



HAL
open science

Explorer les indicateurs potentiels chez le chevreuil pour étudier et surveiller la circulation des agents pathogènes transmis par les tiques à risque pour l'humain

Cassandra Julienne

► To cite this version:

Cassandra Julienne. Explorer les indicateurs potentiels chez le chevreuil pour étudier et surveiller la circulation des agents pathogènes transmis par les tiques à risque pour l'humain. Santé. 2024. dumas-04930871

HAL Id: dumas-04930871

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04930871v1>

Submitted on 5 Feb 2025

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.

VetAgro Sup

Mémoire de fin d'études d'ingénieur

Explorer les indicateurs potentiels chez le chevreuil pour étudier et surveiller la circulation des agents pathogènes transmis par les tiques à risque pour l'humain

Cassandra JULIENNE
Option Agriculture Environnement Santé et Territoires
Années 2023-2024



labo.vosges.fr
animé par le Département



« L'étudiant conserve la qualité d'auteur ou d'inventeur au regard des dispositions du code de la propriété intellectuelle pour le contenu de son mémoire et assume l'intégralité de sa responsabilité civile, administrative Formation d'ingénieur – Programme Semestre 10 – 2023-2024 22 et/ou pénale en cas de plagiat ou de toute autre faute administrative, civile ou pénale. Il ne saurait, en cas, seul ou avec des tiers, appeler en garantie VetAgro Sup. »

REMERCIEMENTS

A Monsieur Benoît COMBES, Directeur de l'ELIZ

Pour m'avoir acceptée dans ce domaine très spécifique qu'est l'étude des maladies à tiques, pour m'avoir donné la possibilité de réaliser mes analyses jusqu'au bout malgré les imprévus (souvent nombreux), pour une réelle collaboration dans ce projet et pour tous les débats passionnants autour des risques sanitaires, des choix socio-politiques et juste de la folie humaine, je souhaite vous remercier très sincèrement. Vous avez apporté une dimension humaine à ce stage qui, soyez-en sûr, a été très apprécié de ma part. Merci pour tout.

A Monsieur Matthieu BASTIEN, tuteur scientifique et technique de ce stage

Je tiens à te remercier très chaleureusement pour ta présence indéfectible à la moindre question et ton soutien face à tous les obstacles rencontrés. Merci d'avoir cru en ce stage jusqu'à la fin, même si ça n'a pas été de tout repos. Merci pour tes nombreuses relectures et tes commentaires toujours à propos. C'était un vrai plaisir de collaborer avec toi. Merci énormément.

A Madame Stéphanie FLAVIER, technicienne et secrétaire de l'ELIZ

Pour tous les petits moments de détente et les pauses gourmandes qui ont contribué à faire descendre la pression, je tiens à te remercier sincèrement. Et merci à Linotte pour les balades postprandiales.

A Madame Emmanuelle GILOT-FROMONT, enseignante chercheuse à VetAgro Sup qui a accepté d'être ma tutrice pédagogique durant ce stage. Je vous remercie pour votre rigueur quant aux analyses réalisées et pour votre exigence quant aux points qui se devaient d'être rectifiés. Merci pour vos relectures de derniers moments et vos commentaires toujours très pertinents.

A Monsieur Benoît JEANTROUX, directeur du LVD88

Je tiens à remercier le Laboratoire Départemental Vétérinaire des Vosges de m'avoir accueillie dans leurs locaux et d'avoir partagé avec moi toutes leurs astuces dans les manipulations. Merci à tous les collègues pour leur grande convivialité.

Je souhaite également remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger : Florence AYRAL, Camille BONNET, Thierry BOULINIER, Laure BOURNEZ, Jonas DURAND, Eva FAURE, Julie FIGONI, Raphaëlle METRAS, Valentin OLLIVIER, Alain VIRY et Clémence GALON qui a réalisé la PCR microfluidique.

Merci à tous mes proches, avec tendresse.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ANNEXES	1
TABLE DES FIGURES	2
TABLE DES TABLEAUX.....	3
LISTE DES ABBREVIATIONS	4
INTRODUCTION	5
PARTIE 1. CONTEXTE	6
1. ZOONOSES ET SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE.....	6
1.1. <i>Surveillance et veille sanitaire</i>	6
1.2. <i>Cas de la borréliose de Lyme</i>	7
1.3. <i>Plan de lutte et programmes de recherche autour de la maladie de Lyme</i>	8
2. LES TIQUES, VECTRICES DE MALADIES	10
2.1. <i>Généralités sur les tiques</i>	10
2.2. <i>Cycle de vie d’Ixodes ricinus</i>	10
2.3. <i>Principales clés de détermination morphologique</i>	11
2.4. <i>Choix des hôtes et mécanismes d’acquisition/transmission des agents pathogènes</i>	
12	
2.4.1. Recherche et sélection des hôtes par <i>I. ricinus</i>	12
2.4.2. Acquisition et transmission des agents pathogènes.....	13
2.4.3. Transmission de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato, l’agent pathogène de la maladie de Lyme	14
3. LA FAUNE SAUVAGE COMME UN INDICATEUR DANS LE SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE DES RISQUES	
SANITAIRES CHEZ L’HUMAIN	15
3.1. <i>Définition et critères de choix d’un indicateur</i>	15
3.2. <i>Le chevreuil, un hôte particulier d’<i>I. ricinus</i></i>	16
4. PROBLEMATIQUE ET QUESTIONS DE RECHERCHE	16
PARTIE 2. MATERIELS ET METHODES	19
1. IDENTIFICATION DES DONNEES DISPONIBLES	19
1.1. <i>Données et prélèvements issus de la thèse de V. Ollivier (2023)</i>	19
1.2. <i>Données du réseau Sentinelles (Santé Publique France)</i>	19
1.3. <i>Données CiTIQUE au niveau départemental</i>	19
1.4. <i>Fédérations Départementales des Chasseurs</i>	20
1.4.1. Sérums de chevreuils	20
1.4.2. Tableau de chasse.....	20
2. SELECTION DES DONNEES ET METHODES UTILISEES.....	20
2.1. <i>Influence des populations de chevreuils sur les populations de tiques</i>	20
2.1.1. Infestation par les tiques et domaine vital.....	20
2.1.2. Impact des populations de chevreuil sur le nombre de tiques piqueuses chez l’humain.....	22
2.1.3. Impact des populations de chevreuils et de tiques sur l’incidence humaine	22
2.2. <i>Les agents pathogènes des tiques chez le chevreuil et chez l’humain</i>	22
2.2.1. Identification des tiques des chevreuils de la Meuse.....	22
2.2.2. Broyage des tiques et extraction ADN	24
2.2.3. PCR sur puce microfluidique.....	24
2.2.4. Comparaison avec données CiTIQUE	24
2.3. <i>Séroprévalence de <i>Bbsl</i> chez les chevreuils comme proxy de l’incidence humaine</i> 24	
2.3.1. Test ELISA.....	25
2.3.2. Calcul du seuil de séropositivité.....	25
PARTIE 3. RESULTATS.....	26
1. LES POPULATIONS DE CHEVREUIL COMME INDICATEUR DU RISQUE	26

1.1.	<i>Charge en tiques du chevreuil.....</i>	26
1.1.1.	Domaine vital du chevreuil.....	26
1.2.	<i>Piqûres de tiques chez l'humain et abondance relative des chevreuils</i>	27
1.3.	<i>Incidence de la maladie de Lyme chez les humains et abondance relative des chevreuils</i>	28
2.	LES TIQUES COMME INDICATEUR DU RISQUE.....	28
2.1.	<i>Agents pathogènes détectés chez les tiques de la Meuse.....</i>	28
2.2.	<i>Prévalence et niveau d'engorgement.....</i>	29
2.2.1.	Comparaison entre nymphes gorgées et non gorgées pour la présence de <i>R. helvetica</i>	29
3.	LA SEROPREVALENCE COMME INDICATEUR DU RISQUE	29
3.1.	<i>Séroprévalence chez le chevreuil et incidence humaine</i>	29
3.2.	<i>Séroprévalence chez les chevreuils et abondance relative de leurs populations....</i>	32
PARTIE 4. DISCUSSION		33
1.	ETAT DE L'ART	33
2.	LIMITES DU PROJET	33
2.1.	<i>Participation des départements.....</i>	33
2.2.	<i>ADN dégradé extrait des tiques.....</i>	33
3.	LES POPULATIONS DE CHEVREUILS, UN INDICATEUR DU RISQUE ?	34
3.1.	<i>Abondance relative des populations de chevreuils.....</i>	34
3.1.1.	En fonction du nombre de signalement de piqûres humaines.....	34
3.1.2.	En fonction du taux d'incidence humaine au niveau régional	35
4.	LES TIQUES DES CHEVREUILS, UN INDICATEUR PERTINENT ?	35
4.1.	<i>Broyage et extraction d'ADN extrait des tiques</i>	35
5.	L'APPROCHE SEROLOGIQUE, PERTINENCE DE L'INDICATEUR DU RISQUE	36
5.1.	<i>Sérothèque et test ELISA</i>	36
5.2.	<i>Comparaison avec taux d'incidence humaine, comparabilité des échelles et année « exceptionnelle »</i>	38
5.3.	<i>Comparaison de la séroprévalence des chevreuils et de leur abondance relative..</i>	40
6.	RESUME DES REPONSES AUX QUESTIONS DE RECHERCHE	41
CONCLUSION		42
BIBLIOGRAPHIE.....		44
ANNEXES		53

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1. CARTE DE SCORE DES HABITATS FAVORABLES A LA TIQUE IXODES RICINUS EN FRANCE METROPOLITAINE (LEBERT ET AL., 2022).....	53
ANNEXE 2. COMPARAISON DE LA SEROPREVALENCE DES CHEVREUILS AUX CAS HUMAINS DE BBSL EN FRANCE METROPOLITAINE AU NIVEAU REGIONAL SUR LA PERIODE 2019-2022 (ELIZ, 2023)	54
ANNEXE 3. PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN DES TIQUES IDENTIFIEES AVEC LE KIT MACHERY-NAGEL (4 PAGES)	58
ANNEXE 4. PROTOCOLE DU TEST ELISA POUR LA DETECTION DE BBSL DANS LES SERUMS DE CHEVREUILS (4 PAGES)	62

