées, et la douleur est modérée. Le diagnostic repose sur la sérologie en deux temps, l'analyse du liquide synovial et la réalisation d'une PCR sur liquide synovial.
- D'autres manifestations rares et moins spécifiques sont possibles, notamment des manifestations cardiaques et oculaires. Le diagnostic repose alors sur la sérologie, l'épidémiologie et l'exclusion d'autres causes pouvant expliquer les symptômes. Des prélèvements pour PCR peuvent être réalisés dans certains cas.

- *Phase tardive disséminée*

Lors de la phase tardive disséminée, les symptômes apparaissent plus de 6 mois après la morsure de tique ou les premiers symptômes de la maladie. Cette phase est associée à plusieurs manifestations cliniques.

- L'acrodermatite chronique atrophiante : c'est une affection cutanée qui apparaît plusieurs mois ou années après la morsure de tique, la plupart du temps chez les patients de plus de 50 ans. On observe d'abord un érythème violacé œdémateux, qui évolue vers une atrophie de la peau qui devient de couleur violette ou marron. C'est une lésion non douloureuse généralement située sur les extrémités. Elle est associée à une neuropathie périphérique et à une hyperesthésie dans 50 % des cas. Le diagnostic repose sur la clinique associée à une sérologie. En cas de doute, une biopsie cutanée peut être réalisée pour examen histologique et PCR.
- La neuroborréliose tardive : une neuroborréliose est dite tardive lorsque les symptômes neurologiques durent depuis plus de 6 mois. Cette affection rare peut toucher le système nerveux central ou périphérique, et provoquer de nombreux symptômes neurologiques (monoplégies, paraplégies, troubles cognitifs, paresthésie des membres...). On retrouve par exemple des encéphalomyélites chroniques ou des méningo-encéphalites lors d'atteinte du système nerveux central. Le diagnostic repose principalement sur la sérologie qui est positive dans la majorité des cas, et l'analyse du LCR selon les mêmes critères que pour la neuroborréliose précoce.

c. Traitement et pronostic de la maladie de Lyme chez l'homme

Le traitement recommandé par la HAS en 2018 consiste en l'administration d'antibiotiques (Haute Autorité de Santé, 2018). La doxycycline par voie orale est l'antibiotique préconisé en première intention (200 mg/j chez l'adulte ou 4 mg/kg/j chez l'enfant de plus de huit ans). La durée du traitement varie de 14 à 28 jours en fonction de la forme de la maladie développée par le patient. En cas de contre-indication ou dans certains cas spécifiques, d'autres antibiotiques tels que l'amoxicilline, l'azithromycine ou la ceftriaxone sont préconisés.

L'évolution de la maladie après traitement est généralement favorable, et la plupart des patients guérissent complètement en quelques mois (Garcia-Monco et Benach, 2019 ; Radolf *et al.*, 2021). La maladie peut cependant être fatale dans un nombre très restreint de cas, suite à des complications cardiaques (Radolf *et al.*, 2021). Cependant, des symptômes non spécifiques tels qu'une fatigue intense, des douleurs diverses ou des troubles cognitifs peuvent persister plusieurs

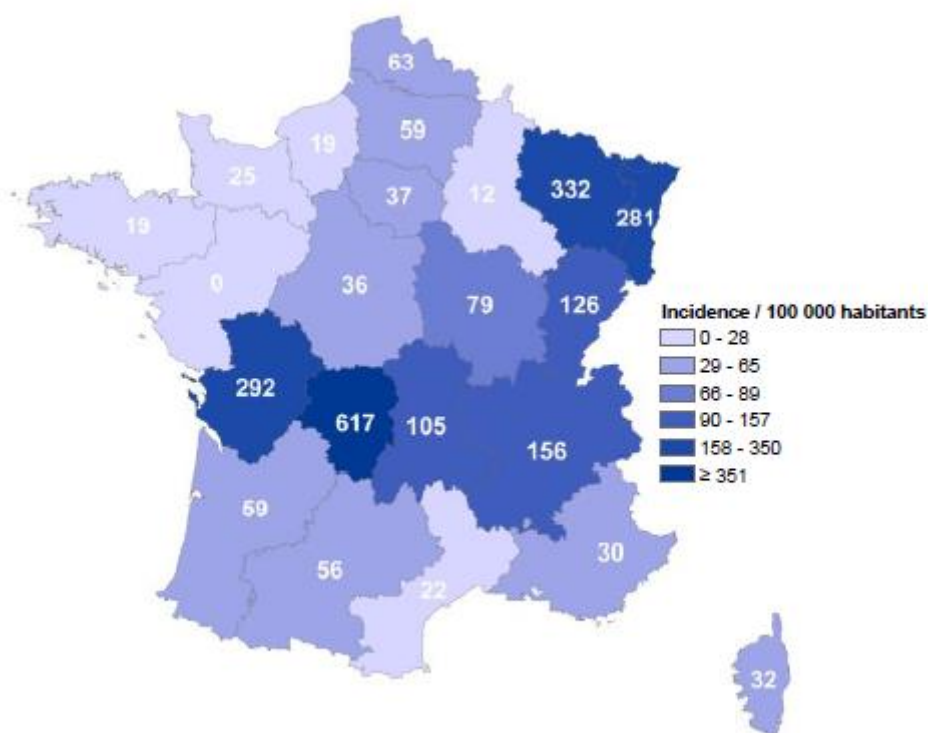
mois après le traitement. Cette persistance de symptômes durant plus de six mois, et étant apparus dans les six mois après le diagnostic et le traitement de la maladie de Lyme porte le nom de syndrome post-Lyme. Les mécanismes à l'origine de ce syndrome sont méconnus, et celui-ci est sujet à débat. Il n'est pas toujours évident de relier ces symptômes de façon certaine à la maladie de Lyme, et les études portant sur ce sujet sont difficiles à comparer, notamment à cause de leur hétérogénéité (nombre de patients suivis, couverture géographique de l'étude, traitement administré...) (Mac *et al.*, 2020). Une étude réalisée aux Pays-Bas sur plus de 1000 patients diagnostiqués et traités pour la maladie de Lyme a montré que la prévalence de symptômes persistants était significativement plus élevée chez ces patients, comparée à la population générale et aux personnes mordues par une tique sans avoir développé la maladie (prévalence de 27,2 % versus 21,2 % et 23,3 %, respectivement) (Ursinus *et al.*, 2021).

d. Données épidémiologiques disponibles en Europe et en France

Il existe de fortes disparités concernant l'incidence de la maladie chez l'homme en Europe (SPILF, 2006). L'incidence la plus forte est observée en Europe centrale, avec une estimation de plus de 100 cas/100 000 habitants/an en Autriche et en Slovénie. L'EM est la manifestation la plus fréquente et apparaît dans 40 à 70 % des cas. Lors de phases précoces disséminées, les neuroborrélioses sont les formes les plus fréquentes (environ 15 % des patients atteints de maladie de Lyme). Viennent ensuite l'arthrite (environ 14 % des cas), les myalgies (9 à 13 % des cas) et l'EM multiple (3 à 4 % des cas). Le lymphocytome borrélien est présent dans moins de 3 % des cas, et est plus fréquent chez l'enfant. Concernant les phases tardives disséminées, les neuroborrélioses tardives représentent moins de 10 % des cas de neuroborrélioses. L'acrodermatite chronique atrophiante est présente dans 0,3 à 5 % des cas, et touche préférentiellement les femmes adultes.

En France métropolitaine, un réseau de surveillance Sentinelles permet depuis 2009 de suivre l'évolution du nombre de cas de maladie de Lyme déclarés d'une année sur l'autre. Les cas déclarés par les médecins Sentinelles sont ensuite validés par un groupe d'experts composé de cliniciens, de microbiologistes et d'épidémiologistes sur la base de différents critères (présence d'EM, sérologie positive en ELISA...). Entre 2009 et 2016, 1 163 cas ont été déclarés par les médecins Sentinelles, parmi lesquels 819 ont été validés par le groupe d'experts. Sur cette période, la majorité des cas de maladie de Lyme (85 %) ont été diagnostiqués entre mars et octobre, avec un pic en juillet (Fournier *et al.*, 2018). Le taux d'incidence de la maladie est variable selon les régions de France (Figure 7) : les incidences élevées (>100/100 000) concernent les régions de l'Est et du Centre de la France. La région avec le plus fort taux d'incidence en 2016 était le Limousin, avec 617 cas estimés pour 100 000 habitants. Au niveau national, le taux d'incidence en 2016 était estimé à 84 cas pour 100 000 habitants.

Figure 7 : Estimation du taux d'incidence annuel de la maladie de Lyme en 2016 par région en France (Vaissière *et al.*, 2018)



Le taux d'incidence annuel estimé pour la maladie de Lyme en France est donc assez faible, ce qui peut notamment s'expliquer par le faible risque de développer la maladie après une morsure de tique. Selon le site internet de l'INRAE⁵, le pourcentage de tiques infectées en France varie de 0 à 20 % selon les régions et les saisons. Plusieurs études menées en Europe ont montré que la probabilité d'être malade après avoir été piqué par une tique infectée par *Bbsl* est d'environ 6 %. Plus de 90 % des personnes piquées par des tiques infectées ne développent donc pas la maladie (INRAE, 2020).

En parallèle du réseau Sentinelles, une surveillance des cas de borréliose de Lyme hospitalisés en France a été mise en place à partir de la base du Programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI). À partir des données issues de cette surveillance, une étude a été réalisée sur la période 2005-2016 (Septfons *et al.*, 2018). Cette étude a permis d'estimer l'incidence et les tendances des cas de maladie de Lyme hospitalisés et de décrire leurs manifestations cliniques. Le nombre annuel de cas hospitalisés était en moyenne de 799 par an. La durée médiane d'hospitalisation était de quatre jours. Le taux d'incidence hospitalière moyen sur la période a été estimé à 1,3 pour 100 000 habitants par an.

Le risque d'attraper la maladie de Lyme après une morsure de tique est donc relativement faible, et dans la plupart des cas les malades présentent des signes cliniques peu graves, tels que l'érythème migrant. Cependant, une prise en charge précoce du patient et l'administration d'antibiotiques adaptés est essentielle pour éviter l'évolution de la maladie vers des formes graves. Les neuroborrélioses sont les formes graves les plus fréquentes, et elles représentent près de la

⁵ Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

moitié des cas d'hospitalisation pour maladie de Lyme en France. L'importance d'une prise en charge adaptée est aussi justifiée par l'errance médicale de certains patients, qui doivent parfois consulter plusieurs médecins et patienter des mois ou des années avant d'obtenir le bon diagnostic. Une prise en charge précoce et rapide permettrait donc de réduire le coût que représente cette maladie pour le système de santé publique.

e. Signes cliniques de la maladie de Lyme chez les animaux domestiques

Les *Bbsl* peuvent aussi infecter les animaux domestiques, notamment le chien, le chat, le cheval et les animaux de production tels que les vaches et les moutons.

D'après le consensus ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine) datant de 2018, les *Bbsl* peuvent infecter les chiens et les chats, qui sont asymptomatiques dans plus de 95 % des cas. Chez le chien, la forme la plus courante de la maladie est l'arthrite de Lyme. D'autres manifestations cliniques (néphrite, cardite, problèmes neurologiques), pourraient aussi se produire chez le chien en cas d'infection, mais les données de la littérature sont insuffisantes pour affirmer le lien entre l'infection par *Bbsl* et ces manifestations (Littman *et al.*, 2018). De la fièvre, une léthargie ainsi qu'une anorexie transitoires peuvent aussi être observées (Littman *et al.*, 2006). Il n'y a à ce jour aucune étude montrant que l'infection par *Bbsl* provoque des symptômes chez le chat. Un rapport de cas a été fait en 2020 concernant deux chats qui auraient contracté une cardite de Lyme suite à une infection par *Bbsl* (Tørnqvist-Johnsen *et al.*, 2020).

Chez les chevaux, qui peuvent aussi être asymptomatiques, les symptômes les mieux documentés en lien avec la maladie de Lyme sont la neuroborréliose, l'uvéite et le pseudolymphome cutané (Divers *et al.*, 2018). D'autres signes cliniques tels qu'une raideur, une léthargie ou une boiterie pourraient aussi être causés par cette maladie.

Les animaux de production porteurs de *Bbsl* semblent majoritairement asymptomatiques. Les signes cliniques relatifs à cette maladie chez le bétail pourraient inclure la fièvre, une raideur, le gonflement des articulations et la diminution de la production de lait. La maladie de Lyme pourrait aussi entraîner une perte de poids chronique, des fourbures et des avortements (Stefancíková *et al.*, 2002 ; Garcia *et al.*, 2022).

L'impact de la maladie de Lyme sur la santé des animaux domestiques est peu documentée, mais ceux-ci semblent majoritairement asymptomatiques. Les animaux de production ne semblent pas être des hôtes compétents pour *Bbsl* (Richter et Matuschka, 2010). Une étude menée sur 11 chiens suggère que ceux-ci pourraient être des hôtes compétents pour *Bbss* (Mather *et al.*, 1994), mais d'autres études seraient nécessaires pour confirmer ce résultat. Les chiens pourraient donc contribuer à produire des tiques infectées dans le milieu extérieur, mais de manière bien moindre que les réservoirs sauvages des *Bbsl*. De plus, la possession d'un chien infecté par *Bbsl* ne semble pas augmenter le risque d'infection chez son propriétaire (Goossens *et al.*, 2001).

2. Phylogénie des *Bbsl*

La diversité génétique des *Bbsl* est liée à l'éco-épidémiologie de ces bactéries, les différentes espèces de *Bbsl* étant retrouvées chez différentes espèces hôtes. De plus, la diversité génétique des *Bbsl* conditionne aussi leur pathogénicité, notamment pour l'être humain. Même au sein d'une espèce, des différences de pathogénicité sont constatées, en lien avec la diversité de certains gènes nécessaires à l'interaction entre *Bbsl* et son hôte (Hanincova *et al.*, 2013 ; Cerar *et*

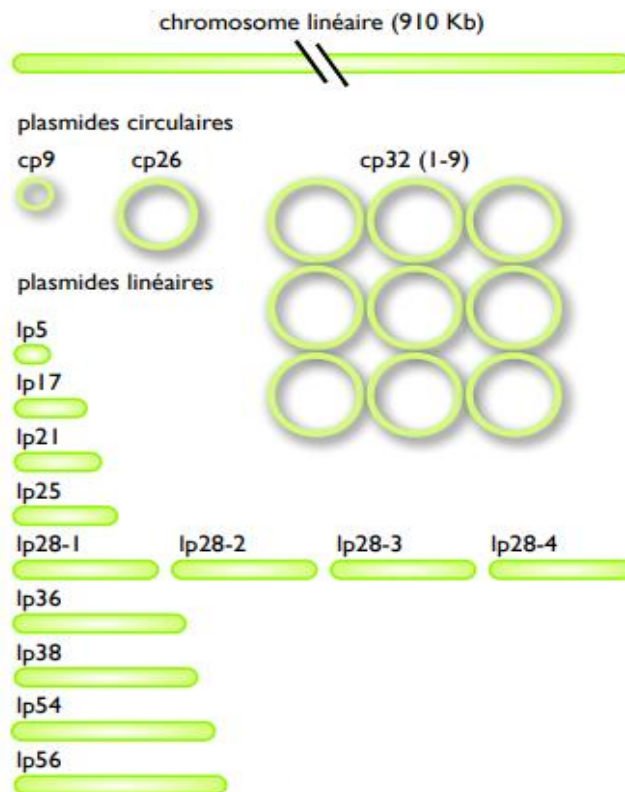
al., 2016). La phylogénie est l'étude des liens existant entre différents taxa⁶. La construction d'arbres phylogénétiques⁷ permet d'étudier la diversité génétique des *Bbsl*, et de formuler des hypothèses sur les liens entre diversité génétique et éco-épidémiologie de ces bactéries, notamment sur les relations entre les *Bbsl* et leur type d'hôte ou de vecteurs.

A. Description du génome des *Bbsl* et séquences d'intérêt en phylogénie

Le génome des *Bbsl* est un des plus petits génomes bactériens connus à ce jour (Seifert *et al.*, 2015). Paradoxalement, celui-ci figure parmi les génomes comptant le plus de plasmides⁸. Les séquençages complets du génome ont permis de mettre en évidence un chromosome linéaire, d'environ 900 kpb (kilo paires de base), ainsi que de nombreux plasmides (entre 7 et 21), linéaires et circulaires, de tailles diverses (de 5 à 84 kpb) (Figure 8) (Schwartz *et al.*, 2021). La plupart des gènes de ménage, qui sont des gènes assurant les fonctions essentielles à la bactérie, se trouvent sur le chromosome. Celui-ci est globalement conservé d'une *Bbsl* à l'autre (mêmes séquences génétiques et organisation). Au contraire, les plasmides, qui portent la plupart des gènes codant les protéines de surface permettant l'interaction entre la bactérie et ses hôtes, sont beaucoup plus variables (Schwartz *et al.*, 2021).

Figure 8 : Organisation du génome de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Stewart *et al.*, 2005)

Chaque plasmide est nommé *lp* (plasmide linéaire) ou *cp* (plasmide circulaire), suivi de sa taille approximative en kilo paires de base.



⁶ Groupes définis par un ensemble de caractéristiques que partagent tous les éléments de ces groupes

⁷ Représentations graphiques permettant de visualiser les liens entre les différents taxa

⁸ Fragment d'ADN extrachromosomique

Les progrès techniques dans le domaine de la génétique ont permis d'étudier de plus en plus précisément le génome des bactéries, notamment grâce à la généralisation de la PCR et du séquençage. Ces techniques permettent aujourd'hui d'obtenir rapidement et pour un coût limité différentes séquences génétiques. Les méthodes d'étude du génome des *Bbsl* ainsi que les séquences génétiques utilisées dans le cadre des analyses phylogénétiques sont nombreuses et ont beaucoup évolué ces dernières années (Margos *et al.*, 2011 ; Schwartz *et al.*, 2021).

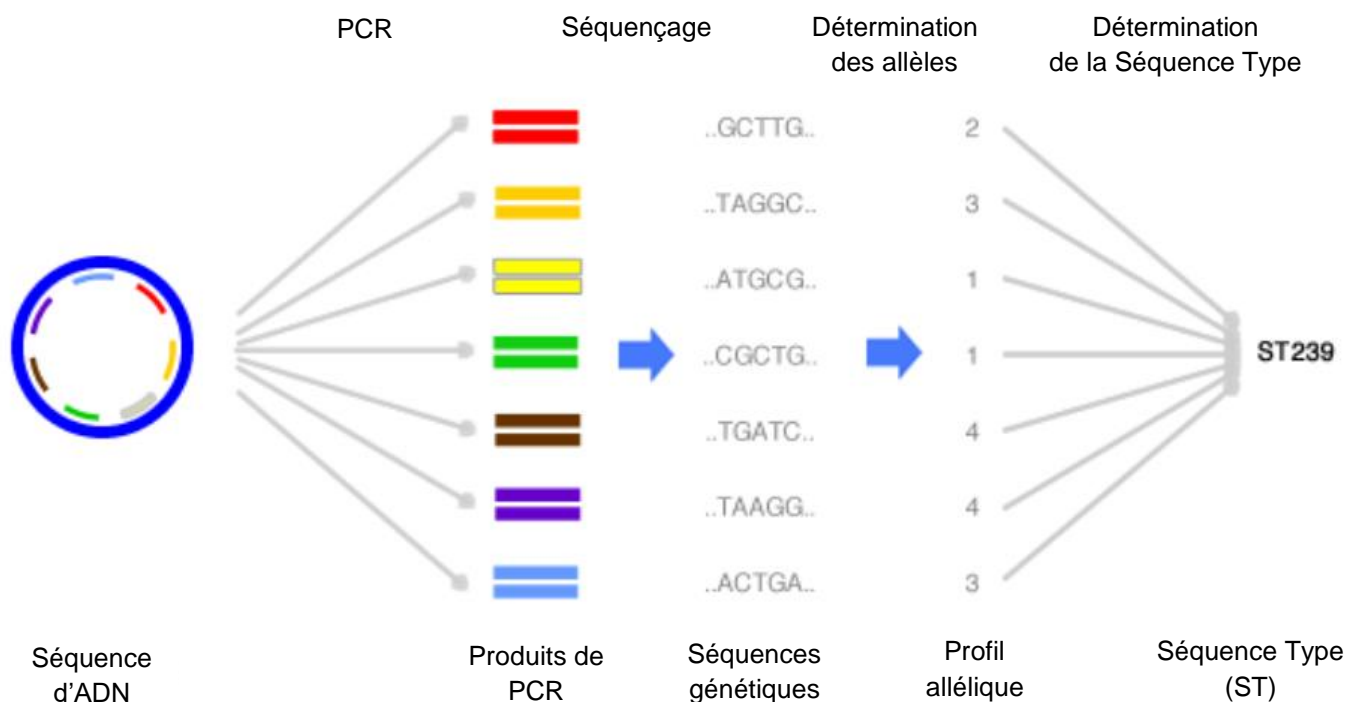
Les premières analyses phylogénétiques réalisées sur les *Bbsl* ne ciblaient qu'un seul voire deux ou trois gènes/séquences génétiques. Le gène de la flagelline (*flaB*), autrefois considéré comme un marqueur phylogénétique capable de discriminer les différentes espèces de *Borrelia*, a été utilisé lors de plusieurs études phylogénétiques (Fukunaga *et al.*, 1996 ; Chao et Shih, 2009 ; Aslam *et al.*, 2012). C'est un gène codant une des protéines constitutives des flagelles périplasmiques des *Bbsl* (Zhang *et al.*, 2019). Ce gène est situé sur le chromosome linéaire des *Bbsl*, et il est peu variable (Chao et Shih, 2009). Le gène *ospC* (outer surface protein C), qui code une lipoprotéine de surface exprimée lors de la phase précoce d'infection de l'hôte vertébré, a aussi régulièrement été utilisé en phylogénie. *OspC* est situé sur le plasmide cp26, c'est un gène très variable chez les différentes souches de *Bbsl* (Schwartz *et al.*, 2021).

Cependant, le développement de techniques permettant d'étudier plusieurs séquences génétiques simultanément, et ayant permis d'identifier de nouvelles espèces de *Bbsl* a montré les limites des méthodes se concentrant sur un seul ou sur un petit nombre de gènes/séquences (Schwartz *et al.*, 2021). Ces méthodes ne permettent pas toujours d'obtenir une diversité génétique suffisante entre les souches étudiées, et qui soit représentative de l'histoire évolutive de ces souches.

Ainsi, la plupart des études phylogénétiques récentes ciblant les *Bbsl* utilisent le MLST (MultiLocus Sequence Typing). Le MLST consiste à cibler un ensemble de gènes et à les séquencer entièrement ou en partie, un locus étant l'emplacement d'un gène sur un chromosome. Ces gènes sont ensuite comparés à ceux de souches présentes dans une base de données (par exemple pubMLST), et un profil allélique est déterminé en fonction des divergences constatées (Figure 9). Le MLST cible souvent chez les *Bbsl* huit gènes de ménage, qui peuvent différer selon les études, et qui peuvent être associés au séquençage de gènes ou de séquences supplémentaires (Margos *et al.*, 2011 ; Takano *et al.*, 2011 ; Rudenko *et al.*, 2014).

Figure 9 : Fonctionnement du MultiLocus Sequence Typing (MLST) (Hyun-chan, 2015)

La détermination des allèles se fait par comparaison avec une base de données (par exemple pubMLST). Si l'allèle d'intérêt se trouve dans la base de données, celui-ci se voit attribuer le numéro associé à sa séquence génétique. Sinon, un numéro arbitraire lui est attribué. Chaque Séquence Type (ST) représente un profil allélique, des souches avec une même ST sont identiques pour les séquences génétiques étudiées.



B. Phylogénie et épidémiologie moléculaire : les principes

a. Définition et principe de la phylogénie

La phylogénie est l'étude des liens existant entre différents taxa, elle permet leur classement et la déduction de leur histoire évolutive. Un taxon est un groupe défini par un ensemble de caractéristiques que partagent tous les éléments de ce groupe (par exemple, différentes espèces peuvent constituer différents taxa). Parfois, le groupe peut ne comporter qu'un seul élément. C'est notamment le cas lors d'études entre différentes bactéries, où chaque individu est un taxon. Les arbres phylogénétiques sont des représentations graphiques permettant de visualiser les liens entre les différents taxa. Les premières classifications des êtres vivants résultaient de l'observation de leur phénotype⁹, les organismes se ressemblant le plus étant supposés les plus proches.

La phylogénie moléculaire est la discipline qui étudie les relations entre les taxa en se basant sur des molécules telles que l'ADN/ARN ou les protéines. C'est une discipline qui a connu un grand essor ces dernières années, grâce aux progrès des techniques qui ont permis d'obtenir plus facilement et à moindre coût des séquences génétiques. Elle est aujourd'hui régulièrement utilisée pour étudier les relations entre différentes bactéries, virus, etc. Cependant, lorsque seule

⁹ Ensemble des caractères apparents d'un individu

une partie du génome est utilisée, une connaissance relative de celui-ci est nécessaire, afin de savoir quel gène (ou séquence d'ADN/ARN) utiliser pour la comparaison (Brown, 2002 ; Schwartz *et al.*, 2021). En phylogénie moléculaire, les relations entre les taxa sont étudiées en construisant des arbres phylogénétiques qui comparent les séquences génétiques ou protéiques issues de ces taxa.

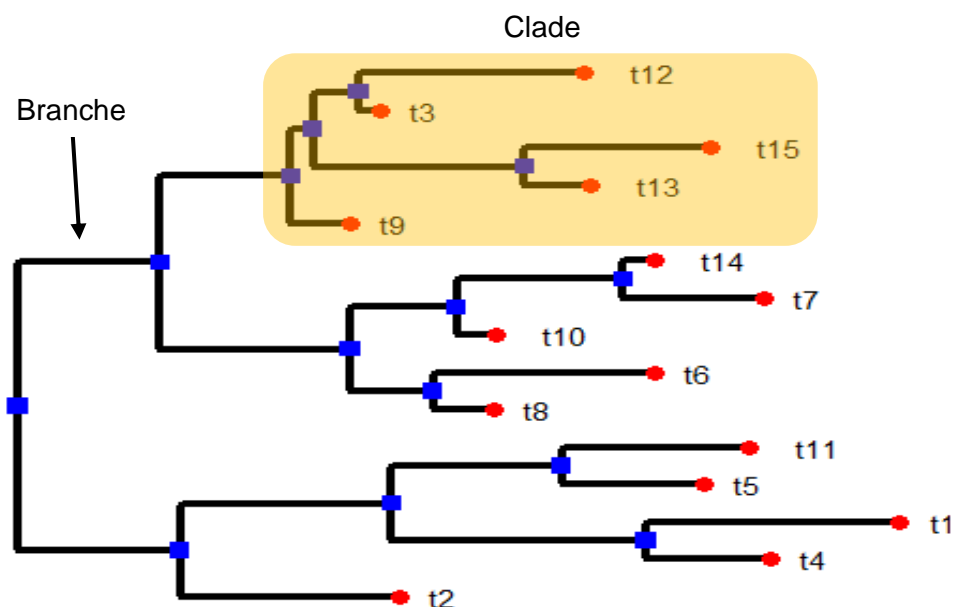
b. Construction d'un arbre phylogénétique

- *Caractéristiques d'un arbre phylogénétique*

Un arbre phylogénétique est constitué de feuilles et de nœuds internes, reliés entre eux par des branches (Figure 10). Les feuilles sont les nœuds terminaux de l'arbre et représentent les différents taxa étudiés. Les nœuds internes correspondent à des ancêtres hypothétiques communs à plusieurs feuilles. La topologie de l'arbre correspond à la forme générale de l'arbre. La longueur des branches peut être sans signification, représenter l'importance des changements survenus entre deux nœuds, ou la quantité de temps écoulée (Baum, 2008 ; Drummond et Bouckaert, 2015).

Figure 10 : Exemple d'arbre phylogénétique

t1 à t15 sont les noms des différents taxa étudiés. Les ronds rouges sont les feuilles de l'arbre (taxa), et les carrés bleus les nœuds internes (ancêtres communs).



Un clade est défini comme un groupe constitué par un ancêtre commun et l'ensemble de ses descendants. Les éléments (nœuds et feuilles) présents dans un clade sont plus proches entre eux que de n'importe quels autres éléments figurant dans l'arbre.

- *Distance génétique et modèle de substitution*

Un arbre phylogénétique est construit en comparant des séquences génétiques alignées, afin de déterminer quelles sont les séquences les plus proches pour pouvoir les rassembler et former des clades. On suppose que la distance génétique entre deux séquences représente la proximité des séquences d'un point de vue évolutif : deux séquences avec une distance faible

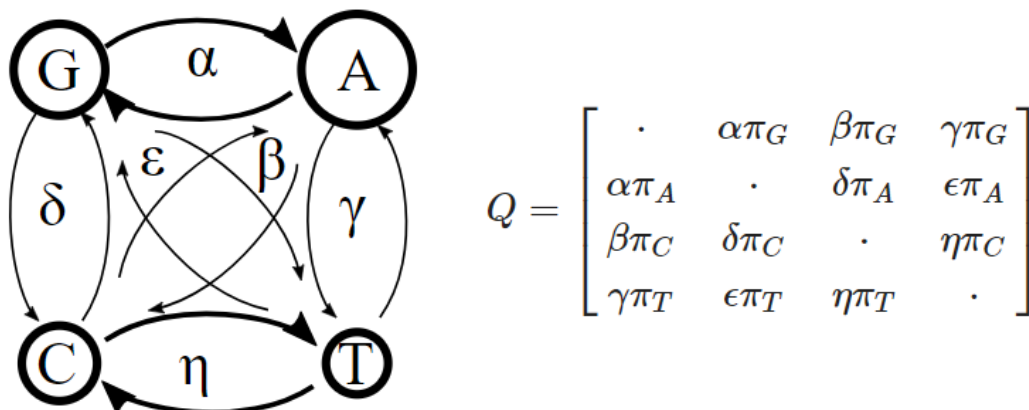
seront supposées avoir divergé plus récemment de leur ancêtre commun que des séquences avec une distance plus grande.

La méthode la plus simple pour mesurer la distance génétique entre deux séquences est de compter le nombre de sites¹⁰ pour lesquels ces séquences diffèrent (distance de Hamming) (Hamming, 1950). Une proportion de sites différents entre les deux séquences est ensuite calculée grâce à ce nombre. Cependant, la comparaison directe de deux séquences ne permet pas de déterminer précisément la distance entre ces deux séquences. En effet, certains phénomènes peuvent entraîner une surestimation ou une sous-estimation de la distance génétique. Par exemple, si un nucléotide T d'une séquence est substitué par un A puis à nouveau par un T, et que ces substitutions ne sont pas prises en compte, la distance génétique de cette séquence avec une autre sera sous-estimée. De plus, les taux de substitutions entre les différents nucléotides peuvent varier (par exemple, la substitution A → G est plus fréquente que A → C).

Ainsi, pour essayer de prendre en compte ces phénomènes de substitutions et de variation des taux de substitutions, des modèles de substitutions de nucléotides peuvent être appliqués, afin de corriger la mesure de la distance génétique. Un modèle de substitution permet de décrire la fréquence des nucléotides ainsi que les taux de substitutions dans les séquences étudiées. Un des modèles de substitution les plus simples est le modèle de Jukes and Cantor (1969), pour lequel tous les nucléotides ont la même fréquence, avec des taux de substitutions égaux entre les nucléotides. D'autres modèles existent, avec des fréquences et/ou des taux de substitutions variables entre les nucléotides. Un des modèles les plus généralistes, et qui est fréquemment utilisé dans le cadre d'analyses phylogénétiques, est le modèle GTR (General Time Reversible) (Xia, 2018). Dans ce modèle, la fréquence ainsi que les taux de substitutions des nucléotides sont différents (Figure 11).

Figure 11 : Représentation schématique des substitutions possibles (à gauche) et matrice de substitution Q associée au modèle GTR (à droite) (Drummond, 2023)

Les quatre cercles noirs de la figure de gauche représentent les quatre nucléotides A, T, G, C. Les flèches indiquent la substitution d'un nucléotide vers l'autre. Dans le modèle GTR, le taux de substitutions entre chaque paire de nucléotides est différent. Ces taux sont notés ici α , β , δ , ϵ , γ , η . A droite se trouve la matrice des taux de substitutions associée. π est la fréquence des différents nucléotides, et $\pi_A \neq \pi_T \neq \pi_G \neq \pi_C$. Par exemple, $\alpha\pi_A$ représente le taux de substitutions de A en G.



¹⁰ Emplacement d'un nucléotide

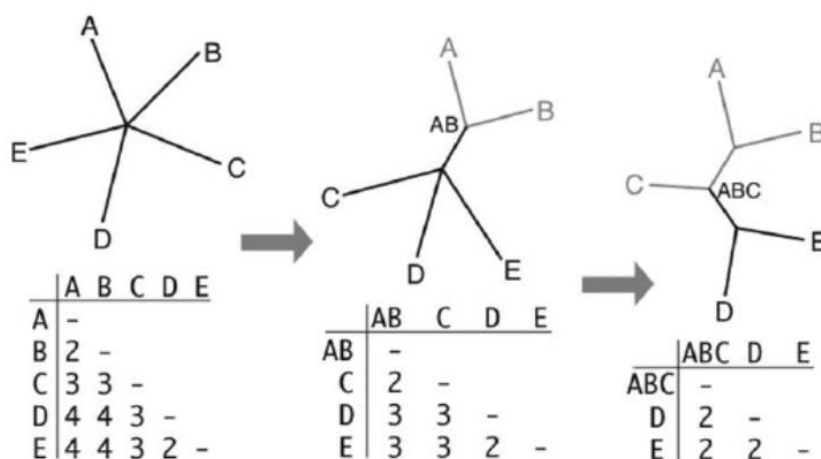
- *Méthodes utilisées pour la construction d'arbres phylogénétiques*

Deux types de méthodes sont utilisées pour la construction d'arbres phylogénétiques : les méthodes basées sur la distance ou les méthodes basées sur les caractères.

Les méthodes basées sur la distance reposent sur le calcul de la distance génétique entre les paires de séquences. Cette distance peut être calculée en utilisant différents modèles de substitutions. Une matrice des distances est ensuite créée, qui regroupe la distance génétique entre chaque paire de séquence. Puis un arbre phylogénétique est construit grâce à un algorithme qui va utiliser la matrice des distances pour identifier les séquences les plus proches et les regrouper (Yang et Rannala, 2012). La méthode des distances la plus utilisée aujourd'hui est le Neighbor Joining. C'est un algorithme qui débute avec arbre en étoile, c'est-à-dire où chaque séquence est isolée et à égale distance des autres, et qui regroupe ensuite les séquences (ou ensemble de séquences préalablement regroupées) deux à deux (Figure 12). Le choix des séquences à regrouper se fait de manière à minimiser la longueur des branches de l'arbre après agglomération.

Figure 12 : Construction d'un arbre phylogénétique par la méthode du Neighbor Joining (Dunn et al., 2011)

A, B, C, D, E représentent les taxa étudiés. Pour construire l'arbre phylogénétique, l'algorithme commence par mettre les taxa à égale distance les uns des autres, formant ainsi un arbre en étoile. Ensuite, les distances génétiques entre les différents taxa sont calculées et une matrice des distances est produite. Les deux taxa les plus proches sont regroupés (ici A et B, ou D et E), et une nouvelle matrice des distances est produite qui inclut l'ancêtre commun créé lors du regroupement (ici AB). Ces opérations se répètent jusqu'à obtention de l'arbre phylogénétique final. Le choix des taxa à regrouper se fait de manière à minimiser la longueur des branches de l'arbre après agglomération.



Les méthodes basées sur la distance ont l'avantage d'être rapides et de ne pas nécessiter beaucoup de puissance de calcul. Cependant, elles ne sont pas adaptées dans le cas de séquences fortement divergentes, et sont sensibles aux lacunes (trous) dans l'alignement des séquences génétiques (Yang et Rannala, 2012).

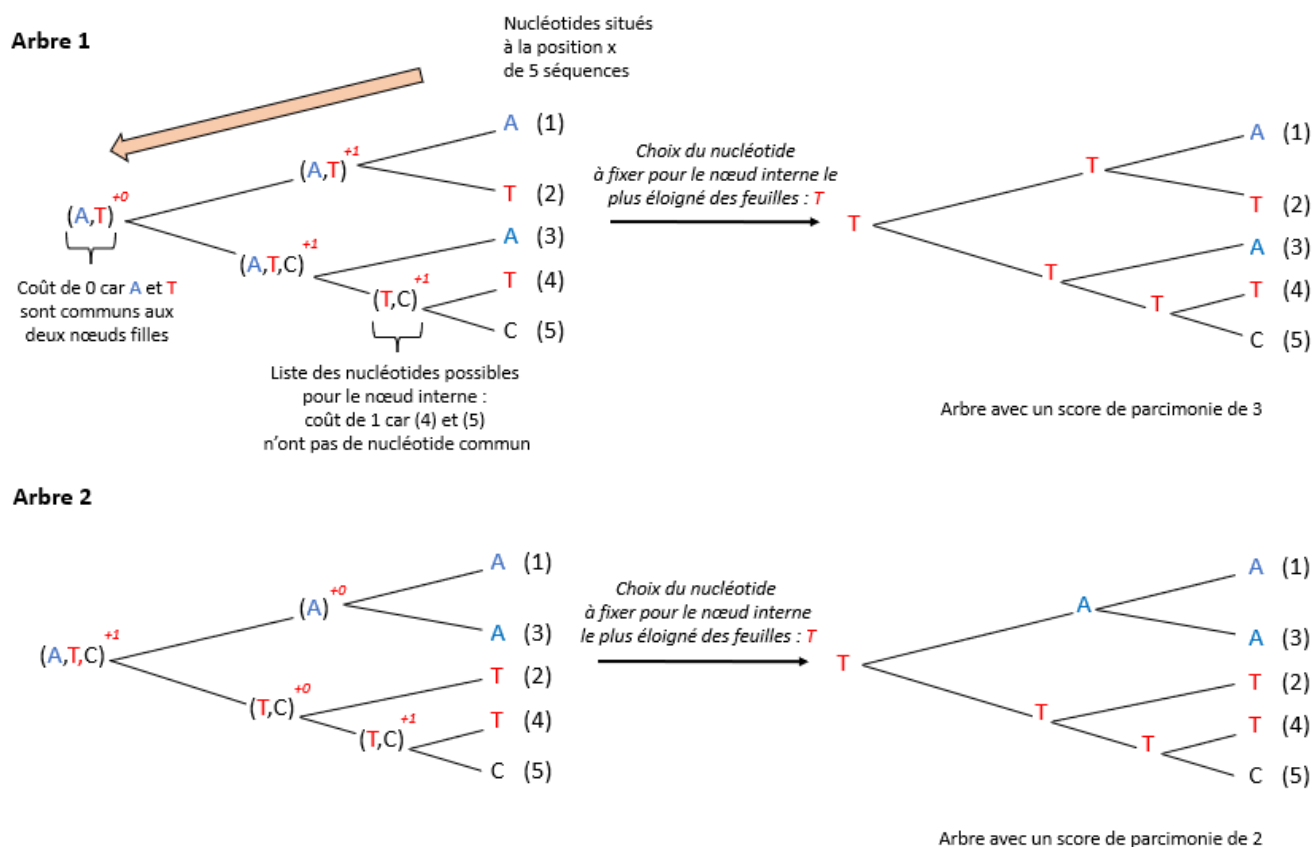
Les méthodes basées sur les caractères comparent simultanément l'ensemble des séquences alignées, un site à la fois. Un score est attribué à chaque arbre généré, et l'arbre possédant le meilleur score est conservé. Les principales approches utilisées sont : le maximum de parcimonie, le maximum de vraisemblance et l'inférence bayésienne, chaque méthode utilisant son propre système de score. Pour l'inférence bayésienne, le score correspond au degré de

confiance *a posteriori* que l'on peut avoir dans l'arbre obtenu : est-il probable qu'un tel arbre existe et les données lui étant associées sont-elles cohérentes ? Le score du maximum de vraisemblance correspond à la probabilité que l'arbre généré ait conduit aux données observées. Ce score est obtenu par des calculs probabilistes estimant la vraisemblance, l'ordre des branchements et la longueur des branches d'un arbre dans le cadre d'un modèle d'évolution probabiliste donné. Le score du maximum de parcimonie représente le nombre minimum de changements nécessaires à chaque site pour obtenir l'arbre (Yang et Rannala, 2012).

La méthode du maximum de parcimonie est une méthode rapide et simple à utiliser, par rapport au maximum de vraisemblance et à l'inférence bayésienne (Kapli *et al.*, 2020). Cette méthode, contrairement aux deux autres, n'utilise pas de modèle de substitution explicite. La construction de l'arbre se fait des feuilles vers les nœuds internes (Figure 13).

Figure 13 : Construction des arbres phylogénétiques selon le principe de parcimonie

La flèche orange représente le sens de construction de l'arbre. (1) à (5) représentent les différents taxa étudiés. Différentes couleurs sont utilisées pour représenter les nucléotides : bleu pour A, rouge pour T, noir pour C. En rouge sont notés les coûts associés à chaque nœud interne : +0 lorsqu'il y a un ou plusieurs nucléotides communs aux nœuds fils, +1 lorsqu'il n'y a aucun nucléotide en commun. Ici deux arbres sont générés, et l'arbre 2, dont le score de parcimonie est inférieur à l'arbre 1, sera conservé. Un seul site (emplacement de nucléotide) est ici représenté, le score de parcimonie de l'arbre correspond à la somme des scores de parcimonie calculés pour chaque site présent dans les séquences étudiées.



Une topologie¹¹ d'arbre est générée aléatoirement, et les nœuds internes se voient attribuer une liste des nucléotides possibles pour chaque site issu des séquences filles. Une fois les listes attribuées à tous les nœuds, un arbre est produit en fixant un des nucléotides du nœud le plus éloigné de l'ensemble des feuilles, et en sélectionnant les nucléotides des autres nœuds afin de limiter les substitutions. Le nombre de substitutions de l'arbre constitue le score de parcimonie, ce nombre étant la résultante de la somme des scores de parcimonie obtenus pour chaque site des séquences de chaque nœud (Goëffon *et al.*, 2010). Plusieurs algorithmes existent pour attribuer un score à l'arbre obtenu, l'algorithme de Fitch étant l'un des plus utilisés. Cet algorithme utilise une même fréquence de substitution pour tous les nucléotides (Xia, 2018). De nombreux arbres sont ainsi générés, et leur score de parcimonie est calculé. À la fin, l'arbre avec le plus petit score est retenu (arbre le plus parcimonieux). Explorer l'ensemble des arbres possibles est très chronophage, surtout lorsque beaucoup de séquences sont incluses dans l'analyse ou que leur longueur augmente. De ce fait, les méthodes d'exploration des arbres utilisent souvent des algorithmes tels que le SPR (subtree pruning and regrafting) qui recherchent le meilleur arbre possible sans toutefois tous les explorer. Cela est fait par exemple en partant du premier arbre généré, puis en calculant un nouveau score de parcimonie après inversion de deux branches. L'obtention de l'arbre avec le meilleur score n'est donc pas toujours garantie (Goëffon *et al.*, 2010).

c. Principes de l'épidémiologie moléculaire et lien avec la phylogénie

L'épidémiologie moléculaire est la discipline qui utilise des données moléculaires (ADN, ARN...) pour étudier la distribution et les déterminants des maladies chez les populations humaines et/ou animales (Riley et Blanton, 2018). Ces données moléculaires constituent une source d'information supplémentaire par rapport à l'épidémiologie classique. L'épidémiologie moléculaire peut s'appuyer sur la phylogénie, notamment lorsque la comparaison des souches est mise en relation avec des données épidémiologiques (distribution spatiale de l'agent pathogène, caractéristiques des hôtes, *etc*). En épidémiologie moléculaire, des arbres phylogénétiques sont par exemple construits pour comparer des souches virales ou bactériennes nouvellement isolées à un endroit donné à d'autres souches précédemment identifiées issues d'autres endroits. Ces arbres permettent notamment de mettre en évidence un lien potentiel entre proximité génétique et distribution spatiale, de détecter l'apparition de nouveaux variants et d'émettre des hypothèses quant à leur lieu d'émergence. La comparaison des souches en fonction de l'espèce hôte, et l'élaboration d'hypothèses sur la chaîne de transmission intra ou inter-espèce, sont aussi des informations pertinentes en épidémiologie pour les agents pathogènes touchant plusieurs espèces (Lombard *et al.*, 2021).

C. La phylogénie, un outil au service d'une meilleure compréhension des *Bbsl*

a. Histoire de la taxonomie des Bbsl

La classification des espèces de *Bbsl* est en constant remaniement. *B. garinii* a été l'une des premières espèces identifiées au sein des *Bbsl*, par la méthode d'hybridation ADN-ADN (Baranton *et al.*, 1992). Différents sérotypes¹² de *B. garinii* pour la protéine ospA (outer surface

¹¹ Forme générale de l'arbre

¹² Ensemble des caractéristiques antigéniques des bactéries, permettant de différencier des souches appartenant à une même espèce

protein A) ont ensuite été découverts (Wilske *et al.*, 1993). Or, contrairement aux autres sérotypes, *B. garinii* ospA sérotype 4 avait pour réservoir des rongeurs (Huegli *et al.*, 2002). Ultérieurement, des études phylogénétiques ont permis de mettre en évidence deux clades, avec d'un côté *B. garinii*, et de l'autre une autre espèce (*B. garinii* ospA sérotype 4), proche génétiquement de *B. garinii*, mais ayant comme réservoir préférentiel les rongeurs (Margos *et al.*, 2009, 2013). Cette espèce a été nommée *B. bavariensis*. Depuis, plusieurs autres espèces ont été identifiées au sein des *Bbsl*, notamment grâce aux analyses phylogénétiques.

b. Phylogénie et diversité génétique des Bbsl

La diversité génétique des *Bbsl* est de plus en plus étudiée, et plusieurs études tentent de caractériser et d'expliquer cette diversité, en lien avec l'éco-épidémiologie de ces bactéries. Il apparaît globalement que les *Bbsl* génétiquement proches ou identiques ne sont pas forcément situées dans une même aire géographique, même s'il peut exister des différences en fonction de l'espèce ou de l'unité géographique étudiées (pays, continent...).

Cette faible tendance à la ségrégation spatiale des *Bbsl* génétiquement proches peut s'expliquer notamment par le mélange et le déplacement importants de celles-ci, en lien avec la mobilité des vecteurs et des hôtes qu'elles colonisent. Il apparaît aussi qu'il y aurait un lien entre la mobilité d'une espèce de *Bbsl* dans l'espace, sa polyvalence et son degré de diversification génétique : les espèces plus polyvalentes¹³ doivent s'adapter à la diversité des milieux et des hôtes rencontrés, elles présentent donc une diversité génétique importante, quelle que soit l'échelle considérée (Oppler *et al.*, 2021). Les espèces moins polyvalentes tendent à former des sous-populations au sein desquelles la diversité génétique est faible (du fait d'un milieu homogène), mais entre lesquelles la diversité génétique est importante (différences de milieux).

Par exemple, une étude sur des *Bbsl* issues de plusieurs pays d'Europe a montré l'existence d'une structure spatiale chez *B. afzelii*, avec peu de profils alléliques identiques entre les pays. Cette structure spatiale pourrait s'expliquer par le fait que les réservoirs principaux de *B. afzelii* sont les rongeurs, qui présentent une mobilité limitée (Vollmer *et al.*, 2011). Au contraire, *B. garinii*, qui a pour réservoir principal les oiseaux, qui sont des hôtes très mobiles, est l'une des *Bbsl* avec le plus de variabilité génétique (Vollmer *et al.*, 2011 ; Jacquot *et al.*, 2014). Aucune agrégation spatiale n'a pu être mise en évidence pour cette *Bbsl* (Mtierová *et al.*, 2020 ; Norte *et al.*, 2020). Cependant, ces résultats sont à nuancer pour *B. garinii*, d'une part parce que la plupart des études se sont concentrées sur des bactéries issues de tiques portées par des oiseaux migrateurs (plus rarement à l'affût), d'autre part car il semblerait que l'existence d'une certaine structure spatiale soit possible selon l'échelle considérée, notamment lors de la comparaison de bactéries provenant de différents continents (Vollmer *et al.*, 2013 ; Mtierová *et al.*, 2020 ; Norte *et al.*, 2020). De plus, *B. garinii* est aussi impliquée dans un cycle marin : elle est isolée chez *Ixodes uriae*, qui se nourrit sur de nombreuses espèces aviaires marines. Les études s'étant intéressées à la comparaison de la diversité génétique entre les bactéries issues des cycles terrestres et marins ont mis en évidence un possible mélange des souches, associé à une diversité génétique importante (Comstedt *et al.*, 2009 ; Gómez-Díaz *et al.*, 2011). La comparaison des bactéries issues de tiques portées par des oiseaux marins ne met pas en évidence de structures spatiales au sein des régions, mais met en évidence deux sous-populations distinctes entre les bassins de l'océan Pacifique et de l'océan Atlantique (Gómez-Díaz *et al.*, 2011).