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1. ESTIMATION DU TAUX ANNUEL MOYEN DE LA BORRELIOSÉ DE LYME, FRANCE METROPOLITAINE, 2017 – 2021 (SANTÉ PUBLIQUE FRANCE, 2021).....	8
FIGURE 2. CARTOGRAPHIE DU RISQUE DE PIQURE DE TIQUES INFECTÉES EN FRANCE METROPOLITAINE (CITIQUE, 2020)	9
FIGURE 3. CYCLE DE VIE DES TIQUES ET TRANSMISSION DE BORRELIA A L'HUMAIN (© ENCYCLOPÆDIA UNIVERSALIS FRANCE, 2024)	11
FIGURE 4. SCHEMA DE LA STRUCTURE D'UNE TIQUE DURE (MEHLHORN, ENCYCLOPÆDIC REFERENCE OF PARASITOLOGY 2001)	11
FIGURE 5. SCHEMA D'UNE TIQUE DU GENRE IXODES AVEC LE MALE A GAUCHE ET LA FEMELLE A DROITE (PEREZ-EID, 2007)	12
FIGURE 6. DISTRIBUTION CONNUE D'I. RICINUS EN EUROPE (EFSA, 2023)	14
FIGURE 7. COMPARAISON DES PROPORTIONS DE CHEVREUILS SEROPOSITIFS AVEC L'ÉVOLUTION DE L'INCIDENCE HUMAINE SUR LA PÉRIODE 2020-2022 (ELIZ, 2023)	17
FIGURE 8. CARTOGRAPHIE DES CHEVREUILS SÉLECTIONNÉS ALÉATOIREMENT SUR LE DÉPARTEMENT DE LA MEUSE	21
FIGURE 9. PHOTOGRAPHIES D'I. RICINUS ET SES CLES DE DÉTERMINATION (© CASSANDRA JULIENNE)	23
FIGURE 10. PHOTOGRAPHIE EN FACE DORSALE DE L'ESPECE DERMACENTOR RETICULATUS (© OCEANE CLAUDE)	23
FIGURE 11. PRINCIPE ELISA PAR MÉTHODE DE DÉTECTION INDIRECTE (OLLIVIER, 2023)	25
FIGURE 12. DISTRIBUTION DE LA CHARGE EN TIQUES DES CHEVREUILS DE LA MEUSE	26
FIGURE 13. CHARGE EN TIQUES PAR CHEVREUIL (LOG) EN FONCTION DU POURCENTAGE DE FORÊT DE LEUR DOMAINE VITAL (MEUSE)	27
FIGURE 14. NOMBRE DE SIGNALEMENTS DE PIQURES DE TIQUES CHEZ L'HUMAIN EN FONCTION DE L'ABONDANCE RELATIVE DES CHEVREUILS POUR LES DÉPARTEMENTS DE LA CREUSE, DU JURA ET DU NORD (2017-2023)...	27
FIGURE 15. TAUX D'INCIDENCE HUMAINE EN FONCTION DE L'ABONDANCE RELATIVE DES CHEVREUILS (FRANCHE-COMTE/JURA, 2015-2023)	28
FIGURE 16. INCIDENCE HUMAINE EN FONCTION DE LA SEROPRÉVALENCE DES CHEVREUILS (JURA, CREUSE, NORD)	30
FIGURE 17. SEROPRÉVALENCE DES CHEVREUILS DE LA CREUSE, DU JURA ET DE NORD EN FONCTION DE L'INCIDENCE HUMAINE AU NIVEAU RÉGIONAL	31
FIGURE 18. SEROPRÉVALENCE DES CHEVREUILS DE LA CREUSE, DU JURA ET DU NORD EN FONCTION DE L'ABONDANCE DE LEUR POPULATION	32

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. QUESTIONS DE RECHERCHE ABORDEES POUR REpondre A LA PROBLEMATIQUE	18
TABLEAU 2. INFORMATIONS DE LA BASE DE DONNEES CHEVREUIL CONCERNANT CHAQUE INDIVIDU CHEVREUIL	19
TABLEAU 3. LISTE DES AGENTS PATHOGENES IDENTIFIES DANS LES EXTRAITS D'ADN DE TIQUES (MEUSE).....	29
TABLEAU 4. ENGORGEMENT DES NYMPHES SELON L'ABSENCE OU LA PRESENCE DE R. HELVETICA	29
TABLEAU 5. PART DES SEROPREVALENCES DE BBSL CHEZ LES CHEVREUILS ET SUPERFICIE FORESTIERE DES DEPARTEMENTS ETUDIES.....	36
TABLEAU 6. INTERPRETATION DE L'ANALYSE SEROLOGIQUE	38
TABLEAU 7. REPOSES RESUMEEES AUX HYPOTHESES PAR QUESTION DE RECHERCHE	41

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

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

Bbsl : *Borrelia burgdorferi sensu lato*

CiTIQUE : Des citoyens et des tiques

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

COVARS : Comité de Veille et d'Anticipation des Risques Sanitaires

DO : Densité Optique

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

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

ERZ : Entente interdépartementale de lutte contre la Rage et autres Zoonoses

FDC : Fédérations départementales des Chasseurs

IAHP : Influenza Aviaire Hautement Pathogène

IGN : Institut National de l'Information Géographique et Forestières

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

Inserm : l'Institut national de la santé et de la recherche médicale

LDV : Laboratoire Départemental Vétérinaire

OFB : Office français de la biodiversité

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

SIG : Système d'Information Géographique

SPF : Santé Publique France

TBEv : virus de l'encéphalite à tique (tick-born encephalitis virus)

UMR BIPAR : Unité Mixte de Recherche Biologie et immunologie parasitaire

INTRODUCTION

A l'échelle mondiale, les tiques sont vectrices d'un grand nombre de zoonoses, se classant au premier rang des vecteurs arthropodes pour les maladies animales et au deuxième pour celles humaines (Mansfield et al., 2017). Présentes sur tous les continents, les tiques colonisent à la fois des écosystèmes forestiers jusqu'en moyenne montagne, des habitats prairiaux ou encore domestiques avec les jardins. Elles peuvent transmettre des bactéries, des virus et des protozoaires à un large panel d'hôtes (reptiles, oiseaux, mammifères dont les humains), représentant ainsi un véritable risque pour la santé publique (de la Fuente et al., 2008 ; McCoy et Boulanger, 2015). En France, la maladie à tiques la plus courante est la borréliose de Lyme. Elle est causée par une bactérie du complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato*, transmise par piquûre d'une tique dure *Ixodes ricinus*. Actuellement, il existe peu de moyens de lutter contre cette bactérie, d'où l'importance pour la recherche de se focaliser sur le vecteur en question, de mieux comprendre son mode de vie et ses interactions avec les différents hôtes. Cependant, bien qu'il existe des outils pour estimer le risque de contamination humaine en prenant en compte la densité locale des tiques infectées, il existe très peu de surveillance de ces populations d'acariens. L'objectif pourrait être alors de déterminer des indicateurs permettant de prédire au mieux et le plus simplement possible les risques associés aux tiques. Une piste de réflexion envisagée est l'utilisation du chevreuil comme marqueur de ce risque puisqu'il partage le même habitat que les tiques qu'il abrite abondamment, qu'il est facile à prélever du fait de sa gestion cynégétique et puisqu'on y détecte l'agent pathogène. L'Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses (ELIZ), structure d'accueil pour ce stage de fin d'études, joue un rôle crucial dans cette recherche.

Fondée en 1973 sous le nom d'Entente interdépartementale de lutte contre la Rage et autres Zoonoses (ERZ) et renommée en 2012, l'ELIZ est une collectivité territoriale travaillant avec plusieurs départements adhérents. Elle assure le suivi épidémiologique des populations d'animaux vecteurs de zoonoses et met en œuvre des plans d'action de lutte pour prévenir les risques d'exposition humaine aux agents pathogènes. L'ELIZ est également active dans la vulgarisation scientifique et la sensibilisation du grand public. Elle a mené divers programmes sur des maladies telles que la rage, l'échinococcose alvéolaire, la leptospirose, les maladies virales tropicales transmises par le moustique tigre (dengue, chikungunya) ou encore la borréliose de Lyme, avec la participation volontaire et le financement des collectivités départementales adhérentes. Actuellement, une vingtaine de départements participent au programme associé à ce stage de fin d'études. Une partie de ce stage a été réalisée au Laboratoire Départemental Vétérinaire des Vosges à Epinal (LDV88).

Ce mémoire a pour objectif **d'explorer les indicateurs potentiels chez le chevreuil pour étudier et surveiller la circulation des agents pathogènes transmis par les tiques et pouvant conférer un risque pour l'être humain**, en particulier la circulation de l'agent pathogène de la borréliose de Lyme.

La première partie présentera le contexte actuel autour de l'agent pathogène de cette maladie et de son vecteur. Cette même partie développera également la problématique et les pistes de recherche envisagées pour atteindre cet objectif. La partie suivante exposera les matériels et méthodes que nous avons choisis de mettre en place. Enfin, les résultats seront présentés et discutés, puis suivis d'une conclusion.

PARTIE 1. CONTEXTE

La fragmentation des habitats naturels liée à l'activité anthropique expose les humains à une menace croissante : celle des agents pathogènes naturellement présents dans la nature. En outre, la montée en flèche de l'antibiorésistance, les changements climatiques globaux et le déclin de la biodiversité contribuent à fragiliser davantage notre système de santé. Cette confluence de facteurs crée un environnement propice à la propagation des maladies, amplifiant les risques sanitaires à des niveaux sans précédent (Fontenille et al., 2009).

Selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), un risque sanitaire peut être défini comme étant « la probabilité de survenue des effets néfastes d'un danger sur la santé » (Anses, 2022a). Ce risque peut s'exprimer sous la forme d'une infection, d'une intoxication, d'une maladie chronique ou d'une atteinte physique. Il dépend de plusieurs facteurs tels que la voie de contamination (inhalation, ingestion ou par contact) mais résulte également du niveau d'exposition subi, de sa fréquence et de sa durée. Parmi les dangers recensés, on distingue les dangers chimiques (solvants, métaux lourds, composés organiques volatils, etc.), nucléaires (irradiations) ou encore biologiques (agents infectieux, toxines, etc.). Les agents biologiques que l'humain peut rencontrer sont multiples, on trouve notamment les virus, les bactéries, les protozoaires, les champignons et levures, les algues, les helminthes ou encore les prions (Bonnard, 2001). Parmi ces agents biologiques, seulement certains sont pathogènes et représentent un danger. Lorsqu'ils acquièrent la capacité de se transmettre de l'animal à l'être humain et inversement, ils génèrent alors des maladies zoonotiques ou zoonoses (Anses, 2022b).

1. Zoonoses et surveillance épidémiologique

1.1. Surveillance et veille sanitaire

Face à ces menaces persistantes, l'histoire est marquée par de nombreuses crises épidémiques : peste, typhus, variole, sida, Ebola ou plus récemment Covid-19, autant d'épidémies dont les conséquences sanitaires ont été particulièrement sévères (Dedet, 2020). Il a fallu attendre la fin du 19^{ème} siècle pour voir l'arrivée de la surveillance épidémiologique avec William Farr, médecin épidémiologiste considéré comme le précurseur de celle que l'on connaît aujourd'hui (Dab, 2021). Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : « L'épidémiologie est l'étude de la distribution et de la fréquence des maladies et de ses déterminants. » (Vaughan et al., 1991). Face à cette recrudescence, émergence ou réémergence de zoonoses établies et/ou potentielles, la surveillance épidémiologique revêt donc une importance non négligeable qui pourrait s'avérer cruciale. Pour mieux organiser et faire évoluer la surveillance épidémiologique existante, le Comité de Veille et d'Anticipation des Risques Sanitaires (COVARIS) a été créé en 2022. Institué par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, et par le ministère de la Santé et de la Prévention (Ministère du travail, de la santé et des solidarités, 2024), cette organisation vise à anticiper, alerter et intervenir précocement lorsque des épidémies émergent. Le COVARIS est donc amené à proposer des dispositifs d'anticipation et de veilles sanitaires et à les renforcer en temps de crises. Ces dispositifs permettent de déceler tout événement peu commun ou anormal susceptible de présenter un risque pour les santés humaine, animale ou végétale. Ce fut notamment le cas avec l'épidémie d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) qui a conduit à l'abattage préventif de plus de 20 millions de volailles en 2021-2022 (Ministère du travail, de la santé et des

solidarités, 2023). L'année suivante, un avis a été transmis aux autorités nationales sur le risque sanitaire de grippe aviaire lié à l'IAHP et comment s'en prémunir (COVARS, 2023).