¹³ Espèces de *Bbsl* retrouvées chez de nombreuses espèces hôtes et dans différents milieux

L'étude de la diversité génétique des *Bbsl* est importante, car celle-ci peut influencer sur la pathogénicité et sur la diversité des symptômes chez l'homme, qui peuvent varier même au sein d'une espèce (Hanincova *et al.*, 2013 ; Cerar *et al.*, 2016). Par exemple, lors d'une étude sur différentes souches de *B. afzelii* provenant de patients symptomatiques en Europe, certains profils alléliques étaient retrouvés significativement plus fréquemment chez les patients présentant un EM, alors que d'autres étaient significativement plus fréquents chez les patients présentant des formes disséminées de la maladie de Lyme (Gallais *et al.*, 2018).

Etudier la diversité génétique de *B. garinii* est donc nécessaire, car c'est l'une des *Bbsl* pour laquelle on retrouve le plus de diversité, et qu'elle est responsable de graves symptômes chez l'homme. Une étude réalisée en Slovaquie a donné des éléments en faveur de l'existence de différences génétiques entre les bactéries présentes chez les tiques à l'affût et celles présentes chez les oiseaux. Elle soulève aussi l'existence d'une possible variabilité génétique de *B. garinii* en fonction des saisons (Mtierová *et al.*, 2020). Cependant, peu d'études portant sur ce sujet ont été publiées à ce jour et à notre connaissance, aucune étude ne s'est concentrée sur la diversité génétique de *Borrelia garinii* portée par les oiseaux en France.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Ce travail de thèse s'effectue dans la continuité du projet OUTLYER, qui visait à déterminer le rôle des oiseaux en période de reproduction dans la dynamique des populations de tiques, et dans la circulation des agents pathogènes transmissibles par les tiques (notamment les *Bbsl*). Peu d'études se sont intéressées au rôle des oiseaux dans la dynamique de transmission des *Bbsl*, et la plupart de ces études se sont concentrées sur les oiseaux en période de migration (Rataud *et al.*, 2022b). Or, outre leur rôle de potentiel disséminateurs de bactéries via les vols longue distance (Klitgaard *et al.*, 2019 ; Myrsterud *et al.*, 2019a), les oiseaux jouent aussi un rôle dans la dynamique de population locale des tiques : ils participent au nourrissage des tiques et à la circulation des agents pathogènes, notamment lors de leur période et sur leurs lieux de reproduction, où ils restent plusieurs mois (Marsot *et al.*, 2012 ; Rataud, 2022). Une densité importante d'oiseaux réservoirs pour *B. garinii* en un lieu donné participe à l'augmentation du nombre de tiques potentiellement infectées par cette bactérie. Si le nombre de tiques infectées augmente, le risque d'infection chez l'homme augmente aussi. Ce risque est d'autant plus important que l'activité maximale des tiques se superpose à la période de reproduction des oiseaux, au printemps, qui est aussi la période où les activités de plein air des hommes augmentent. Le rôle que peuvent jouer les oiseaux dans le maintien et la transmission de *B. garinii* est notamment fonction de l'espèce d'oiseau considérée et de son milieu de vie (Marsot *et al.*, 2012).

Dans le cadre du projet OUTLYER, la présence d'agents pathogènes chez des larves gorgées collectées sur des oiseaux était recherchée. Afin d'identifier les espèces de *Bbsl* détectées au sein des larves, une PCR était réalisée à l'aide d'amorces ciblant une partie du gène *flaB* de ces *Bbsl*, puis un séquençage des produits de PCR était effectué. Les séquences génétiques obtenues étaient ensuite analysées et l'espèce de *Bbsl* correspondant à chaque séquence déterminée. Dans le cadre de cette thèse, ces séquences ont été récupérées afin d'étudier la diversité génétique des *Bbsl* et en particulier celle de *B. garinii*, qui était la *Bbsl* la plus fréquemment retrouvée chez les oiseaux lors du projet OUTLYER.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier la répartition géographique de *B. garinii* chez des oiseaux en France, puis d'étudier sa diversité génétique grâce à une analyse phylogénétique par la méthode du maximum de parcimonie. Les liens entre diversité génétique et espèce aviaire ou milieu de vie des oiseaux ont été étudiés. Les autres espèces de *Bbsl* détectées dans le cadre du projet OUTLYER ont été incluses dans les analyses, car elles peuvent aussi circuler chez les oiseaux, mais de façon minoritaire par rapport à *B. garinii*.

La partie « Collecte des données » présentée dans le matériels et méthodes (partie I.2.a) correspond au travail préliminaire à notre analyse des séquences génétiques. Ce travail a été réalisé par Amalia RATAUD dans le cadre d'une thèse d'Université intitulée « Eco-épidémiologie du système Oiseaux – Tiques – *Borrelia* » (Rataud, 2022), thèse qui s'inscrivait dans le projet OUTLYER. La Figure 14 ainsi que le travail fourni pour l'obtention du Tableau 2 de cette même partie ont été réalisés dans le cadre de notre thèse. De même, les résultats fournis dans la partie 3.a.a « Description des données de terrain relatives aux oiseaux capturés, aux larves collectées et

aux agents pathogènes détectés » se basent sur notre exploitation et notre analyse de différentes bases de données créées et utilisées par Amalia RATAUD dans le cadre de sa thèse.

2. Matériels et méthodes

A. Collecte des données

Les données utilisées dans cette thèse correspondent à une partie des données collectées lors du projet OUTLYER. Ces données correspondent aux caractéristiques (espèce, sexe, âge, milieu de vie, localisation...) concernant des oiseaux communs capturés en période de reproduction sur différents sites en France aux printemps 2019 et 2020, aux données issues des tiques collectées sur ces oiseaux (nombre, stase, espèce), ainsi qu'aux données issues de la recherche d'agents pathogènes dans les larves gorgées échantillonnées (genre, espèce, ainsi que les séquences génétiques pour les *BbsI*).

Les données initiales concernant le milieu de vie des oiseaux, qui étaient nommées selon la nomenclature standard CLC (Corine Land Cover), ont été regroupées. Certaines catégories d'habitat ont été fusionnées afin de faciliter la visualisation graphique. Ce regroupement a été effectué en fonction des similitudes entre les différents habitats (Tableau 2).

Tableau 2 : Catégories utilisées pour l'habitat des oiseaux capturés, et lien avec les catégories officielles CLC

Type de milieu présenté	Code et Type de milieu initial	Définition CLC
Agricole (prairie/culture)	231 - Praires	Surfaces enherbées denses de composition floristique constituée principalement de graminées, non incluses dans un assolement. Principalement pâturées, mais dont le fourrage peut être récolté mécaniquement. Y compris des zones avec haies (bocages).
	242 - Systèmes culturaux et parcellaires complexes	Mosaïque de petites parcelles de cultures annuelles diversifiées, de prairies et/ou de cultures permanentes complexes, avec éventuellement des maisons et jardins épars.
	243 - Surfaces essentiellement agricoles, interrompues par des espaces naturels importants	Surfaces essentiellement agricoles, interrompues par des zones naturelles ou semi-naturelles (y compris des zones humides, des plans d'eau ou des affleurements rocheux).
Forêt	311 - Forêts de feuillus	Formations végétales principalement constituées par des arbres, mais aussi par des buissons et arbustes en sous-étage, où dominent les espèces forestières feuillues.
	312 - Forêts de conifères	Formations végétales principalement constituées par des arbres, mais aussi par des buissons et arbustes en sous-étage, où dominent les espèces forestières de conifères.
	313 - Forêts mélangées	Formations végétales principalement constituées par des arbres, mais aussi par des buissons et arbustes en sous-étage, où ni les feuillus ni les conifères ne dominent.
Clairsemé	24 - Forêt et végétation arbustive en mutation	Végétation arbustive et herbacée avec arbres épars. Formations pouvant résulter de la dégradation de la forêt ou d'une recolonisation/régénération de la forêt.
Humide	411 - Marais intérieurs	Terres basses généralement inondées en hiver et plus ou moins saturées d'eau en toutes saisons.
	412 - Tourbières	Terrains spongieux humides dont le sol est constitué principalement de mousses et de matières végétales décomposées (principalement des sphaignes). Tourbières exploitées ou non.
Périurbain	112 - Tissu urbain discontinu	Espaces structurés par des bâtiments. Les bâtiments, la voirie et les surfaces artificiellement recouvertes coexistent avec des surfaces végétalisées et du sol nu, qui occupent de manière discontinue des surfaces non négligeables. Entre 30 et 80 % de la surface est imperméable.
Landes et broussailles	322 - Landes et broussailles	Formations végétales basses et fermées, composées principalement de buissons, d'arbustes et de plantes herbacées (bruyères, ronces, genêts, ajoncs, cytises, etc.).

a. Description du programme STOC-Capture

La majorité (95 %) des oiseaux échantillonnés proviennent du Suivi Temporel des Oiseaux Communs nicheurs par Capture (STOC-Capture) en France. Les 5 % restants ont été capturés par des bagueurs mettant en place des protocoles spécialisés ciblant des taxons aviaires plus rares, afin de couvrir la plus grande diversité d'espèces aviaires possible. Le programme STOC-Capture est mis en place par le Centre de Recherches sur la Biologie des Populations d'Oiseaux (CRBPO) au sein du Muséum National d'Histoire Naturelle. Initié en 1989, il est basé sur la méthode de capture-marquage-recapture des oiseaux présents dans les strates buissonnantes de la végétation. Il réalise ainsi le suivi des communautés aviaires sur un grand nombre de sites au

cours du temps (environ 250 sites en France), en maintenant un effort d'échantillonnage par site constant d'une année sur l'autre, grâce à des bagueurs bénévoles. Ce programme a pour objectif de documenter à l'échelle nationale et sur le long terme l'évolution démographique des populations d'oiseaux.

La capture des oiseaux nicheurs se fait au printemps, avec un minimum de trois sessions par an entre mai et début juillet, à l'aide de filets japonais. Cette technique permet de capturer les oiseaux au sol ou volant à moins de trois mètres du sol. La méthode de capture est standardisée pour chaque station STOC (moyens matériels et humains, emplacement des filets, durée et dates de sessions). Une station STOC est une zone de capture des oiseaux préalablement définie afin de garantir un habitat homogène, et présumé stable dans le temps.

Afin de cibler le moment de la journée où les oiseaux sont les plus actifs, une session se déroule généralement de l'aube à midi. La manipulation des oiseaux se fait sur place, elle est réduite au minimum et la plus rapide possible afin de limiter leur dérangement, et les oiseaux sont ensuite relâchés. Les oiseaux capturés sont marqués ou contrôlés via une bague avec un numéro unique. L'espèce, le sexe, l'âge des oiseaux ainsi que des mesures biométriques (masse, longueur d'aile et longueur du tarse) sont relevés.

b. Collecte des tiques

En plus des informations collectées sur les oiseaux, un programme de collecte de tiques au sein du réseau de bagueurs a été mis en place en 2019 et 2020. Pour cela, un kit a été fourni aux bagueurs afin de leur permettre de collecter les tiques présentes sur les oiseaux capturés. Le protocole de collecte consistait au prélèvement sur tout le corps de l'oiseau d'un maximum de 10 tiques par individu à l'aide de pinces fines. Pour les conserver, les tiques ont été placées dans des tubes Eppendorf contenant de l'éthanol à 70 % ; les tiques d'un oiseau donné étant stockées dans le même tube. Ces échantillons ont ensuite été envoyés au laboratoire de santé animale de l'Anses¹⁴ pour analyse.

c. Identification morphologique des tiques

Une identification morphologique des tiques pour déterminer la stase et l'espèce a ensuite été réalisée par Amalia RATAUD, sous loupe binoculaire, à l'aide des clefs taxonomiques d'Estrada-Peña et de Pérez-Eid (Pérez-Eid, 2007 ; Estrada-Peña *et al.*, 2017). Suite à cette identification, les larves gorgées ont été sélectionnées afin de vérifier si elles étaient ou non porteuses d'agents pathogènes, et d'identifier ceux-ci le cas échéant. Sélectionner uniquement les larves gorgées pour la détection d'agents pathogènes permet d'obtenir un indicateur indirect du statut infectieux de l'oiseau. En effet, si les transmissions non-systémiques (co-repas et transovarienne) sont négligeables ou peu fréquentes, comme fortement suspecté pour *Bbsl* (Richter *et al.*, 2012), une larve s'infecte *via* un hôte réservoir infecté. Ainsi, la détection d'une larve gorgée infectée par *Bbsl* sur un oiseau signifie que l'oiseau hôte de cette larve était infecté par *Bbsl*.

¹⁴ Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

d. Détection des agents pathogènes au sein des larves gorgées

- *Extraction et pré-amplification de l'ADN des larves gorgées*

L'ADN des larves gorgées a été extrait grâce au kit « NucleoSpin Tissue Genomic DNA from tissue » (Machery Nagel, Düren, Allemagne). Cela s'est fait en plusieurs étapes, notamment nettoyage, broyage et centrifugation des tiques, lyse des cellules puis fixation de l'ADN. Celui-ci a ensuite été conservé à -20 °C.

Afin d'obtenir une meilleure détection de l'ADN des agents pathogènes présents dans les larves gorgées, l'ADN des agents pathogènes a été pré-amplifié avec le kit « PreAmp Master Mix » (Fluidigm, San Francisco, CA, USA). Ce kit permet d'augmenter le signal du matériel génétique des agents pathogènes par rapport au matériel génétique de la tique. Cette pré-amplification a nécessité l'utilisation d'amorces. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C.

- *Détection des agents pathogènes présents dans les larves gorgées*

Afin d'identifier les agents pathogènes présents dans les larves gorgées collectées sur les oiseaux, la technique de PCR microfluidique en temps réel (Biomark™ dynamic array, Fluidigm) a été utilisée, sur l'ADN préalablement extrait et pré amplifié. La PCR microfluidique en temps réel est utilisée comme un outil de criblage à haut débit des agents pathogènes chez les tiques. Elle permet de détecter 28 espèces appartenant à huit genres de bactéries (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Francisella*, *Coxiella*), ainsi que huit espèces appartenant à trois genres de parasites (*Babesia*, *Theileria*, *Hepatozoon*). Elle permet aussi d'identifier *I. ricinus* et *Dermacentor reticulatus* (Annexe 1).

Tous les échantillons positifs à *Bbsl* via la puce microfluidique ont été confirmés pour les espèces d'agents pathogènes et les espèces de tiques. Pour cela, une PCR de l'ADN des échantillons (Figure 14) a été réalisée avec le kit « PCR phusion ». Les amorces utilisées sont présentées dans l'Annexe 2. Pour la confirmation des espèces de *Bbsl*, les amorces ciblaient une partie du gène *flaB* de celles-ci.

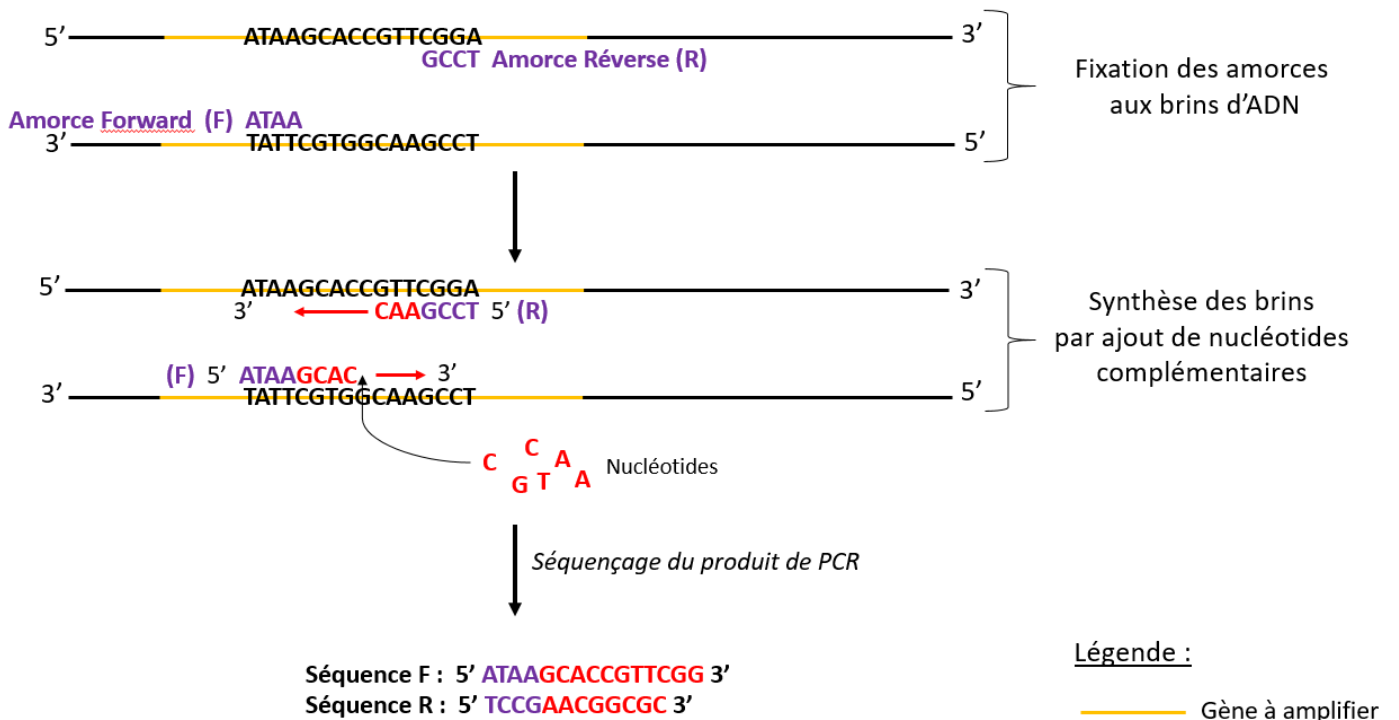
Les produits de PCR ont ensuite été mis à migrer sur gel d'agarose puis révélés avec rayons UV. En l'absence de bande fluorescente sur le gel, les échantillons étaient considérés négatifs (absence d'amplification de l'ADN des *Bbsl*). Ils étaient considérés comme positifs dans le cas contraire.

- *Séquençage des Bbsl et des autres agents pathogènes : identification des espèces*

L'ensemble des produits de PCR positifs à *Bbsl* sur le gel ont été envoyés au séquençage à la plateforme Eurofins Genomics. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel BioEdit puis analysées afin d'identifier les espèces de *Bbsl* ainsi que d'autres agents pathogènes détectés dans les larves gorgées. Cette identification a été réalisée par comparaison avec les séquences des agents pathogènes détectés disponibles dans base de données GenBank par le biais du moteur de recherche BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI ; Bethesda, MD).

Figure 14 : Schéma de l'obtention des séquences génétiques des *Bbsl* (PCR et séquençage)

Les amorces ciblent une partie du gène *flaB* des *Bbsl*, les nucléotides en violet sont les nucléotides qui constituent les amorces. Les nucléotides en noir sont les nucléotides du gène à amplifier. Les nucléotides en rouge sont les nucléotides présents dans le milieu, qui sont ajoutés aux amorces lors de la synthèse des brins. Les flèches rouges représentent le sens de synthèse des brins (de 5' vers 3').



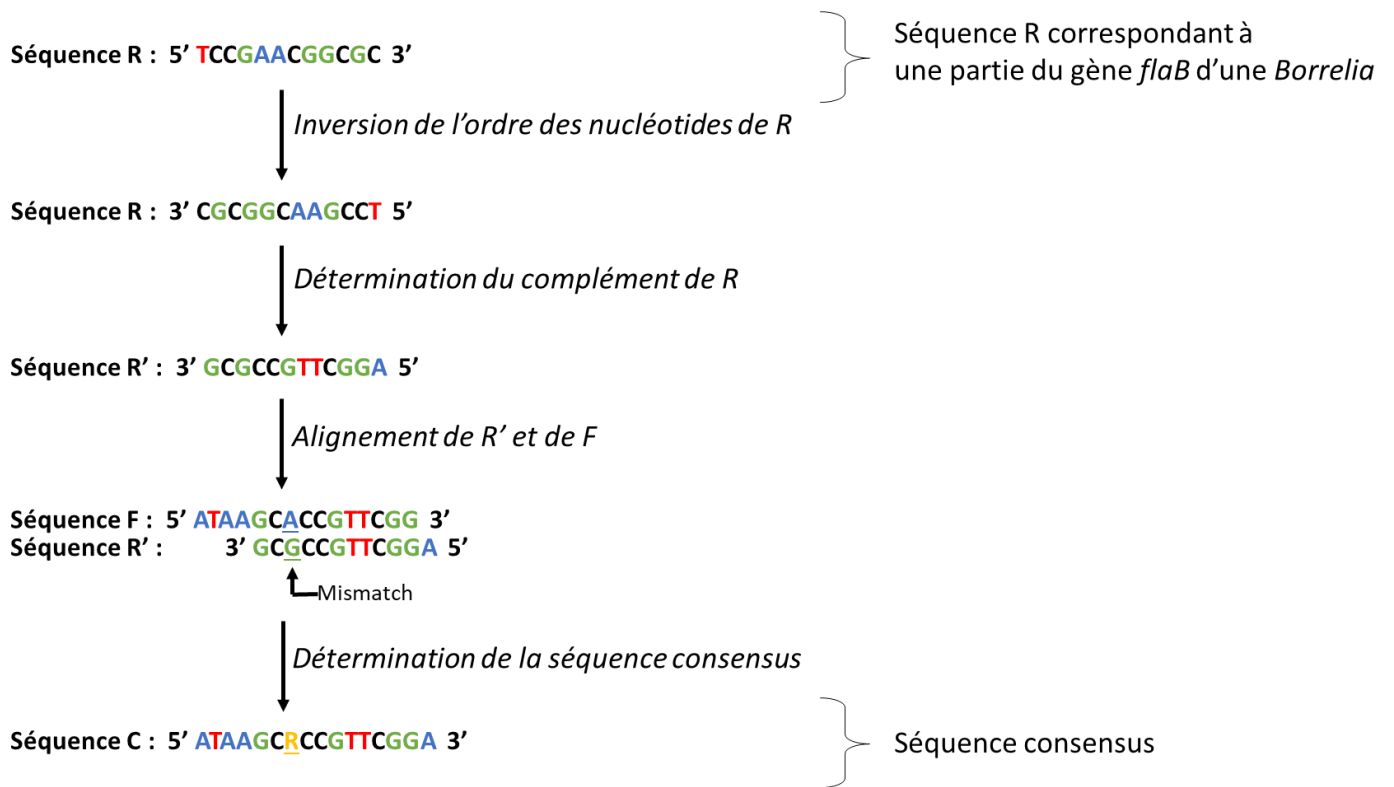
B. Nettoyage des données et obtention des séquences consensus pour les analyses phylogénétiques

Dans l'optique de réaliser un arbre phylogénétique à partir des séquences de *Bbsl* identifiées dans les larves gorgées collectées sur les oiseaux communs lors du projet OUTLYER, nous avons utilisé les séquences génétiques d'une partie du gène *flaB* des *Bbsl*, obtenues suite à la PCR et au séquençage de l'ADN prélevé chez les larves gorgées positives à *Bbsl*. Cent-vingt-et-une *Bbsl* et leurs séquences associées étaient initialement disponibles.

Du fait de l'utilisation d'amorces Forward (F) et Reverse (R) lors du séquençage, deux séquences (une F et une R) étaient obtenues pour chaque larve gorgée positive à *Bbsl*. À partir de ces deux séquences F et R obtenues, une séquence consensus a été déterminée, qui réunit l'information contenue dans les deux séquences (Figure 15). Au final, une séquence consensus était obtenue par larve gorgée positive à *Bbsl*.

Figure 15 : Schéma d'obtention d'une séquence consensus à partir des séquences Forward (F) et Reverse (R) d'une *BbsI*

La lettre R en jaune correspond à un nucléotide ambigu (peut être A ou G).



En cas de divergence entre deux nucléotides lors de l'alignement (possiblement dû à une erreur lors de la synthèse des brins ou lors du séquençage), le nucléotide de la séquence consensus peut être remplacé par un nucléotide ambigu (R, Y, K...), afin de garder le plus d'information possible sur ce site. Par exemple, un R signifie que le nucléotide de la séquence consensus est soit un A, soit un G. Un N signifie que le nucléotide peut être A, T, G, ou C (nucléotide non informatif).

La qualité des séquences consensus obtenues a ensuite été évaluée. Les séquences contenant moins de 300 nucléotides ont été exclues pour la suite des analyses. En effet, d'après la distribution du nombre de séquences en fonction du nombre de nucléotides, la majorité des séquences (102/121) contenaient plus de 300 nucléotides. De plus, une séquence trop courte est considérée de mauvaise qualité (amorces ne s'étant pas fixées au bon endroit, problème lors du séquençage...) et peut entraîner des erreurs lors de l'alignement de l'ensemble des séquences.

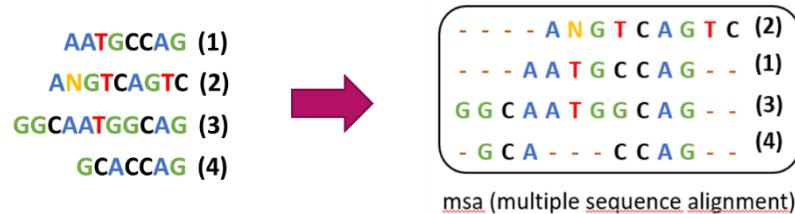
Ensuite, un alignement de l'ensemble des séquences a été réalisé, afin de rendre les séquences de chaque *BbsI* comparables. Les séquences ne commençant et ne se terminant pas toutes au même endroit par rapport au gène séquencé (différences de longueur), l'alignement permet de s'assurer, lors de la comparaison d'un nucléotide se trouvant à la position x des séquences, que ce nucléotide correspond bien à celui situé à la position x du gène séquencé, et ce pour l'ensemble des séquences.

Pour faire cela, l'algorithme Muscle a été utilisé (Annexe 3, Annexe 4). Cet algorithme compare les séquences deux à deux, et crée une matrice des distances génétiques à partir de

laquelle il aligne les séquences de proche en proche. À la fin, les séquences sont toutes alignées, et forment un alignement multiple (msa : multiple sequence alignment) (Figure 16).

Figure 16 : Séquences non alignées (gauche) et alignement multiple des séquences (droite)

(1), (2), (3) et (4) sont les noms des 4 taxa (séquences génétiques) étudiés. La lettre N en jaune représente un nucléotide non informatif (peut être A, T, G ou C). Les tirets en marron représentent des lacunes dans l'alignement, ces lacunes correspondent soit à des insertions/délétions dans la séquence concernée, soit à des introductions artificielles (en début et/ou fin de séquence), afin que les séquences aient toutes la même longueur pour permettre la comparaison.



Une fois l'alignement réalisé, une inspection visuelle de celui-ci a été effectuée pour juger de sa qualité, conduisant à l'élimination de six séquences consensus des analyses. Ces séquences étaient trop différentes des autres, et ne s'alignaient pas correctement avec le reste des séquences, ce qui diminuait la qualité de l'alignement multiple.

Un nouvel alignement multiple a été effectué sur les 96 séquences restantes, et a été conservé pour la suite des analyses. Le début et la fin des séquences de l'alignement multiple comportant beaucoup de lacunes, un élagage a été réalisé (conservation d'une partie des séquences). En effet, un nombre trop important de lacunes peut modifier la topologie des arbres générés.

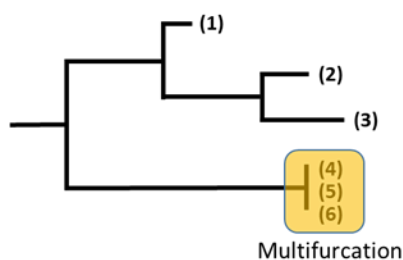
C. Analyses phylogénétiques

À partir des séquences alignées, une nouvelle matrice des distances génétiques des séquences a été construite. Un modèle de substitution a été choisi afin de corriger le calcul de la distance génétique entre les paires de séquences (voir paragraphe I.2.b.b). Le modèle choisi (F84) est un modèle général, proche du modèle GTR. Le modèle GTR a souvent été utilisé lors de la construction d'arbres phylogénétiques à partir de séquences de *B. garinii*. Dans ces deux modèles, les fréquences des quatre nucléotides A, T, G et C sont différentes. Le modèle F84 utilise des taux de substitutions différents pour les transitions (A ↔ G ou C ↔ T) et les transversions (toutes les autres substitutions : A ↔ C, A ↔ T, etc), alors que le modèle GTR utilise des taux différents pour chaque type de substitutions (Xia, 2018).

Ensuite, un arbre phylogénétique a été construit grâce à la méthode du maximum de parcimonie (voir paragraphe I.2.b.b). L'algorithme de Fitch a été utilisé pour attribuer un score de parcimonie aux arbres générés. La longueur des branches, qui représente la distance génétique entre deux nœuds ou séquences, a été calculée grâce à un algorithme (acctran). Lorsque plusieurs arbres ont le même score de parcimonie, un arbre consensus est produit, qui va présenter des multifurcations, c'est-à-dire des nœuds internes ayant plus de deux descendants (Figure 17). Les séquences génétiques d'une multifurcation sont toutes à égale distance les unes des autres.

Figure 17 : Exemple d'arbre phylogénétique présentant une multifurcation, avec longueur de branche représentant la distance génétique entre deux nœuds

(1) à (6) sont les taxa étudiés.



Une fois l'arbre consensus généré, les données épidémiologiques d'intérêt ont été associées à cet arbre : pour chaque taxon de l'arbre (c'est-à-dire de chaque séquence génétique d'une *BbsI* collectée sur une larve gorgée provenant d'un oiseau) l'espèce de bactérie associée à la séquence, l'espèce d'oiseau dont elle provient, ainsi que le milieu de vie de l'oiseau ont été ajoutés. Les larves d'un même oiseau ont aussi été mises en évidence pour les oiseaux portant plus de deux larves positives à *BbsI*.

À partir de l'arbre consensus obtenu, des clades¹⁵ ont été visuellement identifiés. Les *BbsI* issues de ces clades ont ensuite été localisées sur la carte de la France, afin de déterminer si les séquences génétiquement proches étaient aussi proches d'un point de vue spatial.

3. Résultats

A. Description des données

a. Description des données de terrain relatives aux oiseaux capturés, aux larves collectées et aux agents pathogènes détectés

Au total, 1 040 oiseaux ont été échantillonnés au printemps en 2019 et 2020, appartenant à 56 espèces, dans 110 sites en France. Trois-mille-cent-quatorze tiques ont été prélevées chez ces oiseaux, parmi lesquelles 61 adultes (60 femelles, 1 mâle), 1 715 nymphes, 1 285 larves (dont 1 106 larves gorgées) et 53 tiques dont la stase n'a pu être identifiée.

Les 1 106 larves gorgées ont été prélevées sur 442 oiseaux appartenant à 36 espèces, dans 69 sites en France. Au total, quatre espèces de tiques appartenant à deux genres ont été identifiées (Tableau 3). Certaines larves n'ont pas pu être identifiées pour l'espèce ou le genre, car elles étaient trop abimées.

¹⁵ Regroupement de bactéries génétiquement proches

Tableau 3 : Nombre de larves collectées en fonction de leur espèce (ensemble des larves, puis larves positives à *Bbsl*, puis larves positives à *B. garinii*)

Nombre de larves gorgées	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Haemaphysalis punctata</i>	<i>Haemaphysalis concinna</i>	<i>Haemaphysalis Spp *</i>	<i>Ixodes frontalis</i>	<i>Ixodes spp *</i>	Non identifiée**	Total
Collectées	1 039	15	11	3	2	2	34	1 106
Positives à <i>Bbsl</i>	124	0	0	1	2	1	1	129
Positives à <i>B. garinii</i>	96	0	0	1	1	1	1	100

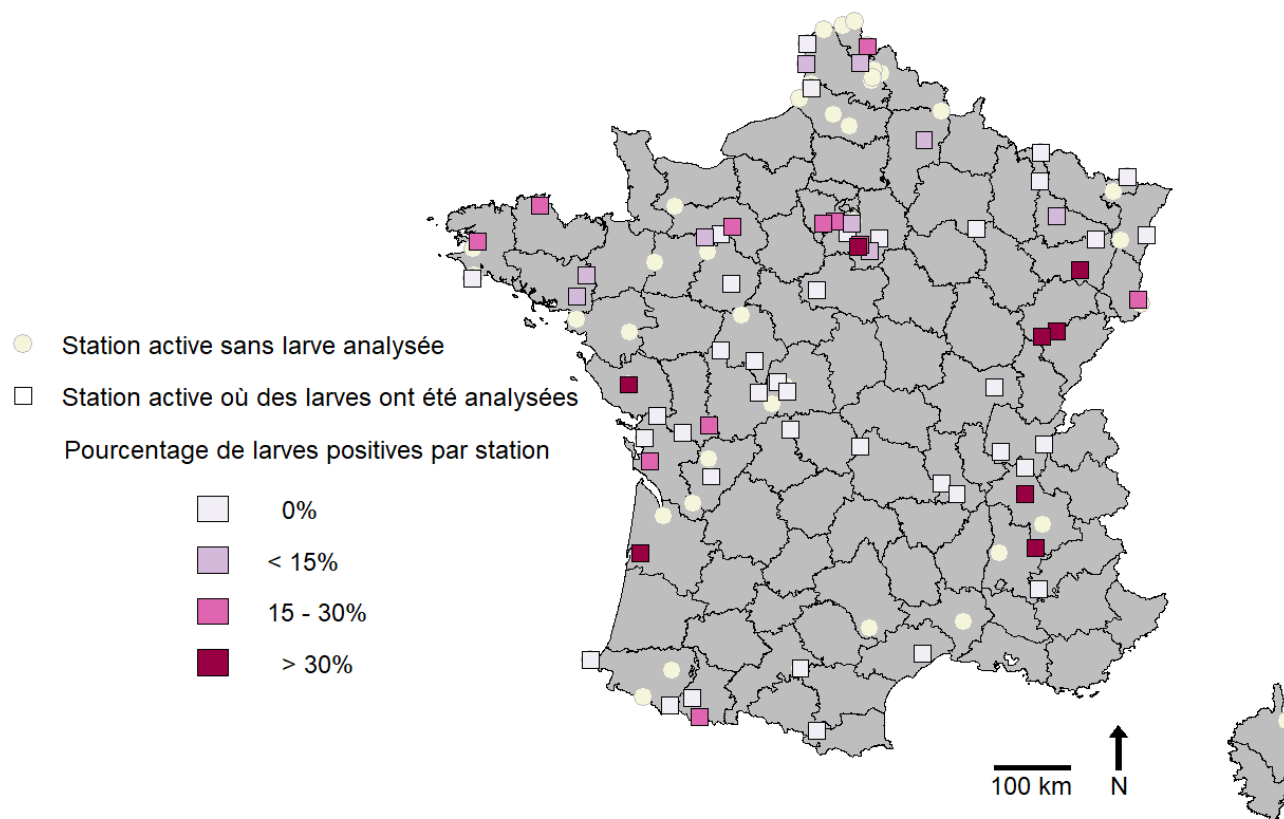
* Tiques pour lesquelles l'identification de l'espèce a échoué

** Tiques non identifiées car trop abimées

Parmi les 1 106 larves analysées, 11,7 % (n = 129) étaient positives pour le groupe des *Bbsl*, 5,7 % (n = 63) pour le genre *Anaplasma*, 2,3 % (n = 25) pour le genre *Babesia*, 1,4 % (n = 15) pour le genre *Ehrlichia*, et 1 % (n = 11) pour l'espèce *Borrelia miyamotoi* (espèce de *Borrelia* n'appartenant pas au complexe des *Bbsl*). Les larves positives à *Bbsl* (n = 129) provenaient d'oiseaux capturés dans 28 stations STOC-Capture en France (Figure 18). Dans notre échantillon, 78 % des *Bbsl* appartenaient à l'espèce *B. garinii* (n = 100). Les larves positives à *B. garinii* ont été collectées sur des oiseaux capturés dans 25 stations (Annexe 5).

Figure 18 : Carte présentant les pourcentages de larves positives à *Bbsl* en fonction des stations en France

Les stations représentées sont les stations au sein desquelles des oiseaux ont été capturés en 2019-2020.



Parmi les 442 oiseaux sur lesquels des larves gorgées ont été collectées puis analysées pour *Bbsl*, 16 % hébergeaient au moins une larve positive à *Bbsl* (n = 70), et 12 % hébergeaient au moins une larve positive à *B. garinii* (n = 54). Parmi les 70 oiseaux porteurs de larves positives à *Bbsl*, 66 % (n = 46) portaient plus d'une larve (Figure 20).

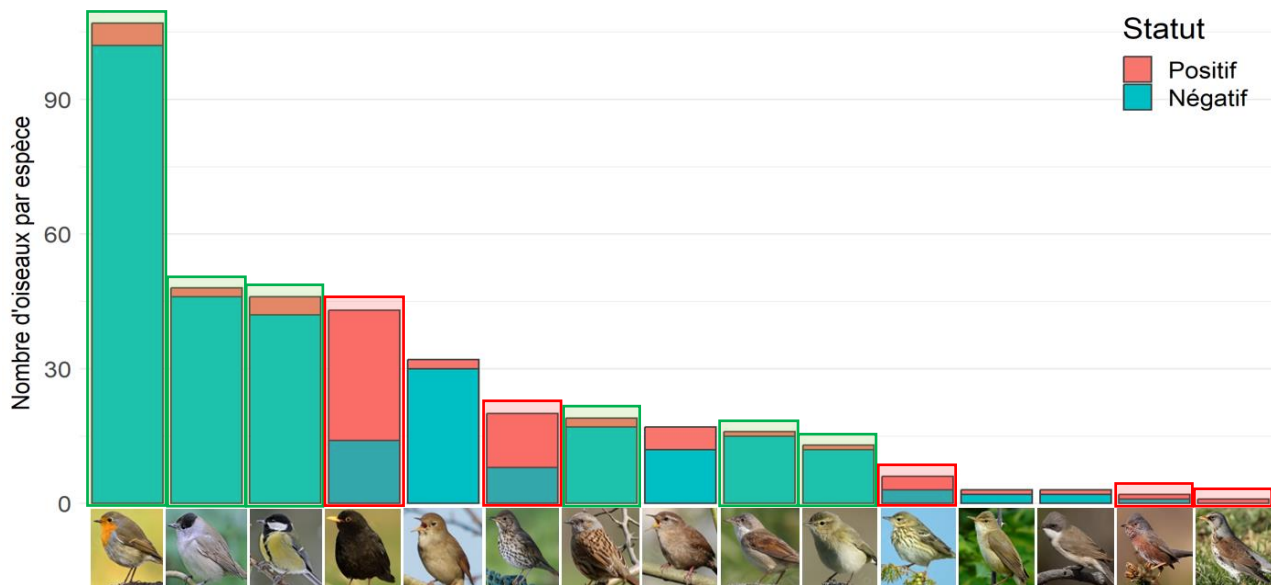
Les oiseaux porteurs de larves positives à *Bbsl* appartenait à 15 espèces d'oiseaux (sur les 36 espèces capturées). Les oiseaux porteurs de larves positives à *B. garinii* appartenait à 13 espèces d'oiseaux (Annexe 6). Le pourcentage d'oiseaux positifs¹⁶ à *Bbsl* était inférieur à 10 % pour six espèces d'oiseaux (Figure 19). La Fauvette à tête noire (*Sylvia atricapilla*) était l'espèce d'oiseau avec le pourcentage d'individus positifs à *Bbsl* le plus faible (4,2 % sur les 48 individus porteurs de larves gorgées échantillonnés), suivi du Rougegorge familier (4,7 % sur les 107 individus porteurs de larves gorgées). Pour la Mésange charbonnière ce pourcentage était de 9 %, pour 46 individus porteurs de larves gorgées échantillonnés. Pour le Merle noir et la Grive musicienne, les pourcentages d'individus positifs à *Bbsl* étaient respectivement de 67 % et de 60 %, pour 43 et 20 individus porteurs de larves gorgées échantillonnés appartenant à ces deux espèces. Pour certaines espèces comme le Pipit des arbres (*Anthus trivialis*) ou la Fauvette pitchou (*Curruca undata*), ce pourcentage était aussi supérieur ou égal à 50 %, mais le nombre d'individus porteurs de larves échantillonnés pour ces espèces était faible (n ≤ 6).

¹⁶ Un oiseau est positif à *B. garinii* ou à *Bbsl* s'il porte au moins une larve gorgée positive à *B. garinii* ou à *Bbsl*

Figure 19 : Espèces d'oiseaux positives à *Bbsl*, et nombre d'individus porteurs de larves négatives et porteurs d'au moins une larve positive à *Bbsl* par espèce d'oiseau

Les photographies en bas du graphique correspondent aux espèces d'oiseaux concernées, qui sont, de gauche à droite : Rougegorge familier (*Erithacus rubecula*), Fauvette à tête noire (*Sylvia atricapilla*), Mésange charbonnière (*Parus major*), Merle noir (*Turdus merula*), Rossignol philomèle (*Luscinia megarhynchos*), Grive musicienne (*Turdus philomelos*), Accenteur mouchet (*Prunella modularis*), Troglodyte mignon (*Troglodytes troglodytes*), Fauvette grisette (*Curruca communis*), Pouillot véloce (*Phylloscopus collybita*), Pipit des arbres (*Anthus trivialis*), Rousserolle verderolle (*Acrocephalus palustris*), Fauvette babillarde (*Curruca curruca*), Fauvette pitchou (*Curruca undata*), Grive litorne (*Turdus pilaris*). Les barres encadrées en vert correspondent aux espèces avec un pourcentage d'individus positifs à *Bbsl* inférieur ou égal à 10 %, tandis que les barres encadrées en rouge correspondent aux espèces avec un pourcentage d'individus positifs à *Bbsl* supérieur ou égal à 50 %.

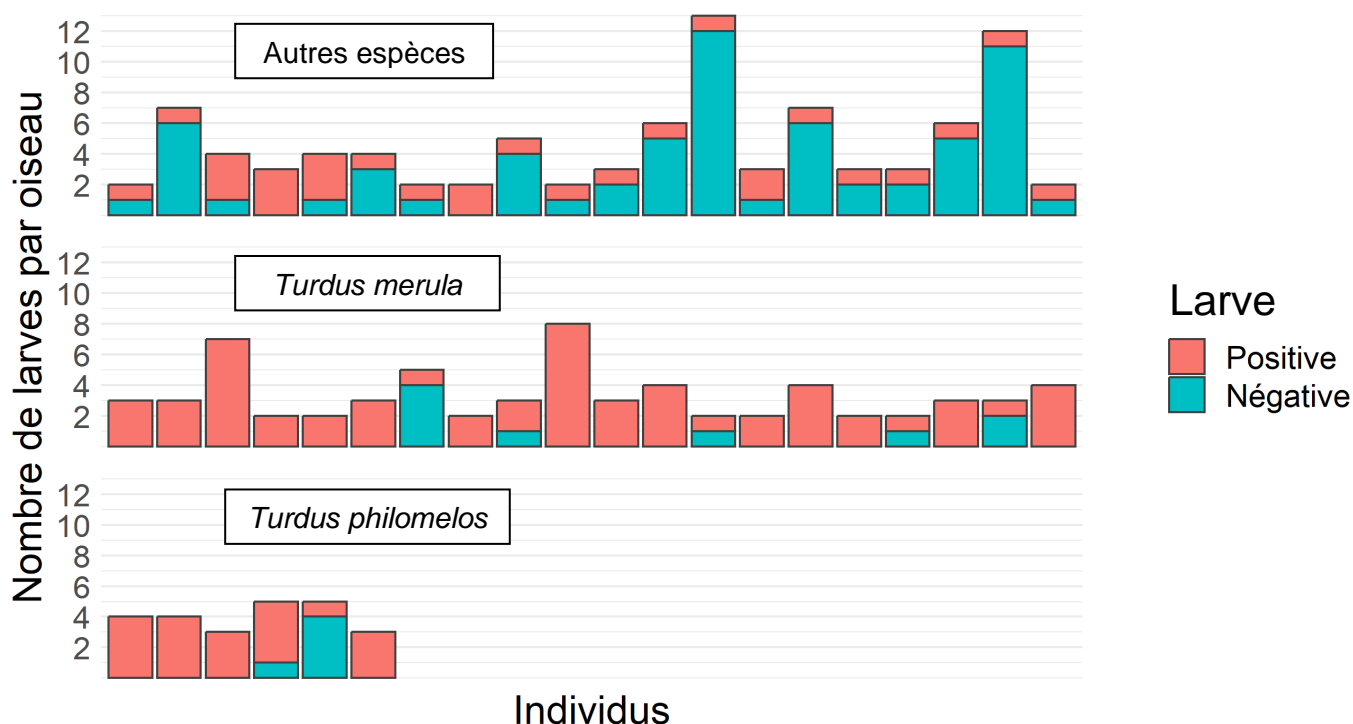
Les photographies sont toutes issues du site internet *oiseaux.net*.



Pour la plupart des espèces étudiées, le pourcentage de larves positives à *Bbsl* par oiseau tend à diminuer avec le nombre de larves collectées sur l'oiseau (Figure 20). Environ la moitié de ces oiseaux (55 %) ont un pourcentage de larves positives inférieur ou égal à 50 %. Pour le Merle noir et la Grive musicienne, le pourcentage de larves positives par individu est très élevé, et ce quel que soit le nombre de larves collectées sur l'oiseau : chez le Merle noir, 75 % (15/20) des individus positifs à *Bbsl* pour lesquels plusieurs larves ont été analysées portent 100 % de larves positives à *Bbsl*, contre 66 % (4/6) pour la Grive musicienne. Des résultats similaires sont obtenus pour les larves positives à *B. garinii* (Annexe 7).

Figure 20 : Nombre de larves positives et négatives à *Bbsl* par oiseau en fonction de l'espèce

Les oiseaux représentés ici sont les oiseaux pour lesquels au moins deux larves ont été analysées, et dont au moins une des larves était positive à *Bbsl* ($n = 46$). Chaque barre représente un individu. La catégorie « Autres espèces », inclut les individus issus des espèces présentées dans la figure précédente (Figure 19), à l'exception du Merle noir (*Turdus merula*) et de la Grive musicienne (*Turdus philomelos*).



b. Description et caractéristiques des séquences génétiques

Lors du nettoyage et de la sélection des séquences utilisées pour les analyses phylogénétiques, certaines larves gorgées n'avaient qu'une seule séquence de *Bbsl* exploitable (F ou R). Lorsqu'une seule séquence était disponible, celle-ci a été incluse telle quelle dans les analyses, après inversion de l'ordre des nucléotides pour les séquences R (ces séquences sont aussi considérées comme des séquences consensus par la suite).

Cent-vingt-et-une séquences de *Bbsl* étaient initialement disponibles, 102 séquences génétiques ont été conservées après le nettoyage, et 96 séquences ont été conservées après le premier alignement multiple et incluses dans les analyses.