Plus récemment, le COVARS a mis à disposition une grille de lecture des risques infectieux, basée sur l'étude et l'analyse des cartographies de risques réalisées par les organismes français de santé et de recherche. Trente-cinq maladies infectieuses ont pu être identifiées dont certaines susceptibles de générer une situation sanitaire exceptionnelle dans les cinq prochaines années. Le COVARS conclut sur l'importance de croiser les disciplines et d'intégrer des axes de recherches intersectoriels pour une meilleure prévention des risques. Etant donné que les trois quarts des maladies infectieuses sont d'ordre zoonotique, il est impératif d'identifier ces agents pathogènes et leurs vecteurs potentiels afin d'améliorer la surveillance, l'analyse et la prévision de ces risques (COVARS, 2024).

1.2. Cas de la borréliose de Lyme

En France, un grand nombre d'espèces sauvages peuvent servir de réservoir¹ pour des agents zoonotiques, offrant ainsi une voie possible d'infection pour l'être humain (Fontenille et al., 2009). Parmi les maladies transmises par ces agents, on peut citer l'échinococcose alvéolaire, la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, la leptospirose ou encore la borréliose de Lyme (McCoy et Boulanger, 2015). Cette dernière représentait près de 47 000 cas diagnostiqués sur l'année 2021 (Santé Publique France, 2023) avec une incidence en nette augmentation d'après l'Institut Pasteur², la plaçant désormais en priorité de santé publique. Cette maladie est due au complexe de bactéries spirochètes *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Bbsl*) transmis par piqûres de tiques infectées.

Actuellement, aucun vaccin n'a obtenu d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour prévenir la borréliose chez l'humain. Un tel vaccin répondant à des normes de sécurité strictes (peu d'effets secondaires), offrant une meilleure efficacité, à faible coût et largement accepté par le public n'a pas encore été développé (Aenishaenslin et al., 2014). Le seul moyen de se prémunir du risque de ces transmissions est donc d'agir directement sur le risque de piqûre de tique. Bien que des produits acaricides aient été mis au point, leur utilisation n'a pas permis de réduire les piqûres de tiques ni la transmission des maladies associées (Eisen et Stafford, 2020). Les seules mesures de protections existantes sont dites mécaniques avec l'utilisation de vêtements couvrants. Il est également recommandé de repérer le plus tôt possible les tiques après exposition pour les extraire à l'aide d'une pince et diminuer ainsi la probabilité de transmission d'un agent pathogène (Boulanger et al., 2018 ; Beck et al., 2022).

¹ Un réservoir est un ensemble de populations dans un environnement donné dans lesquelles un agent pathogène se maintient de façon permanente et où l'infection est transmise à une population cible définie. L'existence d'un réservoir est confirmée lorsque l'infection ne peut plus persister après que toutes les transmissions entre populations cible et non-cible ont été éliminées (Haydon et al., 2002).

² <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/maladie-lyme-borreliose-lyme>

1.3. Plan de lutte et programmes de recherche autour de la maladie de Lyme

Un plan national de lutte contre la maladie de Lyme et les maladies transmissibles par les tiques a été lancé en 2016 par le ministère de la Santé. Grâce au développement et à l'apport de connaissances autour de cette maladie, ce plan vise à améliorer les mesures de lutte et de prise en charge des patients mais aussi à concrétiser la mise en place de mesures de prévention (Ministère des affaires sociales et de la santé, 2016). En 2021, Santé Publique France a publié les données annuelles de surveillance de la borréliose de Lyme pour illustrer la disparité régionale des taux d'incidence humaine (nombre de cas pour 100 000 habitants) et caractériser ainsi l'exposition à la borréliose de Lyme (**Figure 1**).

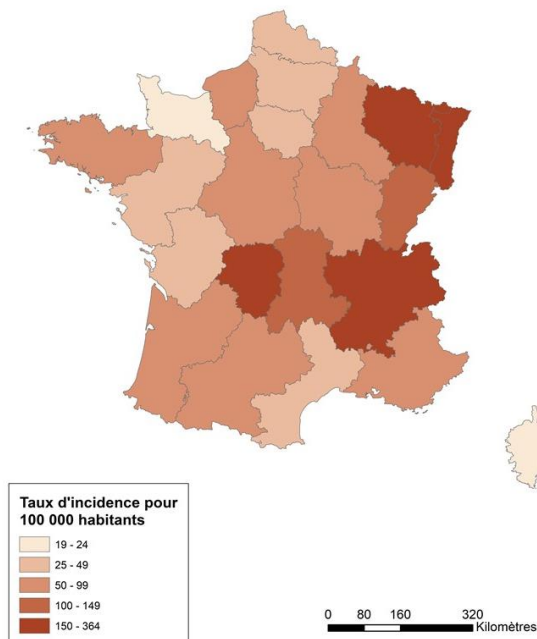


Figure 1. Estimation du taux annuel moyen de la borréliose de Lyme, France métropolitaine, 2017 – 2021 (Santé Publique France, 2021)

Toutefois, cette maladie n'étant pas à déclaration obligatoire, sa surveillance est moins complète que celle de la brucellose, par exemple (Ministère de la Santé et de la Prévention, 2023). Pour pallier certaines lacunes dans la gestion de cette maladie (Louwagie, 2021), des programmes de recherche et de veille sanitaire sont actuellement coordonnés, et un important effort de communication est déployé auprès du grand public. A titre d'exemple, le réseau Sentinelles³, créé en 1984, est développé sous la tutelle de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) et de Sorbonne Université. Ce système national de surveillance repose sur une collaboration entre médecins généralistes, pédiatres et chercheurs. Actuellement, ce réseau comprend plus de 1 200 médecins généralistes, soit un peu plus de 2% des médecins libéraux exerçant en France métropolitaine. Chaque semaine, ces médecins doivent déclarer et décrire l'ensemble des cas observés en consultations pour neuf indicateurs, dont la maladie de Lyme. Ils rapportent également l'absence des cas diagnostiqués, cela permet une surveillance hebdomadaire continue avec l'obtention de mesures d'incidence. Les données recueillies permettent de détecter les évolutions de la maladie de Lyme et visent à informer la population des risques encourus⁴ (Figoni et al., 2019). Toutefois, le niveau de participation n'est pas homogène entre les départements : par exemple, la Creuse est un « désert médical ». Il y a donc

³ <https://www.sentiweb.fr/>

⁴ <https://www.sentiweb.fr/document/4382>

probablement des biais d'estimations qui ne sont pas forcément faciles à éviter, même avec un modèle de correction des données.

Un autre programme de recherche partenarial, nommé CiTIQUE⁵, a été lancé en 2017. Ce programme vise à améliorer les connaissances scientifiques sur l'écologie des tiques et leur distribution sur l'ensemble du territoire métropolitain (**Annexe 1.**) En collaboration avec l'Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), l'Université de Lorraine ou encore l'Anses, CiTIQUE sollicite la participation de citoyens volontaires pour signaler les piqûres de tiques et envoyer, si possible, l'acarien piqueur. En seulement quelques années, une « tiquothèque » comprenant plus de 50 000 tiques a été constituée. L'acquisition de tiques piqueuses dans des zones urbanisées (parcs et chemins forestiers) constitue le principal atout de cette tiquothèque, faisant de CiTIQUE l'un des rares programmes à fournir des données à cette échelle. Cette collecte d'échantillons est ouverte à d'autres chercheurs, leur permettant de chercher la présence éventuelle d'agents pathogènes grâce à des analyses moléculaires et sérologiques. Ces méthodes incluent l'extraction d'ADN, les techniques PCR et les analyses immunologiques par test ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre *Bbsl*.

Ce projet collaboratif entre chercheurs et grand public vise à développer de nouveaux outils de prévention en établissant notamment une cartographie du risque de piqûres de tiques (**Figure 2.**) D'autres initiatives ont été mises en place pour étudier l'activité des tiques et la dynamique de leurs populations, à l'instar du projet CLIMATICK⁶. Celui-ci a pour objectif de prédire les périodes les plus à risque en fonction de la saisonnalité et des conditions environnementales (Lebert et al., 2022 ; Wongnak et al., 2022).

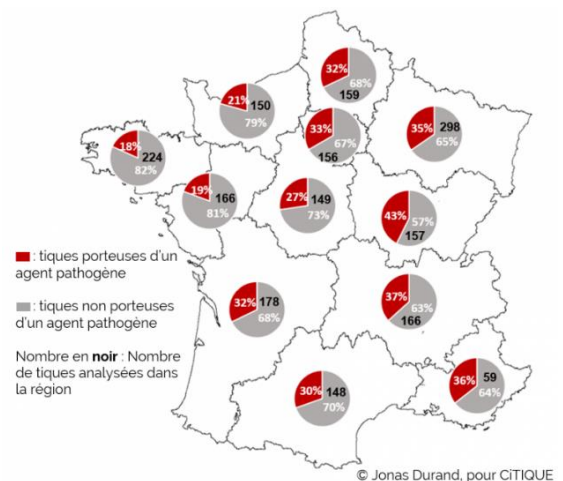


Figure 2. Cartographie du risque de piqûre de tiques infectées en France métropolitaine (CiTIQUE, 2020)

Pour résumer, les efforts de recherche sur les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent combinent à la fois des dispositifs de surveillance (de terrain et participatifs avec l'analyse spatio-temporelle des données) et l'étude des facteurs influençant l'épidémiologie des maladies à tiques, tels que le climat ou l'environnement (Lebert et al., 2022). Toutes ces méthodes sont complémentaires et visent non seulement à mieux caractériser le risque acarologique⁷ de la borréliose de Lyme mais aussi à le réduire.

⁵ <https://www.citique.fr/>

⁶ <https://epia.clermont.hub.inrae.fr/projets/climatick>

⁷ Selon Klopfenstein et ses collaborateurs, le risque acarologique à *Bbsl* est « le risque de transmission d'infection d'agents infectieux par piqûre, lié à la densité en nymphes d'*Ixodes* et au taux d'infestation des nymphes par *Bbsl* sur un territoire donné. » (2019).

2. Les tiques, vectrices de maladies

Pour comprendre le risque associé à ces maladies transmises par les tiques, et donc développer de meilleurs systèmes de surveillance, il est important de décrire le vecteur mis en cause, sa biologie, son cycle de transmission et sa distribution.

2.1. Généralités sur les tiques

Les tiques sont des arthropodes hématophages stricts c'est-à-dire qu'elles se nourrissent exclusivement de sang. Ces ectoparasites de vertébrés alternent entre phases actives (quête d'un hôte, parasitisme) et phase inactive (digestion, développement, mue ou dormance). Il est possible d'observer deux principaux pics d'activité, un au printemps et un en automne. En hiver, les tiques vont souvent ralentir leur développement et se mettre en dormance. Cette phase est appelée diapause et est observée quand les conditions climatiques et/ou la disponibilité en nourriture ne leur permettent pas de se développer correctement.