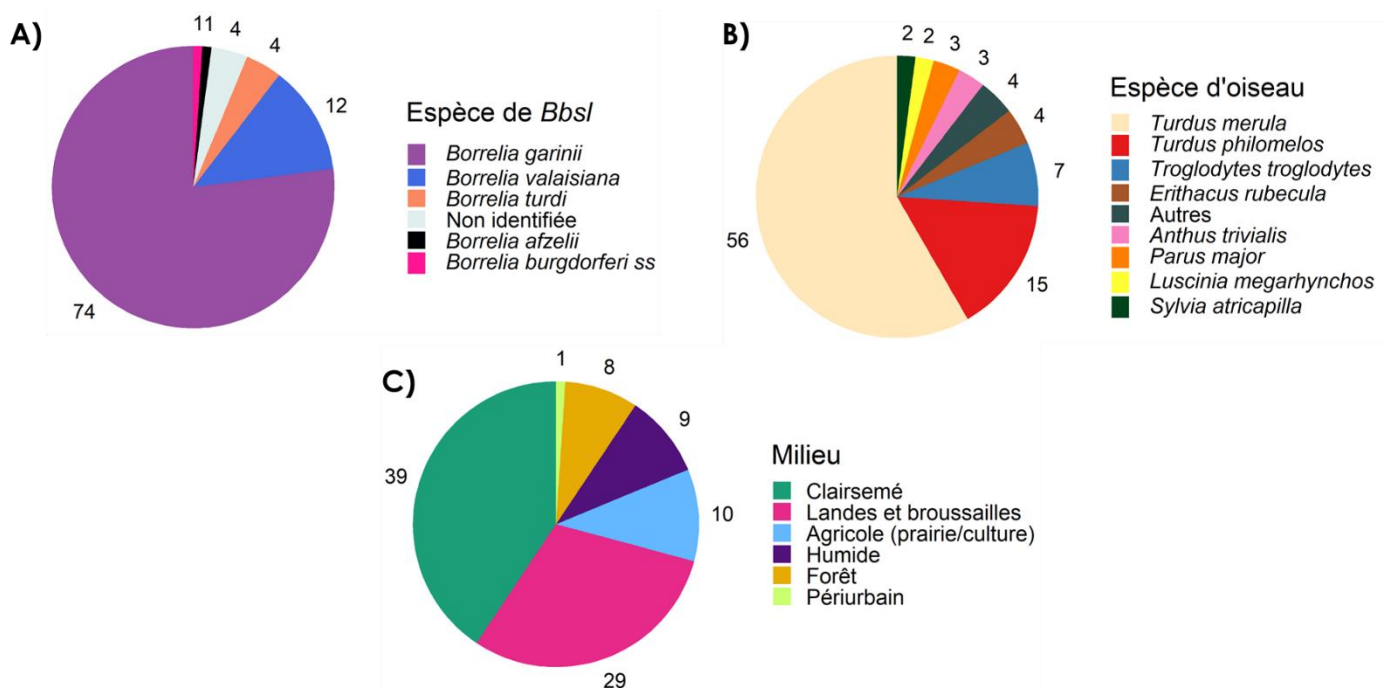
La longueur des séquences issues du 1^{er} alignement multiple était de 702 nucléotides. Seule la partie des séquences comprise entre le 67^{ème} et le 469^{ème} nucléotide a été gardée. L'alignement multiple final était donc constitué de séquences de 403 nucléotides.

Les 96 séquences génétiques de *Bbsl* sont issues de larves gorgées collectées sur 54 oiseaux. Vingt-quatre de ces oiseaux étaient porteurs de plus d'une larve positive à *Bbsl*. Ces oiseaux appartenaient à 12 espèces regroupant huit genres (*Turdus*, *Troglodytes*, *Erithacus*, *Anthus*, *Parus*, *Luscinia*, *Sylvia*, *Phylloscopus*). Ces genres sont tous issus de l'ordre des Passériformes (passereaux). Les oiseaux ont été capturés dans les six milieux définis (clairsemé, landes et broussailles, agricole, humide, forêt, périurbain).

La majorité des séquences génétiques étudiées sont des séquences correspondant aux espèces *B. garinii* (74/96) et *B. valaisiana* (12/96) (Figure 21). Les larves gorgées infectées (et les séquences génétiques des *Bbsl* associées) proviennent majoritairement de Merles noirs (56/96), et de Grives musiciennes (15/96), et sont majoritairement issues de milieux clairsemés (39/96) ou de milieux type « landes et broussailles » (29/96) (Figure 21).

Figure 21 : Espèces de *Bbsl* correspondant aux 96 séquences génétiques (A), espèces d'oiseaux dont sont issues les 96 larves gorgées positives à *Bbsl* (B), milieux dont sont issues les 96 larves gorgées collectées sur les 54 oiseaux capturés (C)

B) La catégorie « Autres » comprend quatre espèces pour lesquelles une seule larve gorgée positive à *Bbsl* a été trouvée : *Sylvia communis*, *Phylloscopus collybita*, *Sylvia curruca* et *Sylvia undata*.



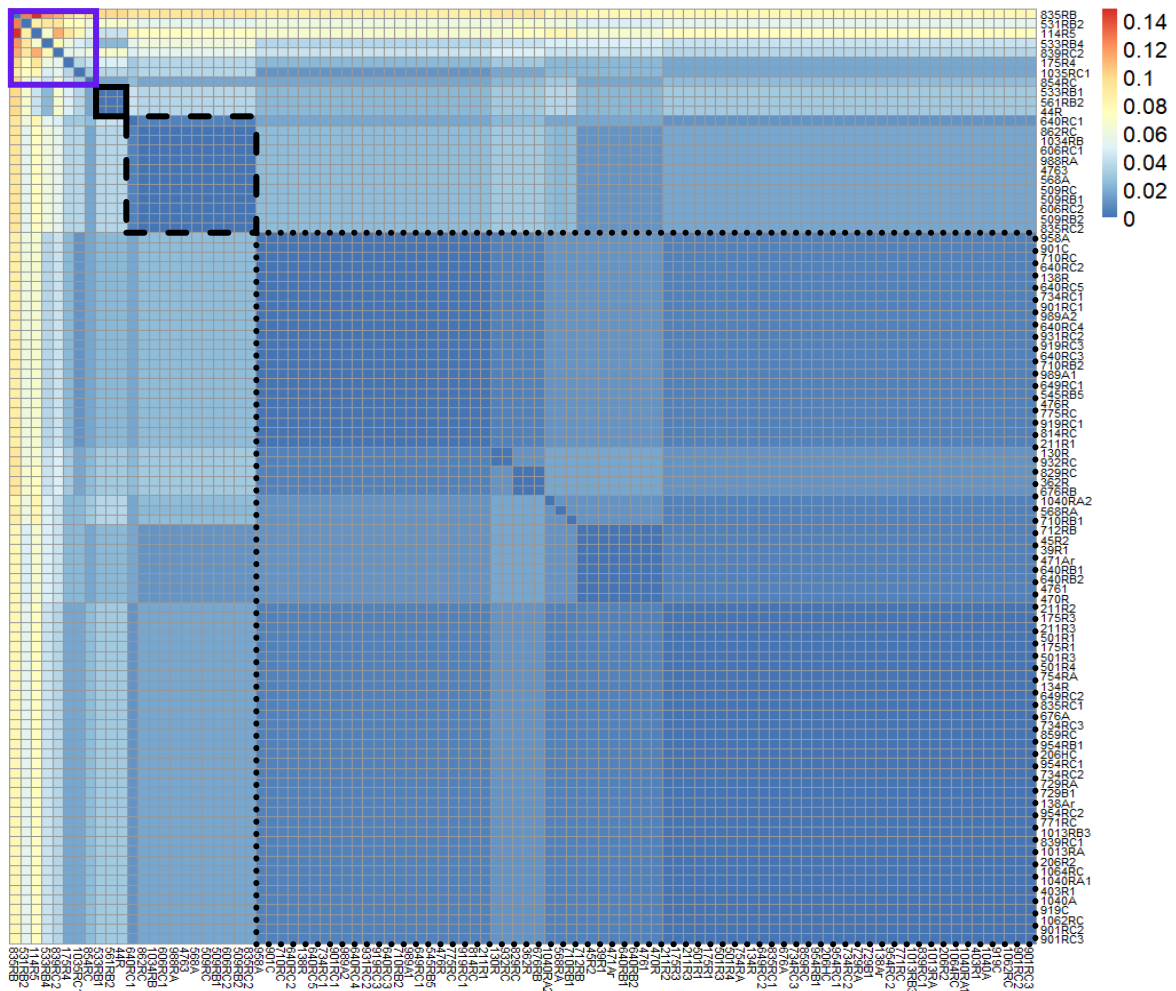
B. Analyses des données : diversité génétique des séquences et phylogénie

Les séquences génétiques étudiées, qui correspondent à une partie du gène *flaB* des *Bbsl*, sont proches les unes des autres. En effet, la distance génétique maximale entre deux séquences est de 14 % (Figure 22). Quarante-trois pourcent des paires de séquences étudiées ont une distance génétique inférieure à 5 %, et 21 % ont une distance génétique nulle. La distance génétique moyenne entre deux *Bbsl* est de 1,6 %. Plusieurs groupes se distinguent par la proximité de leurs séquences génétiques intragroupe, et par leur distance génétique plus élevée avec les séquences hors du groupe : ces groupes correspondent aux différentes espèces de *Bbsl* dont sont issues les séquences. Pour *B. garinii*, la distance génétique moyenne entre deux souches est de 1,3 %, et on observe plusieurs sous-groupes de bactéries au sein desquelles la distance génétique est très faible ou nulle. Le groupe constitué de plusieurs espèces de *Bbsl* contient des séquences génétiques qui présentent une grande distance génétique intra et inter-groupe (distance génétique supérieure à 5 %, et allant jusqu'à 14 %).

Il faut noter qu'une séquence génétique identifiée comme étant celle d'une *B. garinii* est plus proche des séquences génétiques de *B. valaisiana* que des autres *B. garinii* (inclusion dans le groupe des *B. valaisiana*). Les séquences génétiques provenant d'espèces de *Bbsl* non identifiées (quatre en tout), sont toutes très proches génétiquement des *B. garinii*, suggérant leur appartenance à cette espèce.

Figure 22 : Matrice des distances génétiques des séquences

Chaque case de la matrice représente la distance génétique entre deux séquences : la couleur des cases varie du bleu foncé (absence de distance génétique entre les deux séquences) au rouge foncé (distance génétique la plus élevée). Les noms des séquences génétiques comparées figurent en fin de ligne/colonne. La matrice est carrée et symétrique : sa diagonale correspond à la comparaison des séquences avec elles-mêmes. Les grands carrés noirs regroupent les distances entre les séquences génétiques issues d'une même espèce de *Bbsl*. Le carré noir en pointillé correspond à *B. garinii*, celui avec des tirets correspond à *B. valaisiana*, tandis que celui en traits pleins correspond à *B. turdi*. Le carré violet représente un mélange d'espèces de *Bbsl*.



De nombreuses multifurcations sont présentes sur l'arbre phylogénétique construit à partir des 96 séquences de *Bbsl* (Figure 23). En effet, l'arbre est constitué de 32 nœuds internes, alors qu'il pourrait y en avoir 95 si chaque nœud interne avait deux descendants. Deux grands clades¹⁷ sont visibles sur cet arbre. On définit le clade A (75 séquences) et le clade B (18 séquences), qui incluent la majorité des séquences de l'arbre. Trois séquences n'appartiennent pas à ces deux

¹⁷ Groupes constitués par un ancêtre commun et l'ensemble de ses descendants, au sein desquels les séquences génétiques sont les plus proches

clades. Les 75 séquences composant le clade A sont issues de larves collectées sur des oiseaux capturés dans 23 stations, alors que les 18 séquences composant le clade B sont issues de larves collectées sur des oiseaux capturés dans 10 stations (Figure 25). De plus, on définit deux sous clades au sein du clade A : le sous clade A1 (26 séquences provenant de 17 stations) et le sous clade A2 (24 séquences provenant de 11 stations).

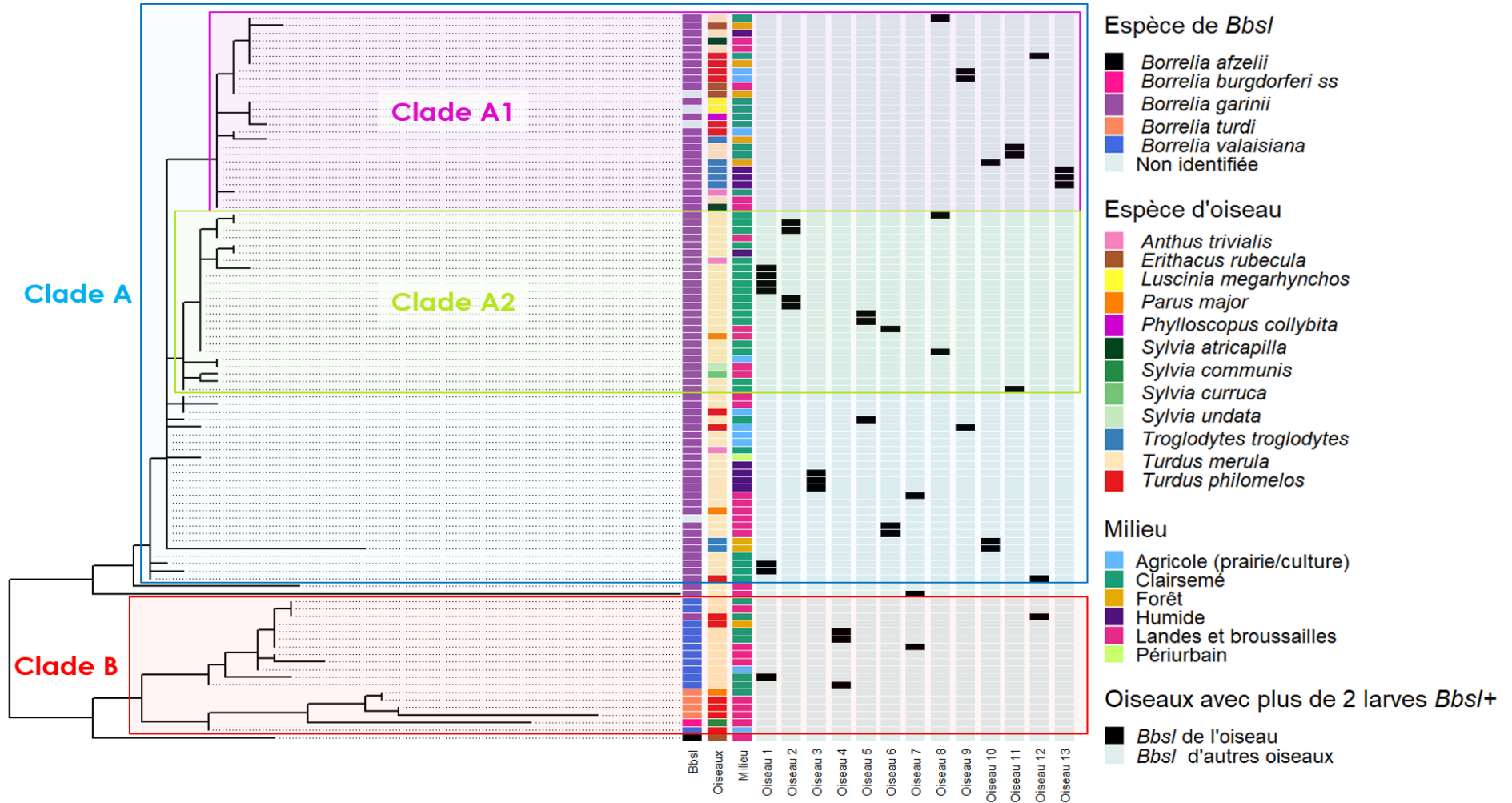
Les séquences composant le clade A sont toutes issues de *B. garinii*, alors que le clade B regroupe les autres espèces (sauf une *B. garinii* présente dans ce clade). Le clade B est composé de deux sous clades, toutes les séquences issues de *B. valaisiana* étant regroupées dans le premier (sauf une), et toutes les séquences issues de *B. turdi* étant regroupées dans le second. Il y a donc un regroupement des séquences génétiques en fonction de l'espèce de bactérie dont elles sont issues : les séquences issues d'une même espèce de *Bbsl* sont les plus proches génétiquement. Les quatre séquences issues d'espèces de *Bbsl* non identifiées sont incluses dans le clade des *B. garinii* : elles proviennent probablement de cette espèce. Les séquences de *B. garinii* sont globalement plus proches entre elles que les séquences de *B. valaisiana* et *B. turdi*.

Il n'y a pas de regroupement strict des séquences de *Bbsl* en fonction de l'espèce d'oiseau dont les larves positives sont issues, ou du milieu de vie de l'oiseau. Cependant, le grand nombre de Merles noirs présents dans notre échantillon limite la visualisation d'une structure. Le sous clade A1 présente une diversité d'espèces d'oiseaux importante, où le Merle noir est moins présent qu'ailleurs (le Merle noir n'est pas non plus présent dans le sous clade regroupant *B. turdi*). En effet, les 26 séquences du sous clade A1 sont issues de larves collectées sur huit espèces d'oiseaux, avec six larves collectées sur des Merle noirs, six larves collectées sur des Grives musiciennes, et six larves collectées sur des Troglodytes mignons (*Troglodytes troglodytes*). Les larves issues des autres espèces aviaires sont minoritaires. Cette diversité d'espèces aviaires va de pair, pour le sous clade A1, avec une diversité de milieux de vie (cinq milieux différents, avec une majorité de milieux clairsemés (n = 9), landes et broussailles (n = 5) et forêt (n = 5)). Les séquences du clade A2 sont majoritairement issues de larves collectées sur des Merles noirs, et ces larves proviennent en majorité de milieux clairsemés (24 séquences de *Bbsl* issues de larves collectées sur cinq espèces d'oiseaux, avec 20 larves collectées sur des Merles noirs, et 17 larves issues de milieux clairsemés). On distingue donc des clades où les Merles noirs sont majoritaires, et des clades avec une diversité aviaire plus importante.

Globalement, les séquences génétiques des *Bbsl* issues des larves portées par un même oiseau sont proches entre elles. Ce n'est cependant pas toujours le cas, notamment quand les séquences sont issues de différentes espèces de *Bbsl*.

Figure 23 : Arbre phylogénétique construit à partir des 96 séquences génétiques de *Bbsl*

Arbre obtenu par la méthode du maximum de parcimonie. La longueur des branches représente la distance génétique entre les séquences. Les colonnes accolées à droite de l'arbre représentent les métadonnées associées aux séquences génétiques, avec respectivement de gauche à droite : l'espèce de *Bbsl* correspondant à la séquence génétique, l'espèce d'oiseau dont est issue la larve gorgée positive à cette *Bbsl*, le milieu de vie de l'oiseau, et les larves provenant d'un même oiseau pour les 13 oiseaux porteurs de plus de deux larves positives à *Bbsl* (colonnes « Oiseau 1 » à « Oiseau 13 »).



Nous n'observons pas de regroupement spatial des séquences issues des clades A et B (Figure 24). *B. garinii* (clade A) se retrouve dans la majorité des territoires de France où des données ont pu être collectées (présence d'une station STOC avec collecte de larves). Les autres espèces de *Bbsl* (clade B) se retrouvent plus au Nord de la France. Des larves positives à *B. garinii* et aux autres *Bbsl* sont présentes dans des mêmes stations : il n'y a pas de ségrégation spatiale apparente entre les clades A et B.

Les *B. garinii* appartenant aux sous clades A1 et A2 sont aussi retrouvées dans de nombreux territoires, et dans des mêmes stations (Figure 25) : les *B. garinii* génétiquement proches ne semblent pas être proches d'un point de vue spatial. Visuellement, il ne semble pas y avoir de structure spatiale pour *B. garinii*.

Figure 24 : Répartition spatiale des *Bbsl* appartenant aux clades A et B, et des *Bbsl* hors clades

Les *Bbsl* hors clade ($n = 3$) ont été identifiées chez des larves collectées sur des oiseaux capturés dans deux stations. Ces stations sont représentées par des points noirs de taille différente en fonction du nombre de larves trouvées (une larve pour le plus petit point, et deux pour le plus grand).

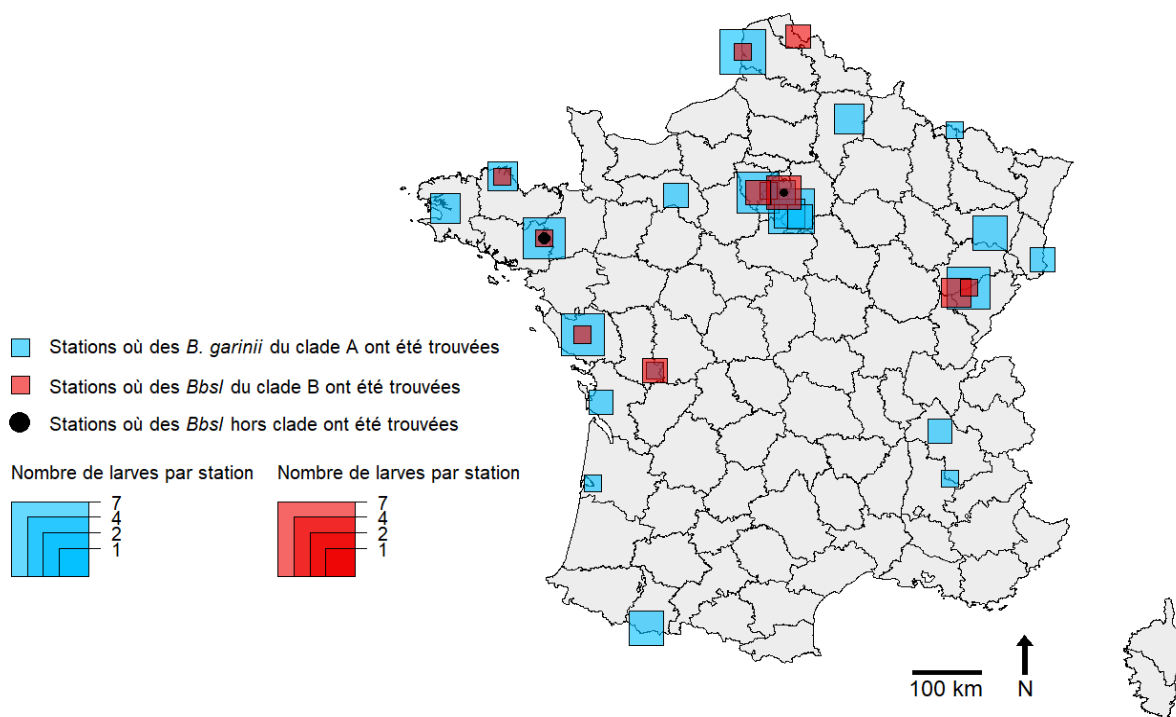
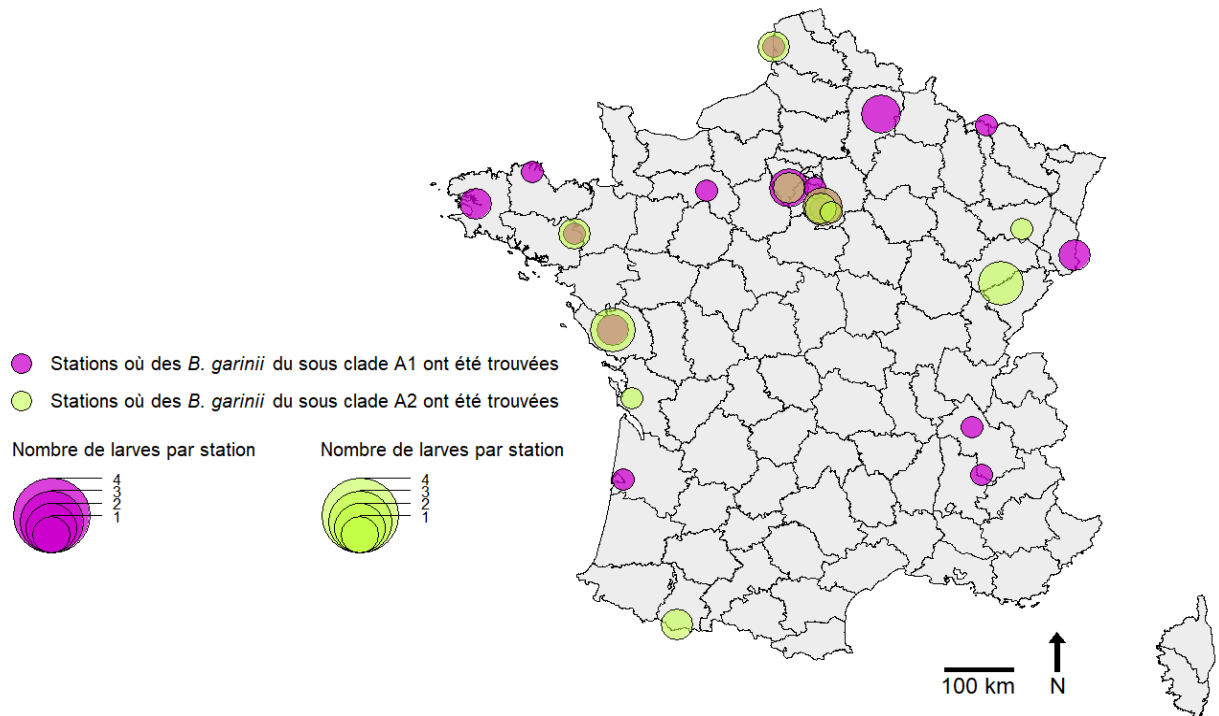


Figure 25 : Répartition spatiale des *B. garinii* appartenant aux sous clades A1 et A2



4. Discussion

La grande majorité (94 %) des larves gorgées collectées sur les oiseaux appartenait à l'espèce *I. ricinus*. L'espèce de *Bbsl* majoritaire retrouvée chez ces larves était *B. garinii* (78 %). Le Merle noir et la Grive musicienne se démarquaient par un pourcentage élevé d'individus positifs à *Bbsl*. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature : *B. garinii* est la *Bbsl* la plus fréquemment retrouvée chez les tiques collectées sur des oiseaux pour différents pays d'Europe (Michalik *et al.*, 2008 ; Dubska *et al.*, 2009 ; Gryczyńska et Welc-Falęciak, 2016 ; Klaus *et al.*, 2016). Dans ces études, le Merle noir et la Grive musicienne font aussi partie des espèces portant le plus de larves positives à *Bbsl*. Dans notre étude, d'autres espèces (Pipit des arbres, Fauvette pitchou) présentaient aussi un pourcentage élevé d'individus positifs à *Bbsl*. Cependant, le nombre d'individus échantillonnés et porteurs d'au moins une larve était faible pour ces espèces ($n \leq 6$) : ces pourcentages ne constituent donc probablement pas un bon indicateur du pourcentage de positivité réel des individus issus de ces espèces aviaires.

Le nombre élevé de larves positives à *Bbsl* collectées sur des Merles noirs peut s'expliquer d'abord par l'abondance de cette espèce aviaire en France : c'est l'une des espèces les plus capturées dans les stations STOC en 2019-2020 (130 captures), derrière le Rougegorge familier (174 individus capturés) et la Fauvette à tête noire (145 individus capturés). Ensuite, en plus de son abondance naturelle, le Merle noir est connu pour être un des réservoirs principaux de *B. garinii* (Humair *et al.*, 1998 ; Taragel'ová *et al.*, 2008). Les différentes espèces aviaires réservoirs pour *B. garinii* n'ont pas toutes la même capacité à s'infecter et à transmettre cette bactérie à des tiques naïves dans leur environnement. Les espèces d'importance majeure dans la circulation de *B. garinii* que sont le Merle noir et la Grive musicienne présentent à la fois un pourcentage élevé d'individus positifs à *Bbsl*, et un pourcentage élevé de tiques infectées par individu. Ceci explique que la seconde espèce aviaire avec le plus de larves positives à *B. garinii*

collectées dans notre étude soit la Grive musicienne, malgré un nombre d'individus capturés plus faible ($n = 54$) que la Mésange charbonnière ($n = 96$). En effet, bien que la Mésange charbonnière soit compétente pour *B. garinii*, plusieurs études montrent que cette espèce présente un pourcentage relativement faible d'individus infectés et de larves positives à *B. garinii* (inférieurs à cinq pourcent) (Taragel'ová *et al.*, 2008 ; Dubska *et al.*, 2009). De même, le Rougegorge familier n'est pas une espèce réservoir pour *B. garinii*, ce qui explique que peu de larves positives aient été collectées sur cette espèce, malgré le fait que c'est l'une des principales espèces capturées et qu'elle présente un pourcentage élevé d'individus infestés dans notre étude.

L'ensemble des *Bbsl* étudiées étaient génétiquement proches pour le fragment de gène séquencé (*flaB*) : 93 % des paires de séquences étudiées avaient une distance génétique inférieure à 5 %. Comme attendu, les séquences génétiques appartenant à une même espèce de *Bbsl* étaient les plus proches. Des résultats similaires à ceux de notre étude quant à la diversité génétique du gène *flaB* des *Bbsl* ont été obtenus lors d'une étude en Pologne (Wodecka et Kolomiiets, 2023). Cette étude, qui a détecté la présence de *Bbsl* chez des tiques à l'affût, a montré que la diversité génétique interspécifique et intraspécifique des *Bbsl* était faible pour le gène *flaB*. La distance génétique interspécifique maximale retrouvée était de 7 % entre *B. finlandensis* et *B. spielmanii*, parmi les 11 espèces de *Bbsl* détectées. Les *Bbsl* appartenant à une même espèce étaient les plus proches. La distance génétique moyenne au sein des *B. garinii* était de 0,8 % (contre 1,3 % dans notre étude). Dans notre étude, quelques bactéries étaient plus proches d'autres espèces que celle qui leur avait été attribuée, ce qui pourrait s'expliquer par une mauvaise identification de l'espèce pour ces bactéries lors du séquençage. La matrice des distances montrait plusieurs sous-groupes de *B. garinii*, sous-groupes qui n'ont pas été observés chez *B. valaisiana* et *B. turdi*. Plusieurs études sur des tiques à l'affût ont montré une plus grande diversité génétique au sein de *B. garinii* par rapport à d'autres *Bbsl* (Vollmer *et al.*, 2011 ; Jacquot *et al.*, 2014). Cependant, le faible nombre de séquences disponibles pour *B. valaisiana* et *B. turdi* nous limite dans la comparaison de la diversité génétique de ces espèces par rapport à *B. garinii*, des sous-groupes pouvant exister chez ces espèces de *Bbsl* sans que nous ayons pu les mettre en évidence.

L'arbre phylogénétique construit par la méthode du maximum de parcimonie comportait de nombreuses multifurcations, qui peuvent s'expliquer par la forte proximité génétique de certaines séquences. Le gène séquencé (*flaB*) est un gène de ménage, souvent utilisé pour identifier les différentes espèces de *Bbsl*. Ainsi, ce gène est conservé au sein d'une espèce, ce qui explique la faible diversité génétique retrouvée pour les séquences de *Bbsl* étudiées. De ce fait, il est probable que la diversité génétique observée dans cette étude pour le gène *flaB* ne reflète pas la diversité génétique existant entre les génomes des *Bbsl* étudiées. Il serait donc intéressant de reprendre cette étude en privilégiant cette fois le protocole défini par Margos *et al.* (Margos *et al.*, 2008), et repris par de nombreuses études : ce protocole consiste à réaliser un MLST sur huit gènes de ménage. Cela permettrait d'obtenir une plus grande variabilité génétique chez les *Bbsl* étudiées, ainsi que de faciliter la comparaison avec les études ayant utilisé ce même protocole. Selon les connaissances actuelles, ces gènes sont intéressants d'un point de vue phylogénétique, car ils reflètent l'histoire évolutive des bactéries (peu de transferts horizontaux, évolution lente...) (Margos *et al.*, 2008). De plus, l'inclusion de plusieurs gènes permet de limiter les biais potentiels introduits par des échanges de matériel génétique entre les *Bbsl*. Ces échanges sont supposés rares pour les gènes de ménage, mais peuvent tout de même survenir, et fausser les analyses phylogénétiques lorsqu'ils ne sont pas pris en compte. Deux bactéries issues d'une même lignée

peuvent par exemple présenter une grande distance génétique si l'une d'entre elles a échangé une partie d'un gène avec une autre bactérie.

Les *Bbsl* formant les clades A et B, ainsi que les sous-clades A1 et A2 identifiés sur l'arbre phylogénétique ne provenaient pas forcément de larves issues d'une même espèce d'oiseau. Une analyse poussée du lien entre diversité génétique et espèce aviaire hôte n'était pas possible du fait de la prédominance du Merle noir par rapport aux autres espèces aviaires. Les *B. garinii* du sous-clade A2 étaient majoritairement retrouvées chez les Merles noirs, alors que le sous-clade A1 était plus diversifié en termes d'espèces aviaires. Cependant, le nombre d'oiseaux présents dans ces analyses était limité ($n = 54$), et les 56 séquences génétiques de *Bbsl* issues des Merles noirs provenaient de larves gorgées collectées sur 26 oiseaux. Ces données sont insuffisantes pour caractériser la diversité génétique présente chez les *Bbsl* circulant chez le Merle noir ou chez d'autres espèces en France. Pour pouvoir explorer plus en détail l'existence d'un lien entre la diversité génétique de *B. garinii* et l'espèce aviaire hôte, il serait intéressant de reprendre le protocole de capture des oiseaux avec collecte de tiques sur une plus longue période, mais en demandant à chaque bagueur de ne collecter des tiques que chez les espèces d'oiseaux dont le rôle de réservoir est suspecté ou prouvé pour *B. garinii*, et qui sont capturables dans les stations STOC (par exemple le Merle noir, la Grive musicienne, la Mésange charbonnière, le Pipit des arbres et le Troglodyte mignon (Rataud, 2022)). Cela permettrait d'obtenir un plus grand nombre de séquences génétiques sur un nombre plus restreint d'espèces aviaires, et donc de mieux caractériser la diversité génétique des *Bbsl* issues de ces espèces.

L'absence de lien entre diversité génétique de *B. garinii* et espèce aviaire hôte mis en évidence dans notre étude est concordant avec certains éléments de la littérature : la seule étude disponible à notre connaissance ne met pas en évidence de regroupement de *B. garinii* en fonction de l'espèce d'oiseau dont les larves sont issues (Norte *et al.*, 2020). Ces résultats sont toutefois à confirmer, le nombre d'oiseaux inclus dans l'étude de Norte et ses collaborateurs étant faible. Cependant, des études suggèrent que les spécificités d'hôtes (vecteurs et hôtes vertébrés) jouent un rôle important dans la diversité génétique des *Bbsl*, pouvant conduire à de la spéciation. Par exemple, dans une étude de 2009 (Margos *et al.*, 2009), une MLSA a été réalisée sur huit gènes de ménage à partir d'une centaine de souches de *Bbsl*, provenant majoritairement de pays d'Europe. Les analyses ainsi que l'arbre phylogénétique obtenus ont permis de définir *B. bavariensis* en tant que nouvelle espèce, et de faire l'hypothèse que *B. garinii* serait une espèce plus récente que *B. bavariensis*, apparue suite à une adaptation aux oiseaux. Cependant, en 2016, une étude a suggéré que *B. bavariensis* serait l'espèce la plus récente des deux : grâce aux techniques de séquençage complet du génome, cette étude a pu inférer un arbre phylogénétique à partir d'une centaine de gènes issus de 111 souches de *Bbsl* provenant de différents pays du monde (Becker *et al.*, 2016). Cette étude suggère que la spéciation ayant conduit à la séparation de *B. bavariensis* et de *B. garinii* fait probablement suite à une adaptation à un nouvel hôte : *B. bavariensis* se serait différenciée de *B. garinii* suite à un changement d'hôte préférentiel en faveur des rongeurs. L'étude de Becker *et al.* met aussi en évidence deux populations distinctes de *B. bavariensis* : une, hétérogène, située en Asie, et l'autre, plus homogène, en Europe. Cette étude suggère que c'est l'adaptation d'une population de bactéries à un nouveau vecteur (*I. ricinus*) qui a permis à celle-ci d'envahir l'Europe à partir de l'Asie (Becker *et al.*, 2016). Il est donc possible que, même au sein d'une espèce de *Bbsl*, certains clades circulent préférentiellement chez différentes espèces (de vecteurs ou d'hôtes). Si la circulation de souches de *Bbsl* plus adaptées aux Merles noirs est confirmée, il pourrait être intéressant d'étudier les différences dans le génome des *Bbsl* issues des clades regroupant une majorité de Merles noirs.

avec celles issues des autres espèces, afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications des gènes régissant l'interaction hôte/bactérie.

Les *Bbsl* issues des différents clades sur l'arbre phylogénétique ne provenaient pas forcément d'oiseaux issus d'un même milieu. L'analyse du lien entre diversité génétique des *Bbsl* et milieu de capture des oiseaux est aussi délicate, à cause de la prédominance des milieux arbustifs/broussailleux. Cette prédominance s'explique par le fait que les stations STOC sont majoritairement placées dans ces milieux. Il serait pertinent de capturer des oiseaux dans des milieux plus diversifiés, hors station STOC, afin de pouvoir affiner notre analyse.

Lorsque plus de deux séquences de *Bbsl* ont été isolées sur des larves provenant d'un même oiseau, leur positionnement sur l'arbre phylogénétique suggère que ces séquences sont génétiquement proches, par rapport à des séquences issues de larves collectées sur des oiseaux différents. Cela pourrait être dû au fait que les *Bbsl* infectant les larves infestant l'oiseau sont toutes les descendantes des *Bbsl* ayant infecté l'oiseau en premier lieu. Cependant, certaines *B. garinii* détectées chez les larves issues d'un même oiseau ne partagent pas cette forte proximité génétique : ces différences génétiques pourraient notamment s'expliquer si certaines larves se sont infectées par co-repas, avec une souche de *B. garinii* provenant d'une autre tique se nourrissant sur le même oiseau.

Aucune structure spatiale pour *B. garinii* n'a pu être mise en évidence par observation visuelle, les *Bbsl* provenant de différents clades étaient retrouvées dans des mêmes stations. Ces résultats sont cohérents avec les études précédemment réalisées sur *B. garinii* : hors échelle supérieure au continent, les *B. garinii* proches génétiquement ne semblent pas regroupées sur un même territoire (Vollmer *et al.*, 2013 ; Mtierová *et al.*, 2020 ; Norte *et al.*, 2020). En effet, les oiseaux sont des hôtes mobiles pouvant se déplacer sur de grandes distances. Cependant, la présence de zones étendues sans station active en 2019-2020 (donc sans possibilité de collecter des données) nous empêche d'avoir une vision complète de la répartition spatiale de ces bactéries. Cette absence de station concerne notamment l'Ouest de la région Bourgogne-Franche-Comté ainsi que le carrefour des régions Nouvelle-Aquitaine, Auvergne-Rhône-Alpes et Occitanie. De plus, l'analyse de la structure spatiale de *B. garinii* a été uniquement visuelle. Il serait pertinent de compléter cette analyse visuelle par une analyse statistique de détection de cluster pour confirmer l'absence de regroupement spatial des bactéries génétiquement proches.

Notons que la méthode de construction d'un arbre phylogénétique par maximum de parcimonie tend à donner des arbres moins robustes et précis (dont la topologie peut varier) par rapport aux méthodes du maximum de vraisemblance et de l'inférence bayésienne (Hall, 2017). Cela est notamment dû au fait que la méthode du maximum de parcimonie n'utilise pas de modèle de substitution explicite, ce qui peut mener à une sous-estimation des distances génétiques entre les séquences. La méthode du maximum de parcimonie ne prend pas en compte l'évolution parallèle des séquences (homoplasie : deux séquences seront proches car elles auront évolué de la même façon, sans toutefois appartenir à la même lignée). Elle ne prend pas non plus en compte l'évolution rétrograde des séquences (par exemple un nucléotide A d'une séquence qui serait substitué en G puis de nouveau en A) (Nei et Kumar, 2000). Cependant, c'est une méthode rapide et qui est adaptée à notre jeu de données : en effet, cette méthode est adaptée à l'étude de gènes dont le taux de mutation est faible, ce qui est le cas pour les gènes de ménage. Au vu de la grande proximité génétique de nos séquences, l'utilisation d'autres méthodes phylogénétiques aurait probablement donné des résultats similaires à ceux obtenus.

Le séquençage de l'ADN contenu dans les larves gorgées ne permet pas de détecter d'éventuelles co-infections à *BbsI*. Cependant, ces co-infections sont présumées rares, les larves étant généralement non infectées par *BbsI* avant leur premier repas sanguin. En effet, les transmissions trans-ovariennes et les transmissions par co-repas sont rares chez les *BbsI*.

Enfin, l'utilisation du gène *flaB* pour l'identification des espèces de *BbsI* ne permet pas de distinguer *B. garinii* de *B. bavariensis* (deux espèces très proches génétiquement). Cependant, le nombre de *B. bavariensis* au sein de notre étude devrait être nul ou négligeable, car *B. bavariensis* a pour réservoirs principaux les rongeurs. La mise en œuvre du protocole par MLST permettrait de distinguer ces deux espèces.

Conclusion

Cette étude a permis de réaliser une première description de la diversité génétique et de la répartition spatiale des *B. garinii* détectées chez des larves gorgées collectées chez des oiseaux communs en France. Les séquences des bactéries échantillonnées, correspondant à un fragment du gène *flaB* des *BbsI*, étaient génétiquement proches, et réparties dans l'ensemble des zones où des données ont pu être collectées. Les séquences génétiquement proches n'étaient pas regroupées dans une même zone géographique, et des séquences issues de *BbsI* appartenant à différents clades étaient retrouvées dans des mêmes stations : aucune structure spatiale n'a été observée. L'arbre phylogénétique construit par maximum de parcimonie n'a pas mis en évidence de regroupement strict de séquences génétiques de *B. garinii* en fonction de l'espèce d'oiseau dont étaient issues les larves infectées ou de son milieu de vie. Cependant, certains clades de *BbsI* pourraient circuler majoritairement chez le Merle noir, tandis que d'autres pourraient être associés à une plus grande diversité d'espèces aviaires (ces résultats étant à confirmer par d'autres études).

L'utilisation du fragment d'un seul gène (*flaB*) limite l'étude de la variabilité génétique et de la phylogénie de *B. garinii*. Il serait donc pertinent d'obtenir des séquences génétiques en suivant un protocole permettant d'obtenir des fragments de plusieurs gènes de ménages, ce qui pourrait permettre de mettre en évidence une variabilité génétique plus importante que celle retrouvée dans cette étude, d'améliorer la robustesse de l'arbre phylogénétique construit ainsi que de faciliter la comparaison avec d'autres études ayant utilisé ce protocole. Elargir le spectre d'hôte de notre étude et inclure les rongeurs permettrait aussi de comparer la proximité génétique de *B. garinii* et de *B. bavariensis*, sous réserve d'utiliser un protocole permettant de différencier ces deux espèces.

Liste des références bibliographiques

- ASLAM, B., HUSSAIN, I., MAHMOOD, M., *et al.* (2012) Flagellin gene based phylogenetic analysis of Pakistani strain of *Borrelia anserina* isolated from *Argas* ticks. *African Journal of Microbiology Research* vol. 6, n° 13, p. 3214-3221. [<https://doi.org/10.5897/AJMR11.1591>]
- AUCOTT, J., MORRISON, C., MUNOZ, B., *et al.* (2009) Diagnostic challenges of early Lyme disease: lessons from a community case series. *BMC Infectious Diseases* vol. 9, n° 1, p. 79. [<https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-79>]
- BARANTON, G., POSTIC, D., SAINT GIRONS, I., *et al.* (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology* vol. 42, n° 3, p. 378-383. [<https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-378>]
- BAUM, D. (2008) Reading a phylogenetic tree: The meaning of monophyletic groups. *Nature Education* vol. 1, n° 1, p. 190.
- BECKER, N.S., MARGOS, G., BLUM, H., *et al.* (2016) Recurrent evolution of host and vector association in bacteria of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* species complex. *BMC Genomics* vol. 17, n° 1, p. 734. [<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3016-4>]
- BOULANGER, N., MCCOY, K.D. (2015) Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie. Marseille, IRD Éditions. [<https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9001>]
- BROWN, T.A. (2002) Genomes, 2ème éd. Oxford, Wiley-Liss.
- CARDENAS-DE LA GARZA, J.A., DE LA CRUZ-VALADEZ, E., OCAMPO-CANDIANI, J., *et al.* (2019) Clinical spectrum of Lyme disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* vol. 38, n° 2, p. 201-208. [<https://doi.org/10.1007/s10096-018-3417-1>]
- CERAR, T., STRLE, F., STUPICA, D., *et al.* (2016) Differences in genotype, clinical features, and inflammatory potential of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* strains from Europe and the United States. *Emerging Infectious Diseases* vol. 22, n° 5, p. 818-827. [<https://doi.org/10.3201/eid2205.151806>]
- CHAO, L.-L., SHIH, C.-M. (2009) Genetic analysis of the flagellin gene of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) isolated from rodents in Taiwan. *Journal of Medical Sciences* vol. 29, n° 5, p. 249-255.
- CITIQUE (2023) La biologie des tiques. In *CITIQUE*. [<https://www.citique.fr/les-tiques/biologie-tiques/>] (consulté le 19/11/2023).
- COBURN, J., GARCIA, B., HU, L.T., *et al.* (2021) Lyme disease pathogenesis. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 42, p. 473-518. [<https://doi.org/10.21775/cimb.042.473>]
- COIPAN, E.C., JAHFARI, S., FONVILLE, M., *et al.* (2016) Imbalanced presence of *Borrelia burgdorferi s.l.* multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 42, p. 66-76. [<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.019>]
- COMSTEDT, P., ASOKLIENE, L., ELIASSON, I., *et al.* (2009) Complex population structure of Lyme borreliosis group spirochete *Borrelia garinii* in subarctic Eurasia. *PLoS One* vol. 4, n° 6, p. e5841. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005841>]
- DANTAS-TORRES, F. (2015) Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife* vol. 4, n° 3, p. 452-461. [<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.07.001>]
- DERDÁKOVÁ, M., LENČÁKOVÁ, D. (2005) Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi sensu lato* with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* vol. 12, n° 2, p. 165-172.
- DIVERS, T.J., GARDNER, R.B., MADIGAN, J.E., *et al.* (2018) *Borrelia burgdorferi* infection and Lyme disease in North American horses: A consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 32, n° 2, p. 617-632. [<https://doi.org/10.1111/jvim.15042>]

- DRUMMOND, A. (2023) Model-based Phylogenetic Inference. In *Alexeidrummond*. [https://alexeidrummond.org/bayesian_phylo_lectures/lectureSubstitutionModels/?print-pdf#/] (consulté le 19/11/2023).
- DRUMMOND, A.J., BOUCKAERT, R.R. (2015) Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST. Cambridge, Cambridge University Press.
- DUBSKA, L., LITERAK, I., KOCIANOVA, E., *et al.* (2009) Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 75, n° 3, p. 596-602. [<https://doi.org/10.1128/AEM.01674-08>]
- DUNN, M., BURENHULT, N., KRUSPE, N., *et al.* (2011) Asian linguistic prehistory: A case study in computational phylogenetics. *Diachronica* vol. 28, p. 291-323. [<https://doi.org/10.1075/dia.28.3.01dun>]
- ELDIN, C., RAFFETIN, A., BOUILLER, K., *et al.* (2019) Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Médecine et Maladies Infectieuses* vol. 49, n° 2, p. 121-132. [<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.11.011>]
- ESTRADA-PEÑA, A., CUTLER, S., POTKONJAK, A., *et al.* (2018) An updated meta-analysis of the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks in Europe. *International Journal of Health Geographics* vol. 17, n° 1, p. 41. [<https://doi.org/10.1186/s12942-018-0163-7>]
- ESTRADA-PEÑA, A., MIHALCA, A.D., PETNEY, T.N. (2017) Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification. Cham, Springer International Publishing. [<https://doi.org/10.1007/978-3-319-63760-0>]
- FOURNIER, L., ROUSSEL, V., COUTURIER, E., *et al.* (2018) Épidémiologie de la borréliose de Lyme en médecine générale, France métropolitaine, 2009-2016. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* vol. 19-20, p. 383-8.
- FUKUNAGA, M., OKADA, K., NAKAO, M., *et al.* (1996) Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *International Journal of Systematic Bacteriology* vol. 46, n° 4, p. 898-905. [<https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-898>]
- GALLAIS, F., DE MARTINO, S.J., SAULEAU, E.A., *et al.* (2018) Multilocus sequence typing of clinical *Borrelia afzelii* strains: population structure and differential ability to disseminate in humans. *Parasites & Vectors* vol. 11, n° 1, p. 374. [<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2938-x>]
- GARCIA, K., WEAKLEY, M., DO, T., *et al.* (2022) Current and future molecular diagnostics of tick-borne diseases in cattle. *Veterinary Sciences* vol. 9, n° 5, p. 241. [<https://doi.org/10.3390/vetsci9050241>]
- GARCIA-MONCO, J.C., BENACH, J.L. (2019) Lyme neuroborreliosis: clinical outcomes, controversy, pathogenesis, and polymicrobial infections. *Annals of Neurology* vol. 85, n° 1, p. 21-31. [<https://doi.org/10.1002/ana.25389>]
- GATHANY, J. (2007) Public Health Image Library (PHIL). In *Centers for Disease Control and Prevention*. [<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=9874>] (consulté le 19/11/2023).
- GOËFFON, A., RICHER, J.-M., HAO, J.-K. (2010) Heuristic methods for phylogenetic reconstruction with Maximum Parsimony. In Elloumi M., Zomaya A.Y, *Algorithms in Computational Molecular Biology: Techniques, Approaches and Applications*. Ames, Wiley, p. 579-597. [<https://doi.org/10.1002/9780470892107.ch26>]
- GÓMEZ-DÍAZ, E., BOULINIER, T., SERTOURE, N., *et al.* (2011) Genetic structure of marine *Borrelia garinii* and population admixture with the terrestrial cycle of Lyme borreliosis. *Environmental Microbiology* vol. 13, n° 9, p. 2453-2467. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02515.x>]
- GOOSSENS, H.A.T., VAN DEN BOGAARD, A.E., NOHLMANS, M.K.E. (2001) Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 39, n° 3, p. 844-848. [<https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.844-848.2001>]
- GRAY, J., KAHL, O., LANE, R.S., *et al.* (2002) Lyme Borreliosis: Biology, epidemiology, and control. Wallingford, CABI Publishing.