Elles appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, au sous-embranchement des Chélicérates, à la classe des Arachnides, à la sous-classe des Acariens et à l'Ordre des Ixodida du grec ancien ixôdês, « gluant »⁸. Cet ordre comprend environ 900 espèces divisées en trois sous-ordres : les Argasinae ou « tiques molles⁹ », les Nuttalliellinae et les Ixodidae ou « tiques dures ». Les tiques « molles » ou endophiles sont plutôt localisées dans des endroits abrités (fissures de murs, nids, terriers, etc.). A contrario, les tiques « dures » ou exophiles vivent dans des milieux ouverts tels que les forêts ou les prairies. Ces dernières sont donc plus susceptibles de rencontrer un être humain (Pérez-Eid, 2007).

Nous nous concentrerons plus particulièrement sur le sous-ordre des Ixodidae qui contient les genres *Ixodes*, *Dermacentor*, *Hyalomma* et *Rhipicephalus*, les plus présents en France. De ces quatre genres, c'est l'espèce *Ixodes ricinus* qui est la plus impliquée dans la transmission d'agents pathogènes (Guglielmone et al., 2010). Contrairement à *Rhipicephalus* et *Hyalomma* qui préfèrent un climat méditerranéen, *Ixodes* est plutôt retrouvée au nord ou au centre de la France et en zones montagneuses ou forestières. On la retrouve également en zone péri-urbaine dans les parcs (Claude, 2020 ; de Cock et al., 2023).

2.2. Cycle de vie d'*Ixodes ricinus*

Au sein des *Ixodidae*, trois types de cycles sont décrits, pouvant inclure un à trois hôtes différents. Ils sont qualifiés respectivement de monophasique, diphasique et triphasique (**Figure 3.**). Quel que soit le nombre d'hôtes impliqués, la tique passe par trois stases¹⁰ après éclosion des œufs : larve, nymphe, adulte. *I. ricinus* a un cycle triphasique, elle change donc d'hôte entre chaque stase.

Chaque métamorphose nécessite un repas de sang qui peut durer trois à dix jours selon le développement de la tique (Pérez-Eid, 2007). Après chaque repas, *I. ricinus* se laisse tomber au sol et entame sa mue. La femelle adulte, après l'accouplement, et suivant l'engorgement, pond entre 1 000 à 20 000 œufs au sol ou sur l'hôte avant de mourir. Elle ne se reproduit qu'une seule

⁸ <https://cnrtl.fr/definition/ixodes> (2012)

⁹ Ce terme fait référence au tégument non chitinisé qui recouvre le corps de la tique.

¹⁰ Les stases représentent les grandes étapes de développement (larvaire, nymphale, adulte) alors que les stades décrivent les étapes intermédiaires entre deux stases (exemple : stade nymphal I, stade nymphal II). Là où la stase représente un profond changement physiologique, le stade ne concerne qu'un changement de taille et de volume (Pérez-Eid, 2007).

fois. Le mâle, lui, se gorge peu du fait de sa structure et assure uniquement son rôle reproducteur avant de mourir à son tour. Une fois la ponte terminée, il faudra attendre deux à quatre semaines pour que les œufs éclosent. Chaque phase de transformation peut durer de quelques semaines à plusieurs mois selon les conditions environnementales (McCoy et Boulanger, 2015). En moyenne, *I. ricinus* met entre trois et six ans pour réaliser son cycle biologique complet (Pérez-Eid, 2007).

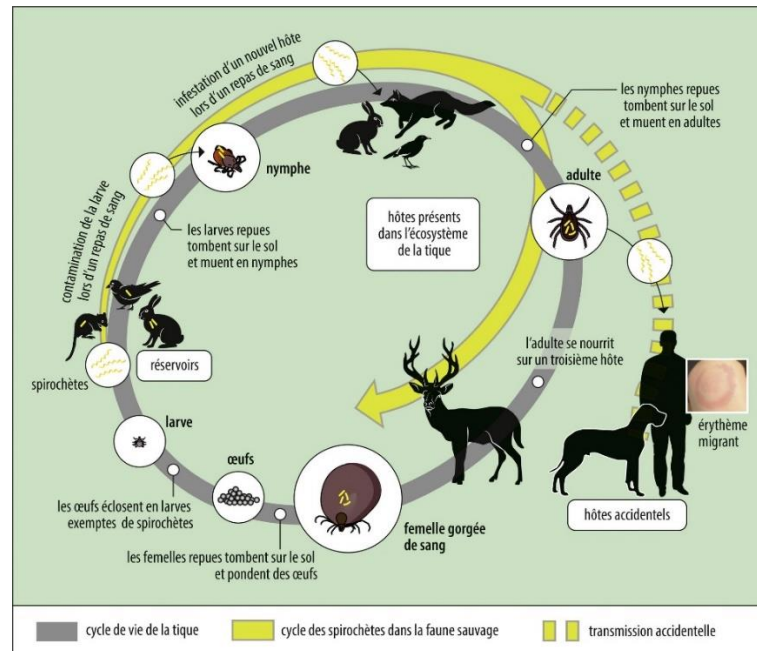


Figure 3. Cycle de vie des tiques et transmission de *Borrelia* à l'humain (© Encyclopædia Universalis France, 2024)

2.3. Principales clés de détermination morphologique

Au niveau morphologique, le corps de la tique se divise en deux parties : la « tête » appelée gnathosome ou capitulum et le « corps » nommé idiosome (Figure 4.). Le capitulum porte les palpes sensoriels et les pièces buccales permettant à l'acarien de se fixer à la surface de sa proie pour s'en nourrir. Ces pièces buccales se composent des chélicères (lacération de la peau de l'hôte) et de l'hypostome (structure en forme de harpon permettant l'ancrage dans la peau de l'hôte).

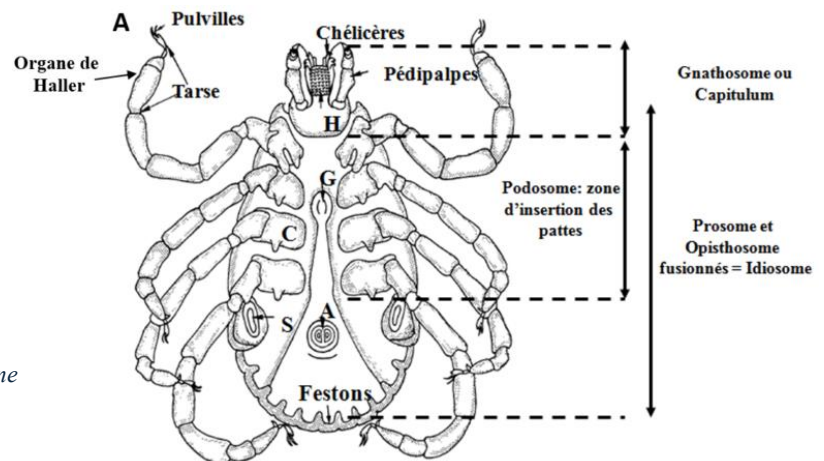


Figure 4. Schéma de la structure d'une tique dure (Mehlhorn, Encyclopedic Reference of Parasitology 2001)

Les adultes ont un dimorphisme sexuel très marqué : le mâle est en général plus petit que la femelle. Il possède un écusson dorsal chitinisé qui recouvre totalement l'idiosome, tandis que la femelle, pourvue partiellement de cette protection, peut s'engorger plus facilement lors des repas de sang et voir son volume augmenter jusqu'à 40 fois. Les nymphes se distinguent des femelles adultes par l'absence d'un pore génital situé au niveau de la quatrième paire de pattes. Les larves ne possèdent que trois paires de pattes. En raison de la complexité d'identification spécifique (genre, espèce) des larves, seuls les nymphes et les adultes sont identifiés. Parmi les caractéristiques morphologiques d'*I. ricinus*, on trouve un capitulum plus long que large et un sillon anal en forme arche qui entoure l'anus par l'avant (**Figure 5**).

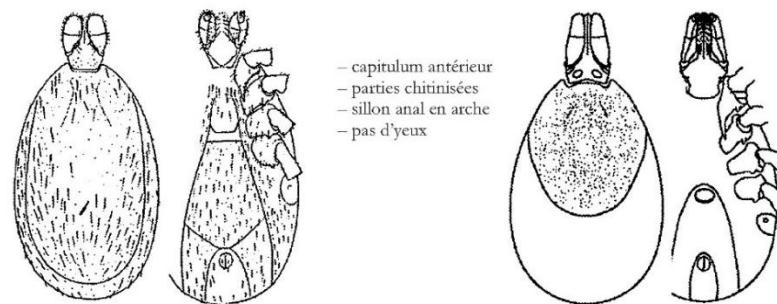


Figure 5. Schéma d'une tique du genre *Ixodes* avec le mâle à gauche et la femelle à droite (Pérez-Eid, 2007)

2.4. Choix des hôtes et mécanismes d'acquisition/transmission des agents pathogènes

2.4.1. Recherche et sélection des hôtes par *I. ricinus*

Pour se nourrir, les tiques doivent trouver un hôte sur lequel elles peuvent se fixer. Mais du fait de leur sensibilité plus ou moins importante à la dessiccation et de la probabilité de rencontre avec certains hôtes, il est possible d'observer des différences suivant les stases. Par exemple, les larves doivent garder une certaine humidité relative en restant près du sol et attendent l'occasion de s'accrocher sur un hôte qui passe à leur portée. Ce dernier est donc généralement de petite taille (rongeurs, oiseaux, lézards). Après un nouveau repas de sang, les larves se métamorphosent en nymphes. En se hissant le long de la végétation, elles s'orientent vers des hôtes plus diversifiés et se fixent sur des mammifères de moyenne à grande taille (lièvres, renards, cervidés), en privilégiant des zones corporelles humides et chaudes tels que les aisselles, l'aine ou les oreilles (Kiffner et al., 2011 ; Mysterud et al., 2014 ; Fabri et al., 2021). Enfin, les nymphes finissent par muer en adultes, qui privilégient les animaux de grand format (chevreuils, cerfs, sangliers) pour assurer leur bon engorgement.

La recherche d'hôtes est facilitée par les organes sensoriels des tiques. En plus de leurs soies réparties sur l'ensemble du corps, elles possèdent également un organe sensible au degré d'hygrométrie et aux phéromones : c'est l'organe de Haller, situé sur la première paire de pattes. De ce fait, les tiques peuvent repérer leur hôte par la détection du CO₂, de phéromones ou la chaleur qu'ils dégagent (McCoy et Boulanger, 2015). Lorsque la tique est sur le site de fixation souhaité, elle peut alors initier son repas de sang. Durant cette étape, il est possible d'observer des phénomènes de regroupements de tiques. En effet, ces dernières émettent des phéromones et attirent d'autres individus sur les sites favorables à piquer. Cela permet de créer des zones de rencontre pour les mâles et les femelles en vue d'une potentielle reproduction (McCoy et Boulanger, 2015).

2.4.2. Acquisition et transmission des agents pathogènes

La tique peut acquérir des agents pathogènes selon quatre voies différentes¹¹ :

- **Voie par piqûre** : lors du repas sanguin, la tique peut acquérir les agents pathogènes présents dans l'hôte vertébré (McCoy et Boulanger, 2015).
- **Voie transstadiale** : l'infection persiste à travers les stases de développement de la tique (McCoy et Boulanger, 2015).
- **Voie verticale ou trans-ovarienne** : la tique adulte transmet l'agent infectieux à sa progéniture (Moore et al., 2018).
- **Voie par co-feeding ou co-repas** : cette acquisition serait réalisée par contact entre deux tiques proches l'une de l'autre et sans que l'hôte ne soit porteur de l'agent pathogène en question. Ce mécanisme est actuellement controversé pour *Bbsl* et n'est pour l'instant que supposé (Randolph et Gern, 2003 ; Voordouw et Maarten, 2015). En outre, cette information encore incertaine ne nous est pas utile pour la suite de notre étude.

A l'occasion de ces repas de sang, la tique peut également transmettre des agents pathogènes, inoculés par la salive. La transmission se fait exclusivement par piqûre et la durée nécessaire pour que l'agent pathogène passe de la tique à l'hôte varie selon l'agent infectieux. Les virus et parasites, directement présents dans les glandes salivaires de la tique, peuvent être transmis dès le début du repas sanguin (Kaufman, 2010).

En revanche, la majorité des bactéries ne sont pas encore infectieuses au moment de la piqûre ou sont localisées dans l'intestin de la tique. Au moment de la piqûre et lorsque le sang afflue, les changements de température et de pH induisent une modification chez l'agent pathogène, le rendant infectieux, et/ou faisant migrer la bactérie de l'intestin vers les glandes salivaires (McCoy et Boulanger, 2015). La transmission d'agents pathogènes par la salive dépend non seulement du temps de contact entre la tique et l'hôte, mais aussi du taux d'infestation de l'hôte par les tiques (Guittard, 2019 ; Septfons, 2023).

Parmi les agents pathogènes transmis, on trouve notamment les bactéries du genre *Rickettsia* et *Borrelia*, les Flavivirus et Nairovirus ainsi que des protozoaires du genre *Babesia* et *Theileria*. Selon les hôtes et leur nature (réservoir ou non), les tiques ne vont être porteuses ni des mêmes agents pathogènes, ni des mêmes souches. Dans le cas de *Babesia* par exemple, les tiques infestant les bovins sont susceptibles de porter *Babesia bovis* alors qu'on trouve plutôt *Babesia capreolis* chez le chevreuil. Enfin, *I. ricinus* se fixe sur un hôte dès qu'elle en a l'opportunité. Bien que l'être humain ne soit pas un hôte préférentiel, il côtoie souvent le même environnement que les tiques lors d'activités de loisir et peut donc être infesté.

Cette plasticité comportementale et dans le choix des hôtes fait d'*I. ricinus* une tique ubiquiste, largement répandue en France et en Europe (**Figure 6.**), et capable de transmettre un large panel d'agents pathogènes.

¹¹ Les voies transstadiale et trans-ovarienne ne rentrent pas en compte pour la borréliose de Lyme.

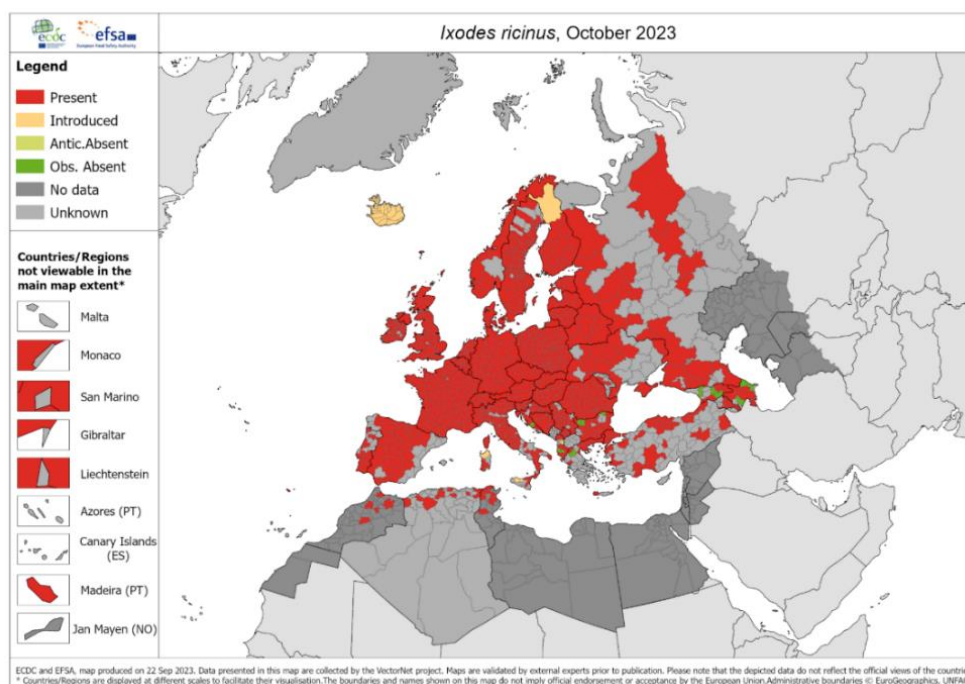


Figure 6. Distribution connue d'*I. ricinus* en Europe (efsa, 2023)

2.4.3. Transmission de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, l'agent pathogène de la maladie de Lyme

En 1975, l'épidémiologiste Allen Steere et son équipe de l'université de Yale ont décrit une épidémie d'arthrites infantiles à Lyme (Connecticut), dont la maladie tire son nom. Ils ont publié deux ans plus tard un article sur les syndromes associés aux piqûres de tiques tels que l'érythème migrant, l'arthrite et les anomalies neurologiques ou cardiaques (Steere, cité dans Septfons, 2023). En 1982, l'entomologiste et bactériologiste Wilhelm Burgdorfer a isolé la bactérie responsable, *Borrelia burgdorferi*, dans le tube digestif de la tique *I. ricinus*, établissant ainsi le lien entre la bactérie et la borréliose de Lyme (Burgdorfer, cité dans Septfons, 2023).

La maladie de Lyme est causée par le complexe de bactéries *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Bbsl*), un groupe de spirochètes appartenant au genre *Borrelia*. Ce complexe comprend plus de 20 espèces, dont huit sont pathogènes pour l'humain (Steinbrink, 2022). En Europe, les principales espèces responsables sont *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi sensu stricto* tandis qu'en Amérique du Nord, c'est surtout cette dernière qui est la plus courante. Chaque espèce a une distribution géographique spécifique et une affinité pour certains hôtes. Par exemple, *B. garinii* se trouve principalement chez les oiseaux, tandis que *B. afzelii* est le plus souvent associée aux rongeurs (Kurtenbach et al., 2006 ; Cosson, 2019).

Les bactéries se multiplient alors rapidement dans la tique et migrent vers les glandes salivaires. La transmission du complexe *Bbsl* chez *I. ricinus* se produit généralement entre 12h et 24h après la piqûre (Boulanger, 2015). Grâce aux substances présentes dans la salive, la bactérie va pouvoir échapper à la cascade de réaction du complément¹². Il n'y aura donc pas ou peu de réponses inflammatoire et immunitaire au niveau du site de la piqûre. Certaines protéines

¹² Ce mécanisme implique une cascade de réactions enzymatiques participant à la défense immunitaire de l'organisme infecté. L'activation d'une trentaine de protéines participe à la mise en place d'une réponse inflammatoire selon trois voies possibles (classique, lectine, alternative). Cela aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la création d'un pore à la surface de l'agent pathogène, entraînant sa lyse (Bhide et al., 2005 ; Dulipati et al., 2020 ; Delves, 2024).

de la salive d'*I. ricinus* bloquent le système du complément en empêchant la reconnaissance de lipoprotéines bactériennes ; la lyse de la bactérie est alors évitée (Couvreur et al., cité dans McCoy et Boulanger, 2015 ; Garg, cité dans Haut Conseil de la santé publique, 2014).

Mais chez certains hôtes, la bactérie ne parvient pas à échapper au système du complément et est donc détruite par l'organisme. C'est le cas du chevreuil (*Capreolus capreolus*). En effet, bien qu'il serve de réservoir pour des agents pathogènes tels qu'*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia phagocytophila*, *Babesia sp* ou encore *Bartonella sp* (Alberdi et al., 2000 ; Bogumila et Adamska, 2005 ; Hoby et al., 2009 ; Overzier et al., 2013), il ne l'est pas pour *Bbsl* ou pour le virus de l'encéphalite à tiques TBEv¹³, puisque son système immunitaire détruit l'agent pathogène (Gert et al, 1995 ; Jaenson et Tälleklint, 1992). De fait, Kurtenbach et ses collaborateurs ont montré en 2006 que le sérum du chevreuil possède une forte activité lytique (effet bactéricide) grâce à l'action de son système du complément. Le chevreuil ne fait donc pas partie du cycle de transmission de *Bbsl*, bien qu'il puisse être porteur de tiques infectées.

Chez l'humain, des anticorps apparaissent généralement entre deux et six semaines après la piqûre, ce qui permet de réaliser un sérodiagnostic de la maladie en utilisant un test de dépistage immuno-enzymatique basé sur la méthode ELISA (Jaulhac et al., 2019). L'interprétation sérologique peut offrir des informations précieuses sur le développement de l'immunité chez les personnes piquées et permet un diagnostic rapide des cas puisque les symptômes seuls ne permettent pas un diagnostic de certitude, étant souvent confondus avec ceux d'une autre maladie.

De la même manière, des tests sérologiques sont également utilisés chez les animaux dans le cadre de la surveillance et de la prévention de la maladie de Lyme, permettant d'évaluer leur réponse immunitaire aux spirochètes (Dorward et al., 1991 ; Kiffner et al., 2012 ; Bison, cité dans Fligny, 2021 ; Friberg Holm, 2023).

3. La faune sauvage comme un indicateur dans le suivi épidémiologique des risques sanitaires chez l'humain

3.1. Définition et critères de choix d'un indicateur

Dans ce mémoire, un indicateur est défini comme une mesure permettant d'évaluer l'intensité d'un danger et de l'anticiper en surveillant la circulation de l'agent pathogène concerné.

Une prévision de ces dangers faciliterait la mise en œuvre de mesures préventives renforcées et plus efficaces pour empêcher une population d'être contaminée. A minima, cela permettrait d'informer cette population des périodes où elle court le plus de risques (Leschnik et al., 2012 ; Tonteri et al., 2016 ; Ollivier et al., 2023). Pour qu'une espèce soit considérée comme indicatrice dans un suivi épidémiologique, elle doit remplir plusieurs conditions : l'aire de distribution de l'espèce doit être connue et recouvrir la zone d'étude, les prélèvements doivent être relativement faciles à réaliser sur cette espèce et l'agent pathogène doit pouvoir y

¹³ Le chevreuil ne semble pas jouer un rôle dans le maintien du virus TBE, le niveau de virémie après infection étant trop faible pour infecter les tiques. Cependant, sa capacité à éliminer le virus n'est pas aussi bien documenté que pour *Bbsl*.

être détecté (National Research Council US Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, 1991 ; Rivière, 1993).