- GRAY, J., KAHL, O., ZINTL, A. (2021) What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 12, n° 3, p. 101682. [https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101682]
- GRYCZYŃSKA, A., WELC-FALEĆIAK, R. (2016) Long-term study of the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection in ticks (*Ixodes ricinus*) feeding on blackbirds (*Turdus merula*) in NE Poland. *Experimental & Applied Acarology* vol. 70, n° 3, p. 381-394. [https://doi.org/10.1007/s10493-016-0082-x]
- GYLFE, A., BERGSTRÖM, S., LUNDSTRÖM, J., et al. (2000) Reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature* vol. 403, n° 6771, p. 724-725. [https://doi.org/10.1038/35001663]
- HALL, B.G. (2017) Phylogenetic trees made easy: A how-to manual. 5^{ème} éd., Sunderland, Sinauer Associates.
- HAMMING, R.W. (1950) Error detecting and error correcting codes. *Bell System Technical Journal* vol. 29, n° 2, p. 147-160. [https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1950.tb00463.x]
- HANINCOVA, K., MUKHERJEE, P., OGDEN, N.H., et al. (2013) Multilocus sequence typing of *Borrelia burgdorferi* suggests existence of lineages with differential pathogenic properties in humans. *PloS One* vol. 8, n° 9, p. e73066. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073066]
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ (2018) Recommandation de bonne pratique – Borréliose de Lyme et autres maladies vectorielles à tiques. *In Haute Autorité De Santé*. [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-06/fiche_rbp_2_borreliose_de_lyme-v1-180618.pdf] (consulté le 10/09/2023).
- HAYDON, D.T., CLEAVELAND, S., TAYLOR, L.H., et al. (2002) Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases* vol. 8, n° 12, p. 1468-1473. [https://doi.org/10.3201/eid0812.010317]
- HEYLEN, D., FONVILLE, M., DOCTERS VAN LEEUWEN, A., et al. (2017a) Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries. *Parasites & Vectors* vol. 10, n° 1, p. 497. [https://doi.org/10.1186/s13071-017-2423-y]
- HEYLEN, D., KRAWCZYK, A., LOPES DE CARVALHO, I., et al. (2017b) Bridging of cryptic *Borrelia* cycles in European songbirds. *Environmental Microbiology* vol. 19, n° 5, p. 1857-1867. [https://doi.org/10.1111/1462-2920.13685]
- HEYLEN, D., MATTHYSEN, E., FONVILLE, M., et al. (2014a) Songbirds as general transmitters but selective amplifiers of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genotypes in *Ixodes ricinus* ticks. *Environmental Microbiology* vol. 16, n° 9, p. 2859-2868. [https://doi.org/10.1111/1462-2920.12304]
- HEYLEN, D., SPRONG, H., VAN OERS, K., et al. (2014b) Are the specialized bird ticks, *Ixodes arboricola* and *I. frontalis*, competent vectors for *Borrelia burgdorferi sensu lato*? *Environmental Microbiology* vol. 16, n° 4, p. 1081-1089. [https://doi.org/10.1111/1462-2920.12332]
- HEYLEN, D., TIJSSE, E., FONVILLE, M., et al. (2013) Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.l. in a bird tick community. *Environmental Microbiology* vol. 15, n° 2, p. 663-673. [https://doi.org/10.1111/1462-2920.12059]
- HEYLEN, D.J.A. (2016) 7. Ecological interactions between songbirds, ticks, and *Borrelia burgdorferi* s.l. in Europe. *In* Braks M.A.H., Van Wieren S.E., Takken W., *Ecology and prevention of Lyme borreliosis*. Wageningen Academic Publishers, p. 91-101. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-838-4_7]
- HOFMEESTER, T.R., COIPAN, E.C., WIEREN, S.E. van, et al. (2016) Few vertebrate species dominate the *Borrelia burgdorferi* s.l. life cycle. *Environmental Research Letters* vol. 11, n° 4, p. 043001. [https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/4/043001]
- HU, C.M., HUMAIR, P.F., WALLICH, R., et al. (1997) *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zentralblatt Fur Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology* vol. 285, n° 4, p. 558-564. [https://doi.org/10.1016/s0934-8840(97)80117-x]
- HUEGLI, D., HU, C.M., HUMAIR, P.-F., et al. (2002) *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 40, n° 12, p. 4735-4737. [https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4735-4737.2002]

- HUMAIR, P.F., GERN, L. (1998) Relationship between *Borrelia burgdorferi sensu lato* species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Tropica* vol. 69, n° 3, p. 213-227. [[https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(97\)00126-5](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(97)00126-5)]
- HUMAIR, P.F., POSTIC, D., WALLICH, R., *et al.* (1998) An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralblatt Fur Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology* vol. 287, n° 4, p. 521-538.
- HYUN-CHAN, J. (2015) Principes, méthodes et applications cliniques du typage de séquences multilocus (MLST). In *Blog-naver*. [<https://blog.naver.com/hyouncho2/220483348600>] (consulté le 19/11/2023).
- INRAE (2020) La maladie de Lyme en 10 questions. In *INRAE*. [<https://www.inrae.fr/actualites/maladie-lyme-10-questions>] (consulté le 15/11/2023).
- JACQUOT, M., GONNET, M., FERQUEL, E., *et al.* (2014) Comparative population genomics of the *Borrelia burgdorferi* species complex reveals high degree of genetic isolation among species and underscores benefits and constraints to studying intra-specific epidemiological processes. *PLoS One* vol. 9, n° 4, p. e94384. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094384>]
- JAHFARI, S., KRAWCZYK, A., COIPAN, E.C., *et al.* (2017) Enzootic origins for clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 49, p. 48-54. [<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.030>]
- JONGEJAN, F., UILENBERG, G. (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* vol. 129 Suppl, p. S3-14. [<https://doi.org/10.1017/s0031182004005967>]
- KAHL, O., GRAY, J.S. (2023) The biology of *Ixodes ricinus* with emphasis on its ecology. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 14, n° 2, p. 102114. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102114>]
- KAPLI, P., YANG, Z., TELFORD, M.J. (2020) Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews. Genetics* vol. 21, n° 7, p. 428-444. [<https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>]
- KLAUS, C., GETHMANN, J., HOFFMANN, B., *et al.* (2016) Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany. *Parasitology Research* vol. 115, n° 7, p. 2729-2740. [<https://doi.org/10.1007/s00436-016-5022-5>]
- KLITGAARD, K., HØJGAARD, J., ISBRAND, A., *et al.* (2019) Screening for multiple tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks from birds in Denmark during spring and autumn migration seasons. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 10, n° 3, p. 546-552. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.01.007>]
- KURTENBACH, K., HANINCOVÁ, K., TSAO, J.I., *et al.* (2006) Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews. Microbiology* vol. 4, n° 9, p. 660-669. [<https://doi.org/10.1038/nrmicro1475>]
- LEJAL, E. (2020) La dynamique du Pathobiome des tiques, l'exemple d'*Ixodes ricinus*. Thèse de Doctorat en microbiologie, Université Paris-Est.
- LEPAGE, D. (2023) Avibase - listes d'oiseaux mondiales - France. In *Avibase - La base ornithologique mondiale*. [<https://avibase.bsc-eoc.org/checklist.jsp?lang=FR&p2=1&list=avibase&synlang=FR®ion=FR&version=text&lifelists=&highlight=0>] (consulté le 10/04/2023).
- LI, S., GILBERT, L., VANWAMBEKE, S.O., *et al.* (2019) Lyme disease risks in Europe under multiple uncertain drivers of change. *Environmental Health Perspectives* vol. 127, n° 6, p. 67010. [<https://doi.org/10.1289/EHP4615>]
- LINDSAY, L.R., BARKER, I.K., SURGEONER, G.A., *et al.* (1997) Duration of *Borrelia burgdorferi* infectivity in white-footed mice for the tick vector *Ixodes scapularis* under laboratory and field conditions in Ontario. *Journal of Wildlife Diseases* vol. 33, n° 4, p. 766-775. [<https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.4.766>]
- LITTMAN, M.P., GERBER, B., GOLDSTEIN, R.E., *et al.* (2018) ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 32, n° 3, p. 887-903. [<https://doi.org/10.1111/jvim.15085>]
- LITTMAN, M.P., GOLDSTEIN, R.E., LABATO, M.A., *et al.* (2006) ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *Journal of*

- Veterinary Internal Medicine* vol. 20, n° 2, p. 422-434. [[https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[422:asacso\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[422:asacso]2.0.co;2)]
- L'OBS (2014) Le calvaire des "lymés" - Psychose ou scandale sanitaire? *In L'obs*. [<https://www.nouvelobs.com/magazine/20141106.OBS4246/le-calvaire-des-lymes-psychose-ou-scandale-sanitaire.html>] (consulté le 14/11/2023).
- LOMBARD, J.E., PATTON, E.A., GIBBONS-BURGENER, S.N., *et al.* (2021) Human-to-cattle *Mycobacterium tuberculosis* complex transmission in the United States. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 8, p. 691192. [<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.691192>]
- MAC, S., BAHIA, S., SIMBULAN, F., *et al.* (2020) Long-term sequelae and health-related quality of life associated with Lyme disease: A systematic review. *Clinical Infectious Diseases* vol. 71, n° 2, p. 440-452. [<https://doi.org/10.1093/cid/ciz1158>]
- MAC, S., DA SILVA, S.R., SANDER, B. (2019) The economic burden of Lyme disease and the cost-effectiveness of Lyme disease interventions: A scoping review. *PloS One* vol. 14, n° 1, p. e0210280. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210280>]
- MADISON-ANTENUCCI, S., KRAMER, L.D., GEBHARDT, L.L., *et al.* (2020) Emerging tick-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 33, n° 2, p. e00083-18. [<https://doi.org/10.1128/CMR.00083-18>]
- MARGOS, G., GATEWOOD, A.G., AANENSEN, D.M., *et al.* (2008) MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 105, n° 25, p. 8730-8735. [<https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105>]
- MARGOS, G., VOLLMER, S.A., CORNET, M., *et al.* (2009) A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 75, n° 16, p. 5410-5416. [<https://doi.org/10.1128/AEM.00116-09>]
- MARGOS, G., VOLLMER, S.A., OGDEN, N.H., *et al.* (2011) Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 11, n° 7, p. 1545-1563. [<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022>]
- MARGOS, G., WILSKE, B., SING, A., *et al.* (2013) *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol. 63, n° Pt 11, p. 4284-4288. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.052001-0>]
- MARQUES, A.R. (2015) Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infectious Disease Clinics of North America* vol. 29, n° 2, p. 295-307. [<https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.005>]
- MARSOT, M., HENRY, P.-Y., VOURECH, 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? *International Journal for Parasitology* vol. 42, n° 8, p. 781-788. [<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.05.010>]
- MARSOT, M., SIGAUD, M., CHAPUIS, J.L., *et al.* (2011) Introduced Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus barberi*) harbor more-diverse *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies than native bank voles (*Myodes glareolus*). *Applied and Environmental Microbiology* vol. 77, n° 16, p. 5716-5721. [<https://doi.org/10.1128/AEM.01846-10>]
- MATHER, T.N., FISH, D., COUGHLIN, R.T. (1994) Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 205, n° 2, p. 186-188.
- MICHALIK, J., WODECKA, B., SKORACKI, M., *et al.* (2008) Prevalence of avian-associated *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *Ixodes ricinus* ticks collected from blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*). *International Journal of Medical Microbiology* vol. 298, p. 129-138. [<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.03.004>]
- MOODY, K.D., TERWILLIGER, G.A., HANSEN, G.M., *et al.* (1994) Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in *Peromyscus leucopus*. *Journal of Wildlife Diseases* vol. 30, n° 2, p. 155-161. [<https://doi.org/10.7589/0090-3558-30.2.155>]
- MTIEROVÁ, Z., DERDÁKOVÁ, M., CHVOSTÁČ, M., *et al.* (2020) Local population structure and seasonal variability of *Borrelia garinii* genotypes in *Ixodes ricinus* ticks, Slovakia. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 17, n° 10, p. 3607. [<https://doi.org/10.3390/ijerph17103607>]

- MYSTERUD, A., HEYLEN, D.J.A., MATTHYSEN, E., *et al.* (2019a) Lyme neuroborreliosis and bird populations in northern Europe. *Proceedings. Biological Sciences* vol. 286, n° 1903, p. 20190759. [<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0759>]
- MYSTERUD, A., STIGUM, V.M., JAARSMA, R.I., *et al.* (2019b) Genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* detected in 16 mammal species and questing ticks from northern Europe. *Scientific Reports* vol. 9, n° 1, p. 5088. [<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41686-0>]
- NEI, M., KUMAR, S. (2000) Molecular evolution and phylogenetics. New York, Oxford University Press.
- NORTE, A.C., ARAÚJO, P.M., AUGUSTO, L., *et al.* (2022) Effects of stress exposure in captivity on physiology and infection in avian hosts: no evidence of increased *Borrelia burgdorferi s.l.* infectivity to vector ticks. *Microbial Ecology* vol. 83, n° 1, p. 202-215. [<https://doi.org/10.1007/s00248-021-01738-3>]
- NORTE, A.C., MARGOS, G., BECKER, N.S., *et al.* (2020) Host dispersal shapes the population structure of a tick-borne bacterial pathogen. *Molecular Ecology* vol. 29, n° 3, p. 485-501. [<https://doi.org/10.1111/mec.15336>]
- OPPLER, Z.J., O'KEEFFE, K.R., MCCOY, K.D., *et al.* (2021) Evolutionary genetics of *Borrelia*. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 42, p. 97-112. [<https://doi.org/10.21775/cimb.042.097>]
- PALMEN, C., JAMBLIN, P., FLORKIN, B., *et al.* (2010) Le lymphocytome borrélien du lobe de l'oreille. *Archives de Pédiatrie* vol. 17, n° 8, p. 1159-1161. [<https://doi.org/10.1016/j.arcped.2010.05.004>]
- PÉREZ-EID, C. (2007) Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Paris, Éditions Tec & Doc.
- PISANU, B., CHAPUIS, J.-L., DOZIÈRES, A., *et al.* (2014) High prevalence of *Borrelia burgdorferi s.l.* in the European red squirrel *Sciurus vulgaris* in France. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 5, n° 1, p. 1-6. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.007>]
- QIU, W.-G., MARTIN, C.L. (2014) Evolutionary genomics of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: findings, hypotheses, and the rise of hybrids. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* vol. 27, p. 576-593. [<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.025>]
- RADOLF, J.D., STRLE, K., LEMIEUX, J.E., *et al.* (2021) Lyme disease in humans. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 42, p. 333-384. [<https://doi.org/10.21775/cimb.042.333>]
- RATAUD, A. (2022) Eco-épidémiologie du système Oiseaux-Tiques-*Borrelia*. Thèse de Doctorat en santé publique - épidémiologie, Maisons-Alfort.
- RATAUD, A., GALON, C., BOURNEZ, L., *et al.* (2022a) Diversity of tick-borne pathogens in tick larvae feeding on breeding birds in France. *Pathogens* vol. 11, n° 8, p. 946. [<https://doi.org/10.3390/pathogens11080946>]
- RATAUD, A., HENRY, P.-Y., MOUTAILLER, S., *et al.* (2022b) Research effort on birds' reservoir host potential for Lyme borreliosis: A systematic review and perspectives. *Transboundary and Emerging Diseases* vol. 69, n° 5, p. 2512-2522. [<https://doi.org/10.1111/tbed.14305>]
- RATTI, V., WINTER, J.M., WALLACE, D.I. (2021) Dilution and amplification effects in Lyme disease: Modeling the effects of reservoir-incompetent hosts on *Borrelia burgdorferi sensu stricto* transmission. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 12, n° 4, p. 101724. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101724>]
- RICHTER, D., ALLGÖWER, R., MATUSCHKA, F.-R. (2002) Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerging Infectious Diseases* vol. 8, n° 12, p. 1421-1425. [<https://doi.org/10.3201/eid0812.010519>]
- RICHTER, D., DEBSKI, A., HUBALEK, Z., *et al.* (2012) Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* vol. 12, n° 1, p. 21-27. [<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0668>]
- RICHTER, D., MATUSCHKA, F.-R. (2010) Elimination of lyme disease spirochetes from ticks feeding on domestic ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 76, n° 22, p. 7650-7652. [<https://doi.org/10.1128/AEM.01649-10>]

- RICHTER, D., SPIELMAN, A., KOMAR, N., *et al.* (2000) Competence of American robins as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *Emerging Infectious Diseases* vol. 6, n° 2, p. 133-138. [<https://doi.org/10.3201/eid0602.000205>]
- RILEY, L.W., BLANTON, R.E. (2018) Advances in molecular epidemiology of infectious diseases: Definitions, approaches, and scope of the field. *Microbiology Spectrum* vol. 6, n° 6. [<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0001-2018>]
- ROCHLIN, I., TOLEDO, A. (2020) Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review. *Journal of Medical Microbiology* vol. 69, n° 6, p. 781-791. [<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001206>]
- RUDENKO, N., GOLOVCHENKO, M., BELFIORE, N.M., *et al.* (2014) Divergence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* spirochetes could be driven by the host: diversity of *Borrelia* strains isolated from ticks feeding on a single bird. *Parasites & Vectors* vol. 7, p. 4. [<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-4>]
- SANTÉ PUBLIQUE FRANCE (2021) Borréliose de Lyme : données épidémiologiques 2020. In *Santé Publique France*. [<https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2021/borreliose-de-lyme-donnees-epidemiologiques-2020>] (consulté le 14/11/2023).
- SCHWARTZ, I., MARGOS, G., CASJENS, S.R., *et al.* (2021) Multipartite genome of Lyme disease *Borrelia*: structure, variation and prophages. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 42, p. 409-454. [<https://doi.org/10.21775/cimb.042.409>]
- SEIFERT, S.N., KHATCHIKIAN, C.E., ZHOU, W., *et al.* (2015) Evolution and population genomics of the Lyme borreliosis pathogen, *Borrelia burgdorferi*. *Trends in Genetics* vol. 31, n° 4, p. 201-207. [<https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.02.006>]
- SEPTFONS, A., COUTURIER, E., GORONFLOT, T., *et al.* (2018) Borréliose de Lyme : estimation de l'incidence hospitalière en France de 2005 à 2016. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* vol. 19-20, p. 389-95.
- SPILF (2006) Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives (Texte long). In *Ministère de la Santé et de la Prévention*. [https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/2006-lyme-long_2_.pdf] (consulté le 09/09/2023).
- STANEK, G., WORMSER, G.P., GRAY, J., *et al.* (2012) Lyme borreliosis. *Lancet* vol. 379, n° 9814, p. 461-473. [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60103-7)]
- STEERE, A.C., MALAWISTA, S.E., SNYDMAN, D.R., *et al.* (1977) Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis and Rheumatism* vol. 20, n° 1, p. 7-17. [<https://doi.org/10.1002/art.1780200102>]
- STEERE, A.C., STRLE, F., WORMSER, G.P., *et al.* (2016) Lyme borreliosis. *Nature Reviews. Disease Primers* vol. 2, p. 16090. [<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.90>]
- STEFANČIKOVÁ, A., STĚPÁNOVÁ, G., DERÁKOVÁ, M., *et al.* (2002) Serological evidence for *Borrelia burgdorferi* infection associated with clinical signs in dairy cattle in Slovakia. *Veterinary Research Communications* vol. 26, n° 8, p. 601-611. [<https://doi.org/10.1023/a:1020912618950>]
- STEWART, P.E., BYRAM, R., GRIMM, D., *et al.* (2005) The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* vol. 53, n° 1, p. 1-13. [<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.10.006>]
- SYKES, R.A., MAKIELLO, P. (2017) An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe†. *Journal of Public Health* vol. 39, n° 1, p. 74-81. [<https://doi.org/10.1093/pubmed/fdw017>]
- TAKANO, A., NAKAO, M., MASUZAWA, T., *et al.* (2011) Multilocus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human-pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 49, n° 5, p. 2035-2039. [<https://doi.org/10.1128/JCM.02544-10>]
- TARAGEL'OVÁ, V., KOČI, 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. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 74, n° 4, p. 1289-1293. [<https://doi.org/10.1128/AEM.01060-07>]
- TATUM, R., PEARSON-SHAVER, A.L. (2023) *Borrelia burgdorferi*. In *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532894/>].

- TELFORD, S.R., MATHER, T.N., MOORE, S.I., *et al.* (1988) Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 39, n° 1, p. 105-109. [<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.105>]
- TILLY, K., ROSA, P.A., STEWART, P.E. (2008) Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America* vol. 22, n° 2, p. 217-234. [<https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.013>]
- TØRNQVIST-JOHNSEN, C., DICKSON, S.-A., ROLPH, K., *et al.* (2020) First report of Lyme borreliosis leading to cardiac bradydysrhythmia in two cats. *JFMS Open Reports* vol. 6, n° 1, p. 2055116919898292. [<https://doi.org/10.1177/2055116919898292>]
- URSINUS, J., VRIJMOETH, H.D., HARMS, M.G., *et al.* (2021) Prevalence of persistent symptoms after treatment for lyme borreliosis: A prospective observational cohort study. *The Lancet Regional Health. Europe* vol. 6, p. 100142. [<https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100142>]
- VAISSIÈRE, E., THABUIS, A., COUTURIER, E. (2018) Surveillance de la borréliose de Lyme. CIRE Auvergne-Rhône-Alpes, *Bulletin de Veille Sanitaire* n° 2. [<https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/50325/1086827>]
- VOLLMER, S.A., BORMANE, A., DINNIS, R.E., *et al.* (2011) Host migration impacts on the phylogeography of Lyme Borreliosis spirochaete species in Europe. *Environmental Microbiology* vol. 13, n° 1, p. 184-192. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02319.x>]
- VOLLMER, S.A., FEIL, E.J., CHU, C.-Y., *et al.* (2013) Spatial spread and demographic expansion of Lyme borreliosis spirochaetes in Eurasia. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* vol. 14, p. 147-155. [<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.014>]
- VOORDOUW, M.J. (2015) Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* vol. 142, n° 2, p. 290-302. [<https://doi.org/10.1017/S0031182014001486>]
- VOORDOUW, M.J., LACHISH, S., DOLAN, M.C. (2015) The lyme disease pathogen has no effect on the survival of its rodent reservoir host. *PloS One* vol. 10, n° 2, p. e0118265. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118265>]
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., GÖBEL, U.B., *et al.* (1993) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 31, n° 2, p. 340-350. [<https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.340-350.1993>]
- WODECKA, B., KOLOMIETS, V. (2023) Genetic diversity of *Borreliaceae* species detected in natural populations of *Ixodes ricinus* ticks in Northern Poland. *Life* vol. 13, n° 4, p. 972. [<https://doi.org/10.3390/life13040972>]
- WOLCOTT, K.A., MARGOS, G., FINGERLE, V., *et al.* (2021) Host association of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: A review. *Ticks and Tick-Borne Diseases* vol. 12, n° 5, p. 101766. [<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101766>]
- WOOLHOUSE, M.E., DYE, C., ETARD, J.F., *et al.* (1997) Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 94, n° 1, p. 338-342. [<https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.338>]
- XIA, X. (2018) Maximum Parsimony method in phylogenetics. *In Bioinformatics and the Cell: Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and Transcriptomics*. Cham, Springer International Publishing, p. 327-341. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90684-3_14]
- YANG, Z., RANNALA, B. (2012) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews. Genetics* vol. 13, n° 5, p. 303-314. [<https://doi.org/10.1038/nrg3186>]
- ZHANG, K., QIN, Z., CHANG, Y., *et al.* (2019) Analysis of a flagellar filament cap mutant reveals that HtrA serine protease degrades unfolded flagellin protein in the periplasm of *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* vol. 111, n° 6, p. 1652-1670. [<https://doi.org/10.1111/mmi.14243>]

Annexe 1 : Espèces d'agents pathogènes et gènes ciblés par la puce microfluidique