3.2. Le chevreuil, un hôte particulier d'*I. ricinus*

Actuellement, le chevreuil est étudié pour son potentiel en tant qu'espèce indicatrice du risque de contamination humaine par la maladie de Lyme en raison de son habitat et de ses interactions avec les tiques. Faisant partie des grands mammifères les plus abondants d'Europe de l'Ouest, le chevreuil occupe des biomes divers tels que les forêts tempérées et méditerranéennes, les moyennes montagnes, les prairies en bordure de forêts et même les plaines cultivées. Ces habitats sont également partagés par les tiques, en particulier par *I. ricinus*. De plus, le chevreuil favorise la reproduction des tiques, ces dernières préférant les hôtes de grand format pendant les stases nymphale et adulte pour assurer leur reproduction (Gilot et al., 1994 ; Krøl et al., 2020).

En France, la population de chevreuils a considérablement augmenté au cours des quarante dernières années, à la fois sur le plan démographique que géographique¹⁴. Cette augmentation des populations s'expliquerait en partie par la disparition des prédateurs naturels du chevreuil, tels que le loup (*Canis lupus*) ou le lynx (*Lynx lynx*), l'affouragement artificiel en période hivernale et par les lâchers volontaires qui ont favorisé son implantation dans certaines régions (Anciaux et Libois, 1990). En outre, la distribution et l'abondance des tiques en Europe semblent correspondre celles des chevreuils (Jaenson et al., 2012). Des études montrent une corrélation entre la densité des chevreuils et celle d'*I. ricinus* dans leur environnement, ainsi qu'une relation entre la charge en nymphes des chevreuils et leur densité (Pichon et al., 1999 ; Vor et al., 2010). Ces observations suggèrent donc que le chevreuil pourrait servir de marqueur pour évaluer l'abondance des tiques dans un milieu donné.

Toutefois, les borrélioses transmises par les tiques ne survivent pas chez le chevreuil car elles sont éliminées par son système immunitaire (cf. 3.2.1. Transmission de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, l'agent pathogène de la maladie de Lyme). Il n'est donc pas possible de réaliser des tests de détection directe pour *Bbsl*. Néanmoins, les piqûres de tiques infectées entraînent chez lui une production d'anticorps spécifiques contre ces bactéries. Il est alors possible de mettre en place des tests de détection indirecte pour déterminer la prévalence de l'agent infectieux dans une population donnée.

4. Problématique et questions de recherche

Pour conclure, bien que la densité locale de tiques infectées soit un indicateur utile pour évaluer le risque de contamination humaine, la surveillance des populations de tiques reste limitée en raison de la lourdeur des protocoles en vigueur, comme la méthode du drapeau. Cette technique consiste à traîner un drapeau d'un mètre carré le long d'un transect sur la végétation, capturant ainsi les tiques à l'affût, ce qui permet d'estimer leur densité. Ce protocole doit être répété à de nombreuses reprises et sur de nombreux sites car les tiques sont réparties de façon hétérogène dans l'espace et dans le temps. La recherche se tourne donc vers l'élaboration de nouveaux indicateurs plus simples et plus efficaces pour mieux prédire ce risque.

¹⁴ Site de l'OFB éditant chaque année l'évolution des populations de chevreuil en France métropolitaine : <https://professionnels.ofb.fr/fr/doc-dataviz/dataviz-presence-ongules-sauvages-en-france>

Au printemps 2023, Une thèse de doctorat de sciences (Ollivier, 2023) menée à l'ELIZ avec la participation du CNRS et de l'INRAE, visait à déterminer la possibilité de détecter le niveau de risque cartographique de la maladie de Lyme pour l'humain par l'évaluation sérologique de l'infection Lyme chez le chevreuil. Les résultats sérologiques ont montré que les anticorps dirigés contre *Bbsl* persistaient quelques semaines chez le chevreuil. Cette découverte permet de savoir si l'individu a été récemment exposé à l'agent pathogène, facilitant ainsi le suivi temporel de la présence de *Bbsl* et la cartographie du risque d'exposition. Ces informations pourraient contribuer à anticiper et à prévenir les pics de contamination humaine.

A l'issue de ce travail, qui a permis de mettre au point les moyens de détecter une réponse sérologique notable de cette espèce vis-à-vis de la borréliose de Lyme, une analyse plus descriptive (non publiée) des données acquises sur l'animal comparées à des données de cas humains sur les mêmes périodes a suscité des interrogations. Nous présentons ci-dessous simplement la comparaison entre les données globales de prévalence chez le chevreuil (3 200 échantillons de sérums chevreuils répartis sur les territoires de 18 départements participant) avec des données humaines mises à disposition par Santé Publique France (**Figure.7**).

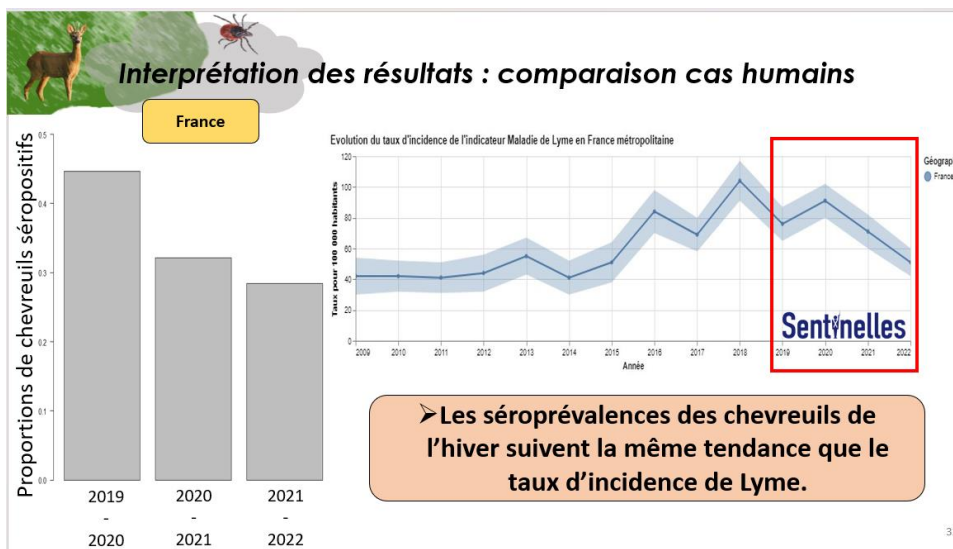


Figure 7. Comparaison des proportions de chevreuils séropositifs avec l'évolution de l'incidence humaine sur la période 2020-2022 (ELIZ, 2023).

Ces tableaux comparatifs à une échelle plus fine, régionale, sont disponibles en **Annexe 2** du présent document. Par ailleurs, durant le travail de thèse de V. Ollivier, des prélèvements de rates et une collecte de tiques ont été réalisés sur des chevreuils de 18 départements. Seules les rates ont fait l'objet d'une analyse ADN pour détecter la présence d'agents pathogènes mais aucune bactérie du complexe *Bbsl* n'a été identifiée. Les tiques, qui n'ont pas encore été analysées constituent donc une piste prometteuse. Sur la base de ces graphiques et du potentiel inexploité des tiques pour la détection d'agents pathogènes, l'ELIZ a souhaité approfondir ce questionnement et éventuellement apporter des perspectives d'investigation épidémiologiques plus importantes. L'Entente a fait appel à un stagiaire ingénieur pour tenter d'apporter quelques éléments de réponse dans ce domaine encore mal connu.

L'identification des indicateurs chez le chevreuil est donc cruciale pour établir une meilleure évaluation et gestion du risque lié aux tiques. Pour répondre à cette problématique, plusieurs questions de recherche sont donc explorées. Elles sont répertoriées dans le tableau suivant :

NUMERO	QUESTION DE RECHERCHE	HYPOTHESES
1	Comment varie l'infestation par les tiques chez les chevreuils selon leur domaine vital ?	La charge en tiques des chevreuils est plus importante dans les domaines vitaux où le pourcentage de forêt est le plus important.
2	Y a-t-il une corrélation au fil du temps entre l'évolution des populations de chevreuils et les piqûres de tiques chez les humains ? Et si oui, à quelle échelle géographique ?	Les populations de chevreuils jouent sur les populations de tiques dans l'environnement et donc ont un impact sur le nombre de piqûres de tiques chez les humains.
3	Y a-t-il une corrélation entre l'abondance des chevreuils et l'incidence humaine de la borréliose de Lyme ?	Plus il y a de chevreuils, plus l'incidence humaine pour la borréliose de Lyme est élevée.
4	Est-ce que les agents pathogènes retrouvés dans les tiques des chevreuils sont les mêmes que ceux retrouvés dans les tiques piqueuses d'humain ?	Certains agents pathogènes ne seront pas partagés par l'humain et le chevreuil (cas d' <i>Anaplasma phagocytophylum</i> , par exemple) mais <i>Bbsl</i> peut l'être.
5	Y a-t-il une différence de portage bactérien entre les tiques gorgées et celles qui ne le sont pas ? Voire entre niveaux d'engorgement ?	5.1. Plus les tiques seront gorgées, plus elles auront la capacité d'acquérir des agents pathogènes. 5.2. Les tiques gorgées sur chevreuils seront indemnes de <i>Bbsl</i> .
6	Dans un département donné, est-ce que la séroprévalence de la borréliose chez les chevreuils est corrélée au taux d'incidence annuel humaine ?	L'évolution de la séroprévalence des chevreuils est corrélée à celle du taux d'incidence annuel humain.
7	L'évolution des populations de chevreuils influence-t-elle la séroprévalence de la borréliose de Lyme chez ces cervidés ?	Plus il y a de chevreuils, plus leur séroprévalence de la borréliose de Lyme est importante.

Tableau 1. Questions de recherche abordées pour répondre à la problématique

Ainsi, les pistes de réflexion autour de ces questions guideront les recherches futures pour développer des outils plus accessibles et adaptés à la gestion du risque de la borréliose de Lyme, l'objectif ultime étant de protéger au mieux les populations humaines contre cette maladie.

PARTIE 2. MATERIELS ET METHODES

1. Identification des données disponibles

1.1. Données et prélèvements issus de la thèse de V. Ollivier (2023)

La base de données CHEVREUIL comprend plus de 3 200 individus chevreuils tués à la chasse et sur lesquels des données et des prélèvements ont été collectés dans le cadre du travail de thèse de V. Ollivier. Cette étude s'est faite sur un total de 18 départements, soit environ 300 chevreuils par département. Des prélèvements de rates, de sang sur buvards et/ou sérums, ainsi que la collecte des tiques sur oreilles ont été réalisés par les chasseurs entre 2019 et 2023 (Ollivier, 2023). Ces données et prélèvement ont été obtenues pour évaluer le potentiel du chevreuil en tant qu'espèce indicatrice dans la surveillance et la prévention de la maladie de Lyme. La base de données prend en compte pour chaque individu :

Donnée/ prélèvements sur les individus chevreuils	Date	Lieu	Obtention des données/ prélèvements	Par qui
Sexe, âge, sérums/sang sur buvard, rate, oreilles	2019-2022 sur les deux périodes de chasse par an	18 départements (1, 10, 14, 39, 51, 54, 55, 60, 61, 67, 68, 73, 74, 77, 80, 88, 91, 95)	Prélèvement sur animaux abattus	Chasseurs participant à l'étude
Charge en tiques dont le nombre de nymphes		LDV88 (Epinal)	Comptage des tiques sur l'oreille découpée de chaque chevreuil	Techniciennes du LDV88

Tableau 2. Informations de la base de données CHEVREUIL concernant chaque individu chevreuil

1.2. Données du réseau Sentinelles (Santé Publique France)

La base de données issues du réseau Sentinelles donne accès aux taux d'incidence humaine de la maladie de Lyme (nombre de cas pour 100 000 habitants) au niveau départemental et au niveau des anciennes régions depuis 2015. Les cas de maladies sont définis par la présence d'un érythème migrant et de manifestations neurologiques, articulaires, cutanées ou cardiaques évocatrices de la maladie de Lyme chez les patients séropositifs pour *Bbsl* (test ELISA positif confirmée par un test Western-Blot)¹⁵.