Espèce d'agent pathogène ciblée	Gène ciblé
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>rpoB</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>rpoB</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>fla</i>
<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>ospA</i>
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>rpoB</i>
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>fla</i>
<i>Borrelia bissettii</i>	<i>rpoB</i>
<i>Borrelia miyamotoi</i>	<i>glpQ</i>
<i>Borrelia mayonii</i>	<i>fla</i>
<i>Borrelia bavariensis</i>	<i>pyrG</i>
<i>Borrelia</i> spp.	23S
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>msp1</i>
<i>Anaplasma platys</i>	<i>groEL</i>
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>msp2</i>
<i>Anaplasma ovis</i>	<i>msp4</i>
<i>Anaplasma centrale</i>	<i>groEL</i>
<i>Anaplasma bovis</i>	<i>groEL</i>
<i>Anaplasma</i> spp.	16S
<i>Ehrlichia</i> spp.	16S
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>gltA</i>
<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>groEL</i>
<i>Rickettsia conorii</i>	ITS
<i>Rickettsia slovaca</i>	ITS
<i>Rickettsia massiliae</i>	ITS
<i>Rickettsia helvetica</i>	ITS
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	ITS
<i>Rickettsia felis</i>	<i>orfB</i>
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>pap31</i>
<i>Bartonella</i> spp.	<i>ssrA</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>tul4</i>
Francisella-like endosymbionts	<i>fopA</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	IS1111
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>icd</i>
<i>Babesia microti</i>	CCTeta
<i>Babesia ovis</i>	18S
<i>Babesia canis</i>	3subspe_18S
<i>Babesia bovis</i>	CCTeta
<i>Babesia caballi</i>	<i>rap1</i>
<i>Babesia venatorum</i>	18S
<i>Babesia divergens</i>	<i>hsp70</i>
<i>Theileria</i> spp.	18S
Hepatozoon spp.	18S
<i>Ixodes ricinus</i>	ITS2
<i>Tique</i> spp.	16S
<i>Dermacentor reticulatus</i>	ITS2
<i>Babesia vulpes</i>	COI
<i>Escherichia coli</i>	<i>eae</i>

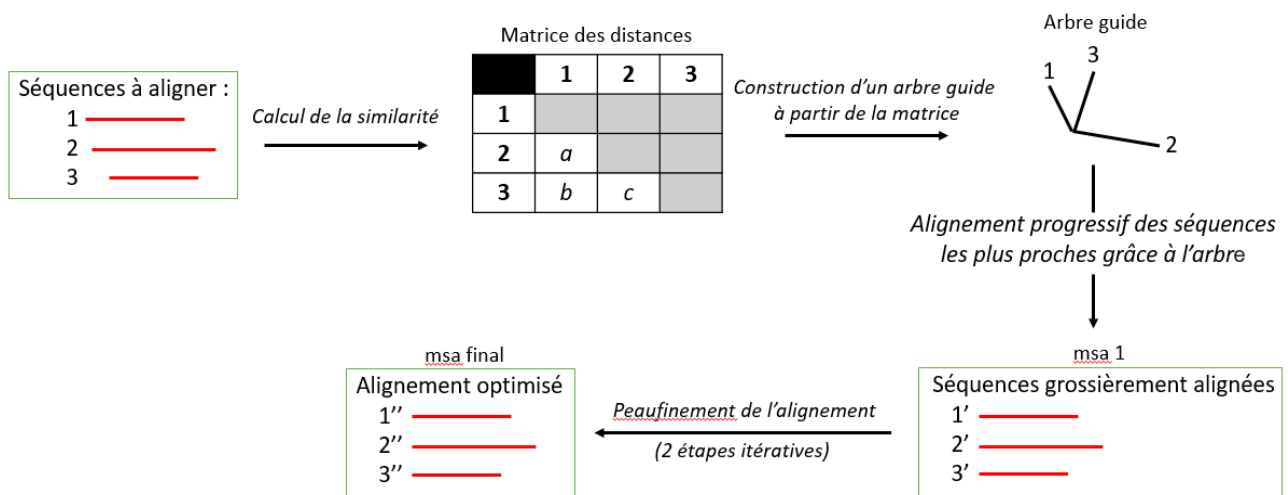
Annexe 2 : Amorces utilisées dans les protocoles de PCR de confirmation des espèces de *Borrelia*

F = Forward, R = Reverse, pb = paire de base, T = Température d'hybridation.

Genre d'agent pathogène	Gène cible	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	T
<i>Borrelia</i> spp.	<i>flaB</i>	FlaB280F	GCAGTTCARTCAGGTAACGG	645	55
		FlaRL	GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT		
		flaB_737F	GCATCAACTGTRGTTGTAACATTAACAGG	407	59
		FlaLL	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT		

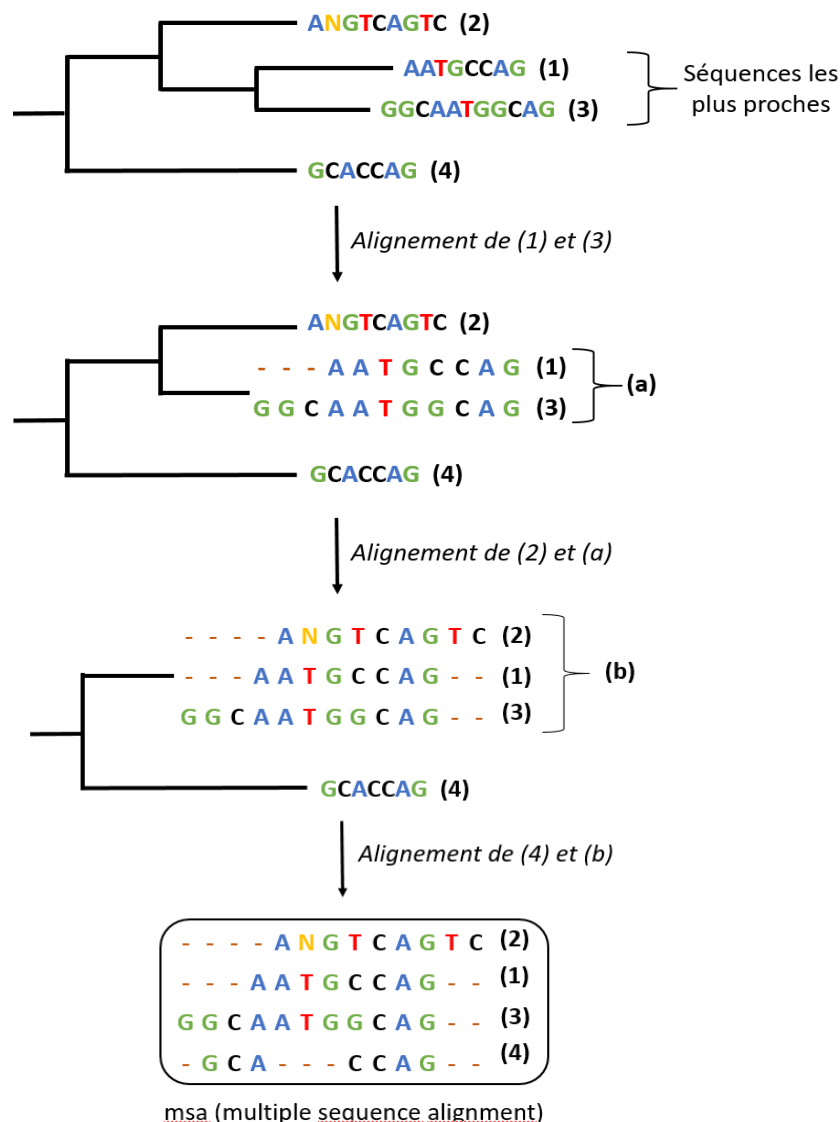
Annexe 3 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'algorithme Muscle, utilisé pour aligner l'ensemble des séquences et obtenir un msa (multiple sequence alignment)

1, 2, et 3 sont les séquences à aligner, et a, b et c, les distances respectives entre ces séquences. L'arbre guide est créé par la méthode de l'UPGMA, qui regroupe ensemble les séquences les plus proches grâce à la matrice des distances.



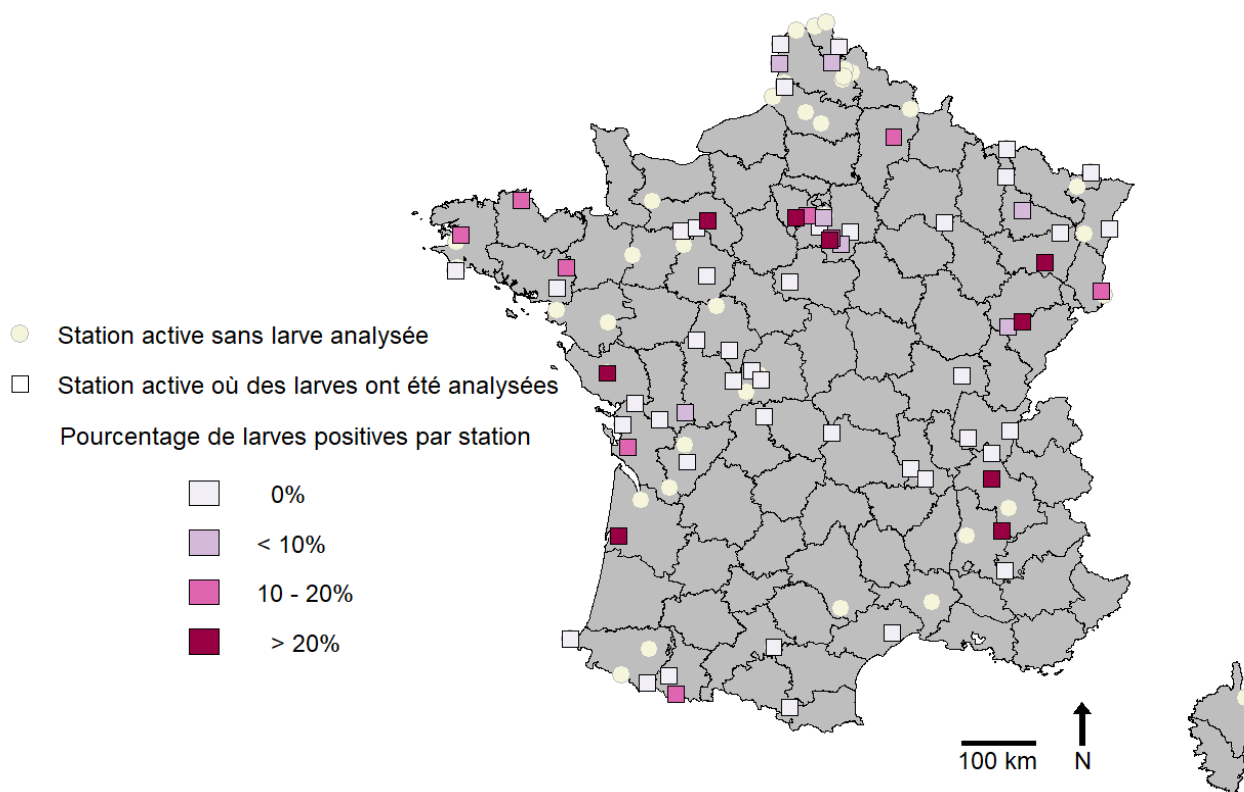
Annexe 4 : Alignement des séquences grâce à l'arbre guide, suite à la création de la matrice des distances permettant de déterminer le degré de proximité des différentes séquences

(1), (2), (3) et (4) sont les noms des 4 taxa (séquences génétiques) étudiés. (a) et (b) sont les noms donnés aux ensembles de séquences alignées, (a) et (b) constituent des nouveaux groupes qui vont pouvoir s'aligner avec les autres séquences en fonction de leur distance. La lettre N en jaune représente un nucléotide non informatif (peut être A, T, G ou C). Les tirets en marron représentent des lacunes dans l'alignement, ces lacunes correspondent soit à des insertions/délétions dans la séquence concernée, soit à des introductions artificielles (en début et/ou fin de séquence), afin que les séquences aient toutes la même longueur pour permettre la comparaison.



Annexe 5 : Carte présentant les pourcentages de larves positives à *B. garinii* en fonction des stations en France

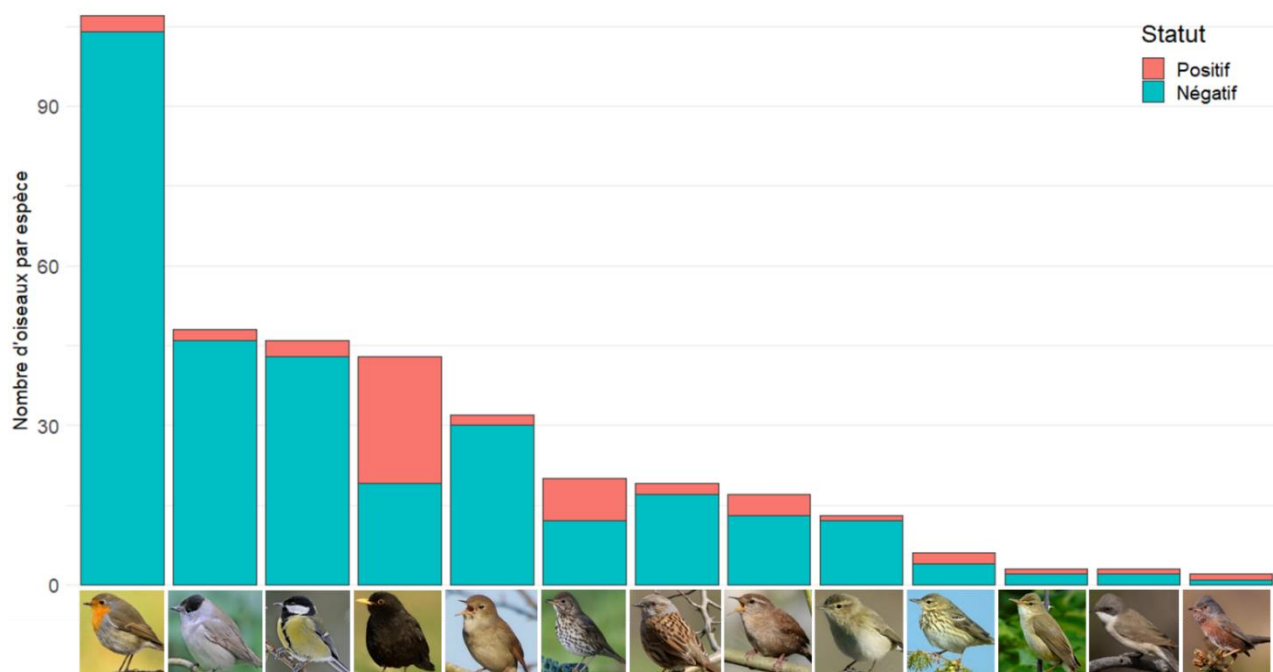
Les stations représentées sont les stations actives (ayant capturé des oiseaux) en 2019-2020.



Annexe 6 : Espèces d'oiseaux positives à *B. garinii*, et nombre d'individus porteurs de larves négatives et porteurs d'au moins une larve positive à *B. garinii* par espèce d'oiseau

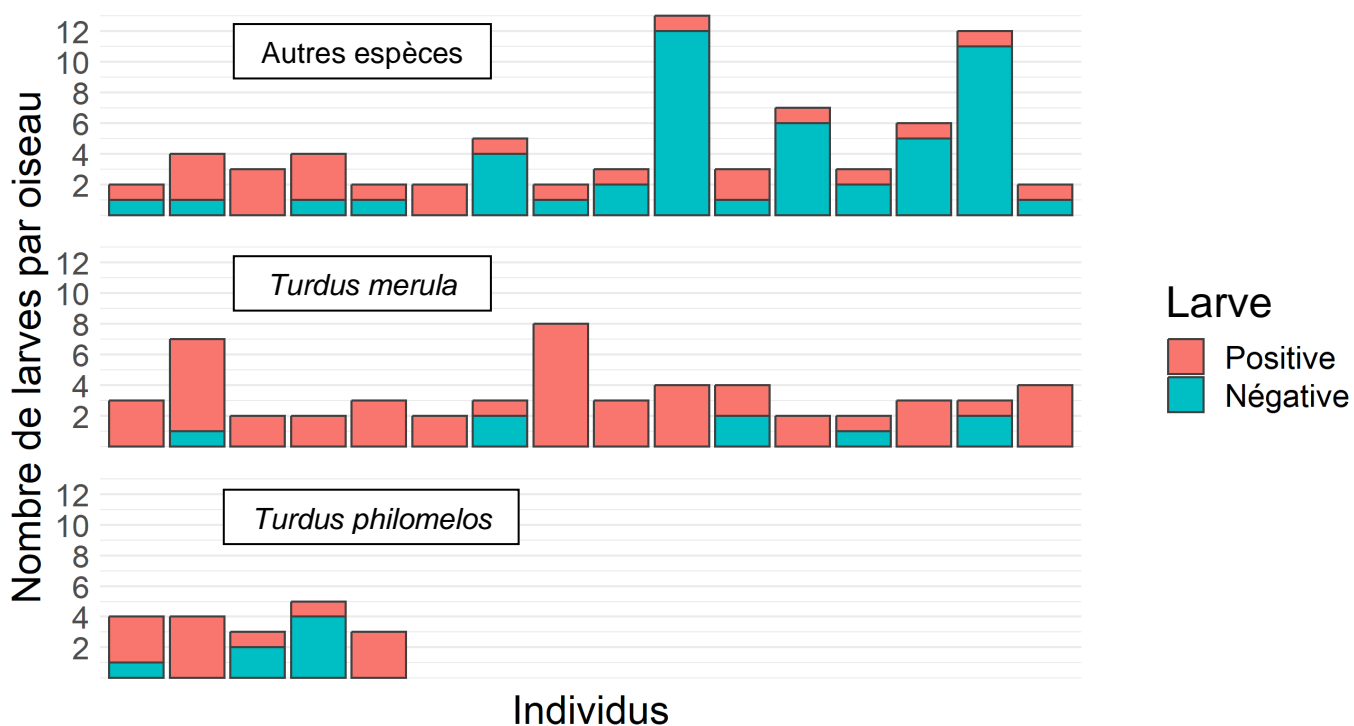
Les photographies en bas du graphique correspondent aux espèces d'oiseaux concernées, qui sont, de gauche à droite : Rougegorge familier (*Erithacus rubecula*), Fauvette à tête noire (*Sylvia atricapilla*), Mésange charbonnière (*Parus major*), Merle noir (*Turdus merula*), Rossignol philomèle (*Luscinia megarhynchos*), Grive musicienne (*Turdus philomelos*), Accenteur mouchet (*Prunella modularis*), Troglodyte mignon (*Troglodytes troglodytes*), Pouillot véloce (*Phylloscopus collybita*), Pipit des arbres (*Anthus trivialis*), Rousserolle verderolle (*Acrocephalus palustris*), Fauvette babillarde (*Curruca curruca*), Fauvette pitchou (*Curruca undata*).

Les photographies sont toutes issues du site oiseaux.net.



Annexe 7 : Nombre de larves positives et négatives à *B. garinii* par oiseau en fonction de l'espèce

Les oiseaux représentés ici sont les oiseaux pour lesquels au moins deux larves ont été analysées, et dont au moins une des larves était positive à *B. garinii* ($n = 37$). Chaque barre représente un individu. La catégorie « Autres espèces », inclut les individus issus des espèces présentées dans l'annexe précédente (Annexe 6), à l'exception du Merle noir et de la Grive musicienne.



PHYLOGÉNIE ET DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DE *BORRELIA GARINII* CHEZ DES OISEAUX COMMUNS EN FRANCE

AUTEUR : Margaux FRANÇOIS

RÉSUMÉ :

La maladie de Lyme est une maladie transmise à l'homme *via* la morsure d'une tique. Elle est due à un complexe de bactéries appartenant au genre *Borrelia*, appelé *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Bbsl*). Certaines formes graves de la maladie sont majoritairement causées par des espèces spécifiques au sein des *Bbsl* : *Borrelia garinii* est ainsi la bactérie majoritairement responsable de neuroborrélioses chez l'homme en Europe. Cette bactérie a pour réservoir les oiseaux. Le but de notre étude était d'étudier la diversité génétique et la répartition spatiale des *Bbsl* détectées chez des larves gorgées collectées sur des oiseaux en France, en se concentrant principalement sur *B. garinii*. Pour ce faire, nous avons utilisé les séquences génétiques de 96 *Bbsl* (dont 74 *B. garinii*), correspondant à un fragment du gène *flaB* de ces bactéries. Ces *Bbsl* provenaient de larves gorgées collectées sur des oiseaux capturés dans différents sites en France dans le cadre d'un projet précédent (OUTLYER). *B. garinii* était retrouvée dans toute la France. La matrice des distances génétiques montrait une grande proximité génétique entre les séquences étudiées. L'arbre phylogénétique construit par la méthode du maximum de parcimonie à partir des séquences des *Bbsl* et l'étude des métadonnées associées n'ont pas mis en évidence de regroupement de bactéries génétiquement proches (clades) pour le gène séquencé en fonction de l'espèce d'oiseau ou du milieu de vie de celui-ci. Aucune structure spatiale n'a été visualisée lors de l'étude de la répartition spatiale des *Bbsl* provenant des différents clades identifiés grâce à l'arbre phylogénétique : les *B. garinii* génétiquement proches pour le gène séquencé (*flaB*) ne semblaient pas être spatialement proches. Le gène séquencé (*flaB*) est un gène conservé au sein d'une espèce de *Bbsl*, ce qui explique la faible diversité génétique observée pour les séquences de *Bbsl* étudiées. De ce fait, il est probable que la diversité génétique observée dans cette étude pour le gène *flaB* ne reflète pas la diversité génétique existant entre les génomes des *Bbsl* étudiées. Il serait donc intéressant de reprendre cette étude en privilégiant un protocole permettant d'obtenir une plus grande variabilité génétique au sein des séquences étudiées.

MOTS CLÉS : PHYLOGÉNIE, ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE, *BBSL*, *BORRELIA GARINII*, OISEAUX, FRANCE, TIQUE.

JURY :

Président : Pr Radu BLAGA

Directrice de thèse : Dr Valentine GUÉTIN-POIRIER

Examineur : Dr Pascal ARNÉ

Invitées : Dr Maud MARSOT, Dr Laetitia CANINI

SPATIAL DISTRIBUTION AND PHYLOGENY OF *BORRELIA GARINII* FOUND IN COMMON BIRDS IN FRANCE

AUTHOR: Margaux FRANÇOIS

SUMMARY:

Lyme disease is a disease transmitted to humans *via* the bite of a tick. It is caused by a complex of bacteria belonging to the *Borrelia* genus, known as *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Bbsl*). Some severe forms of the disease are caused mainly by specific species within the *Bbsl* family: *Borrelia garinii* is the bacterium most often responsible for neuroborreliosis in humans in Europe. Its reservoir is birds. The aim of our study was to investigate the genetic diversity and spatial distribution of *Bbsl* detected in gorged larvae collected from birds in France, focusing mainly on *B. garinii*. To do this, we used the genetic sequences of 96 *Bbsl* (including 74 *B. garinii*), corresponding to a fragment of the *flaB* gene of these bacteria. These *Bbsl* were found in gorged larvae collected from birds captured at various sites in France as part of a previous project (OUTLYER). *B. garinii* was found throughout France. The genetic distance matrix showed close genetic proximity between the sequences studied. The phylogenetic tree constructed using the maximum parsimony method from the *Bbsl* sequences and the study of the associated metadata did not reveal any grouping of genetically close bacteria (clades) for the sequenced gene according to bird species or environment. No spatial structure was visualized when studying the spatial distribution of *Bbsl* from the different clades identified using the phylogenetic tree: *B. garinii* genetically close for the sequenced gene (*flaB*) did not appear to be spatially close. The gene sequenced (*flaB*) is a housekeeping gene, often used to identify different *Bbsl* species. As such, this gene is conserved within a species, which explains the low genetic diversity observed for the *Bbsl* sequences studied. It is therefore possible that the genetic diversity observed in this study for the *flaB* gene does not reflect the genetic diversity existing between the *Bbsl* genomes studied. It would therefore be interesting to repeat this study, giving preference to a protocol which would allow to obtain greater genetic variability between the sequences studied.

KEYWORDS: PHYLOGENY, PHYLOGENETIC TREE, *BBSL*, *BORRELIA GARINII*, BIRDS, FRANCE, TICKS.

JURY:

Chairperson: Pr Radu BLAGA

Thesis Director: Dr Valentine GUÉTIN-POIRIER

Reviewer: Dr Pascal ARNÉ

Guests: Dr Maud MARSOT, Dr Laetitia CANINI