1.3. Données CiTIQUE au niveau départemental

La base de données transférée par CiTIQUE répertorie les signalements de piqûres de tiques chez l'humain pour sept départements (23, 34, 54, 55, 57, 59, 88) depuis 2017. Des précisions sont données quant à la date présumée de piqûre, les caractéristiques de l'individu piqué (sexe, âge), l'environnement probable de la piqûre (forêt, prairie, jardin, parc, etc.) et les coordonnées GPS, ainsi que la raison de la présence dans l'environnement (activités professionnelles ou scolaire, sport, chasse, etc.).

¹⁵<https://www.sentinweb.fr/france/fr/?page=maladies&mal=18>

Cette base de données répertorie également les agents pathogènes des tiques envoyées par les personnes qui se sont fait piquer dans le département de la Meuse. Une quarantaine d'agents pathogènes ont été testés, dont *Bbsl*. La date et le lieu de piqûre, la stase de la tique, l'espèce en question et son statut d'engorgement sont également renseignés.

1.4. Fédérations Départementales des Chasseurs

1.4.1. Sérums de chevreuils

Les Fédérations Départementales des Chasseurs (FDC) ayant répondu favorablement au projet sont la Creuse, le Jura et le Nord. Il leur a été demandé de fournir une quarantaine d'échantillons de sérums de chevreuils par an sur la période 2017-2023. Les bases de données fournies par ces départements détaillent la date et le lieu des prélèvements effectués, l'âge et le sexe des chevreuils abattus et, suivant les départements, la qualité du sérum (plus ou moins hémolysé).

1.4.2. Tableau de chasse

Les FDC des départements étudiés ont transmis les tableaux de chasse depuis au moins 2017. Ces tableaux prennent en compte le nombre d'attributions (nombre d'animaux autorisés à être chassés) et le nombre de réalisations (nombre d'animaux réellement abattus) par an.

2. Sélection des données et méthodes utilisées

2.1. Influence des populations de chevreuils sur les populations de tiques

2.1.1. Infestation par les tiques et domaine vital

Pour tester l'hypothèse de la question 1, nous avons utilisé la base de données CHEVREUIL en prenant compte des coordonnées des chevreuils abattus à la chasse et leur charge en tiques.

Parmi ces départements, la Meuse a été choisie en raison de la disponibilité des nombreuses données disponibles dans la base de données CiTIQUE, notamment avec le nombre de signalements de piqûres de tiques chez l'humain. La Meuse est également le département de la Lorraine comptant le plus grand nombre d'échantillons de tiques disponibles ($n = 265$) dans la base de données CHEVREUIL.

Seules les nymphes ont été sélectionnées parmi le nombre total de tiques. En effet, la stase nymphale chez *I. ricinus* est la plus propice à la transmission d'agents pathogènes chez l'humain. Sa répartition est plus large que celle des larves, qui restent davantage sur le lieu de ponte et dans une zone relativement humide. De plus, les nymphes passent plus facilement inaperçues lorsqu'elles piquent l'être humain que les tiques adultes. Ayant moins de chance d'être rapidement retirées, elles ont donc plus de temps pour transmettre leurs agents infectieux (Boulangier et al., 2018).

Du fait des contraintes de temps, un effectif de tiques minimum attendu a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$n = z^2 \times p (1 - p) / m^2$$

Avec :

n = taille de l'échantillon,

z = niveau de confiance selon la loi normale centrée réduite (à 95%, $z = 1.96$),

p = proportion estimée de la population qui est positive à *Bbsl*,
 m = précision

En considérant une prévalence de 10%, un intervalle de confiance de 95% et une précision de 0.035, ce calcul permet d'obtenir un effectif minimal d'environ 283. Le nombre minimum de nymphes a été ramené à 285 pour pouvoir tester l'hypothèse 5, selon laquelle le portage bactérien diffère en fonction de l'engorgement. Ce nombre minimum prévoit donc de sélectionner 57 chevreuils sur les 265 individus abattus dans la Meuse et dont leurs tiques ont été collectées.

La sélection de ces chevreuils a ensuite été faite en représentant la distribution spatiale des chevreuils disponibles à l'aide du logiciel de système d'information géographique (SIG) QGIS Desktop 3.24.3. L'outil de recherche « sélection aléatoire » a permis de sélectionner les individus chevreuils (**Figure 8**).

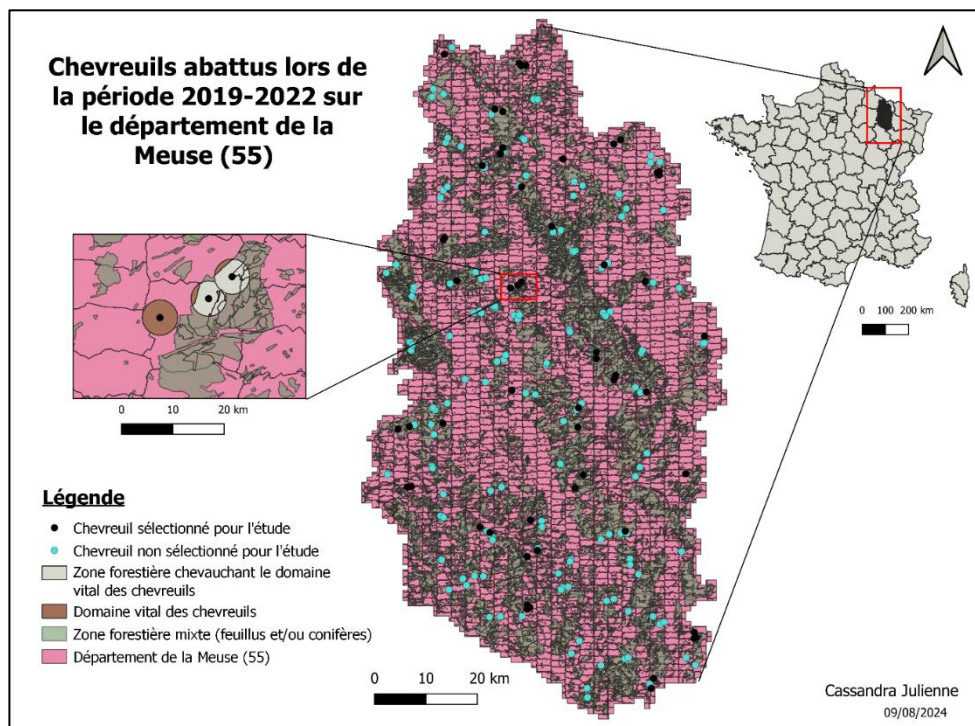


Figure 8. Cartographie des chevreuils sélectionnés aléatoirement sur le département de la Meuse

(Source : personnelle, d'après les bases de données CHEVREUIL et BD_FORET_2_0_SHP_LAMB93)

Ensuite, pour tester notre hypothèse, il a d'abord été nécessaire de définir le domaine vital du chevreuil. Nous avons choisi de créer une zone tampon d'une superficie de 85 ha dont l'épicentre est le point où le chevreuil a été abattu, reflétant globalement la zone dans laquelle il a l'habitude de circuler.

En parallèle, la couche représentant les zones forestières de la Meuse obtenue par l'Institut National de l'Information Géographique et Forestières (IGN), a été exportée sur QGIS. En réalisant une intersection, il est possible d'obtenir le pourcentage de forêts mixtes essentiellement composées de feuillus de chaque zone tampon. Une régression linéaire a été réalisée entre le pourcentage de forêt du domaine vital et la charge en tiques, transformée en $\log(x + 1)$ pour avoir une distribution normale des résidus. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées via le logiciel RStudio R Core Team version 4.3.1.

2.1.2. Impact des populations de chevreuil sur le nombre de tiques piqueuses chez l'humain

Pour tester notre hypothèse 2, selon laquelle l'augmentation des populations de chevreuils entraîne une hausse des signalements de piqûres de tiques chez l'humain, les données des FDC et de CiTIQUE ont été utilisées.

Dans un premier temps, il a fallu définir l'évolution des populations de chevreuils. Les tableaux de chasse des FDC pour la Creuse, le Jura et le Nord depuis au moins 2017 jusqu'à 2023 ont été utilisés. Dans cette étude, l'abondance relative des chevreuils correspond au nombre des réalisations. Le rapport à une surface a été écarté car il était identique pour chaque nombre de réalisations, la surface étant approximée à celle de l'ensemble du département. Les données CiTIQUE utilisées sont le nombre de signalements de piqûres de tiques chez l'humain depuis 2017 pour la Creuse, le Jura et le Nord.

Puis, pour chaque département, une régression linéaire a été faite entre le nombre de réalisations du département par an (indicateur de l'abondance relative de chevreuils, variable explicative) et le nombre de signalements de piqûres de tiques par an pour 100 000 habitants dans le même département la même année (variable à expliquer).

2.1.3. Impact des populations de chevreuils et de tiques sur l'incidence humaine

Pour tester notre hypothèse 3, selon laquelle les populations de chevreuils ont un impact sur l'incidence humaine, nous avons utilisé les mêmes données des tableaux de chasse fournis par les FDC que celles citées précédemment. Les taux d'incidence humaine disponibles à l'échelle régionale via le réseau Sentinelles de 2017 à 2023 ont également été choisis pour le Limousin, la Franche-Comté et le Nord-Pas-de-Calais. Une régression linéaire entre le nombre de réalisations par an et le taux d'incidence humaine a été faite.

2.2. Les agents pathogènes des tiques chez le chevreuil et chez l'humain

Nous souhaitons ici tester nos hypothèses 4 et 5. Pour cela, nous avons utilisé la base de données CHEVREUIL, les tiques collectées sur les chevreuils de la Meuse sur la période 2019-2022 et les agents pathogènes des tiques piqueuses d'humain dans la Meuse grâce aux données CiTIQUE depuis 2017.

2.2.1. Identification des tiques des chevreuils de la Meuse

L'identification des tiques sous loupe binoculaire (ZEISS Stemi 508) a permis de déterminer stase, sexe, genre, espèce et niveau d'engorgement, conduisant à la sélection des 285 nymphes destinées à l'extraction d'ADN. L'identification s'est appuyée sur les clés de détermination fournies dans l'ouvrage « Les tiques : Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire » de Perez-Eid (2007).

Stase : les larves sont généralement très petites (< 1mm), translucides et disposent de trois paires de pattes, tandis que nymphes et adultes en possèdent quatre paires. Les nymphes et les femelles possèdent une face dorsale divisée en deux parties (A) : le scutum (écusson dorsal chitinisé) et l'alloscutum (partie molle et extensible). Pour différencier les nymphes des adultes, il faut regarder s'il y a présence d'un pore génital (B). Cet orifice se positionne au niveau de la quatrième paire de pattes sur l'axe médian de l'idiosome, les nymphes en sont dépourvues.

Sexe : les mâles possèdent un écusson dorsal totalement chitinisé (C), contrairement aux femelles dont le scutum représente en moyenne un tiers de leur corps. Il n'est pas possible visuellement de différencier les mâles des femelles durant la stase nymphale.

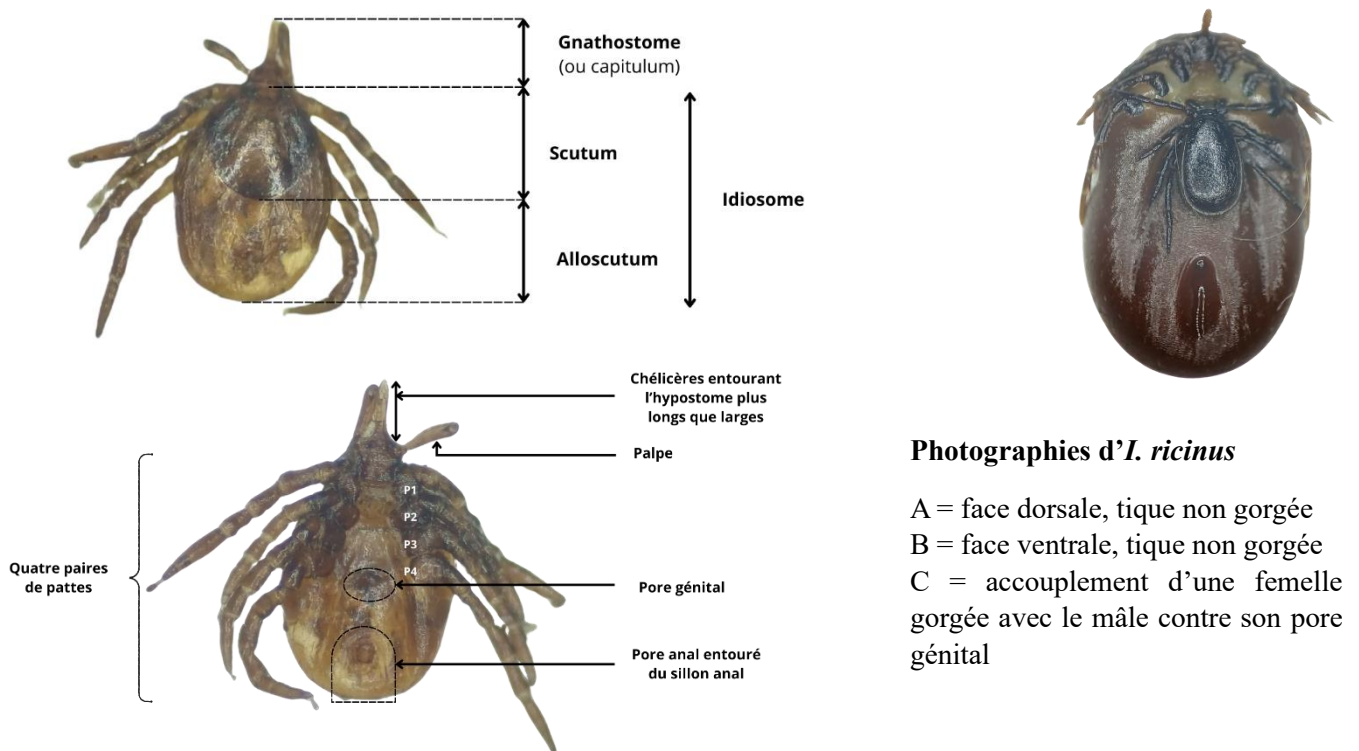


Figure 9. Photographies d'*I. ricinus* et ses clés de détermination (© Cassandra JULIENNE)

Genre, espèce : l'ensemble des tiques identifiées fait partie de la famille Ixodidae du fait de la présence d'un scutum et d'un sillon anal en forme d'arche contournant l'anus par l'avant (**Figure 7. B**) Pour déterminer l'espèce, le capitulum est examiné. *I. ricinus* se caractérise par un rostre plus long que large (**Figure 7. B**), contrairement à *Dermacentor reticulatus* (**Figure 8.**).



Figure 10. Photographie en face dorsale de l'espèce *Dermacentor reticulatus* (© Océane CLAUDE)

Niveau d'engorgement : le niveau d'engorgement des tiques a été classé selon quatre catégories : pas gorgées, peu gorgées, moyennement gorgées, très gorgées. Cette classification s'est appuyée sur des planches photographiques pour l'espèce *Ixodes scapularis*, étant bien documentée par l'Institut National de Santé Publique du Québec. Ces planches permettent de comparer les tailles et aspects des tiques par rapport à une échelle normalisée (Wormser et al., 2006). Pour *I. ricinus*, seule une échelle pour les différents stades d'engorgement de la nymphe est actuellement disponible dans la littérature (Pryen, 2014). Nous avons donc approximé que les tailles et aspects d'*I. scapularis* étaient les mêmes pour *I. ricinus*.

2.2.2. Broyage des tiques et extraction ADN

Après identification, les tiques ont été broyées à l'aide de billes en inox stériles et d'un broyeur Precellys® 24 fonctionnant à 5 500 rpm pendant 20 secondes. Un tampon d'éluion a été ajouté dans les Eppendorf contenant les tiques préalablement lavées à l'éthanol, rincées à l'eau distillée et séchées.

L'extraction d'ADN des tiques a été réalisée avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin DNA Insect, selon le protocole décrit en **Annexe 3**. Pour détruire les protéines contaminantes et dégrader les nucléases susceptibles d'endommager les acides nucléiques, les échantillons broyés ont été incubés avec de la protéinase K pendant au moins 30 minutes. Ensuite, l'extraction d'ADN a été effectuée sur une colonne de silice. Les extraits d'ADN obtenus ont été congelés à -20°C pour les conserver jusqu'aux analyses ultérieures.

2.2.3. PCR sur puce microfluidique

Cette étape a été réalisée à l'UMR BIPAR de l'Anses à Maisons-Alfort par Clémence GALON, chargée de projet scientifique et technique, en utilisant le système microfluidique de Standard BioTools (anciennement Fluidigm) pour identifier la présence de bactéries et de parasites dans les échantillons d'ADN extraits de tiques. Les résultats ont ensuite été validés par PCR quantitative en temps réel de confirmation et séquençage.

La PCR sur puce microfluidique est une nouvelle approche de PCR en temps réel à haut débit, permettant de détecter simultanément un grand nombre d'agents pathogènes sur de nombreux échantillons. Cette méthode nécessite un faible volume d'échantillon, de l'ordre d'un microlitre (Michelet et al., 2014). Lors de cette PCR, 2 304 réactions sont effectuées sur une puce de 48 puits.

Après l'analyse des résultats de la puce microfluidique, une étape de confirmation est effectuée. Les échantillons positifs dont on souhaite confirmer la positivité sont sélectionnés. Une nouvelle PCR est réalisée avec des amorces et des programmes spécifiques. Les produits PCR migrent ensuite sur gel d'agarose. Les positifs sur gel sont ensuite séquencés et analysés, validant ou non le résultat obtenu par PCR microfluidique. Le laboratoire nous a ensuite transmis les résultats (agents pathogènes positifs et leurs séquences).

Le lien entre la prévalence des agents pathogènes des tiques analysées et le niveau d'engorgement des tiques infectées a été étudié avec un test du χ^2 .

2.2.4. Comparaison avec données CiTIQUE

Les données sur les agents pathogènes identifiés dans les tiques piqueuses d'humains dans la Meuse ont été utilisées. Les agents pathogènes présents ont été comparés à ceux obtenus à partir de l'extraction d'ADN des tiques prélevées sur les chevreuils dans ce même département.

2.3. Séroprévalence de *Bbsl* chez les chevreuils comme proxy de l'incidence humaine

Pour tester les hypothèses 6 et 7, nous nous sommes servis des sérums de chevreuils fournis par les FDC pour les départements du Jura (2017-2023), de la Creuse (2018-2023) et du Nord (2017-2023). Les taux d'incidence humaine au niveau de la Franche-Comté, du Limousin et du Nord-Pas-de-Calais ont été également utilisés.

2.3.1. Test ELISA

Le protocole du test ELISA, établi lors de la thèse d'Ollivier, a été utilisé pour détecter la présence de *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* et *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Les kits d'analyses immunologiques BORRELIA + VISe IgG ELISA TECAN, conçus pour les humains, ont été adaptés pour le chevreuil. L'anticorps secondaire anti-IgG humain a été substitué par un conjugué, ici un anticorps de lapin (anti-IgG de chevreuil) marqué par la peroxydase.

Le test ELISA était un ELISA indirect (**Figure 11.**) : un lysat de *Borrelia* tapisse les puits. Après ajout des sérums de chevreuils, les anticorps dirigés contre *Borrelia* se fixent au lysat. Après 1h d'incubation à 37°C et plusieurs lavages, le conjugué s'accroche à l'anticorps cible s'il est présent. Une nouvelle incubation est faite durant 30 minutes. Après plusieurs lavages, un substrat colorimétrique est ajouté et réagit avec la peroxydase. Une mesure photométrique de l'intensité de coloration à 450 nm est effectuée dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction. Les valeurs de Densité Optique (DO) des échantillons sont obtenues et corrigées par rapport à la moyenne des deux témoins négatifs du kit. Le protocole complet est précisé en **Annexe 4**.

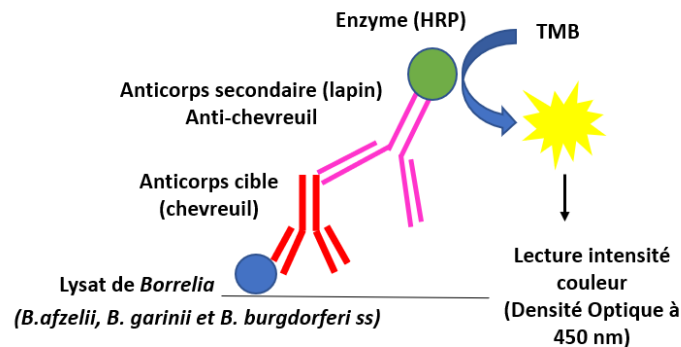


Figure 11. Principe ELISA par méthode de détection indirecte (Ollivier, 2023)

Une gamme étalon est produite avec les valeurs de DO d'échantillons de sang sur buvards de chevreuils des Vosges. Ces échantillons ont été analysés par le LDV88 en 2018 (Ollivier, 2023), les valeurs de DO sont donc connues. Cette courbe standard permet de vérifier la précision et la fiabilité du test ELISA.

2.3.2. Calcul du seuil de séropositivité

Le seuil du test (valeur de densité optique au-delà de laquelle on considère que l'individu est séropositif) a été déterminé à partir du même modèle statistique de mélange utilisé dans la thèse d'Ollivier, 2023.

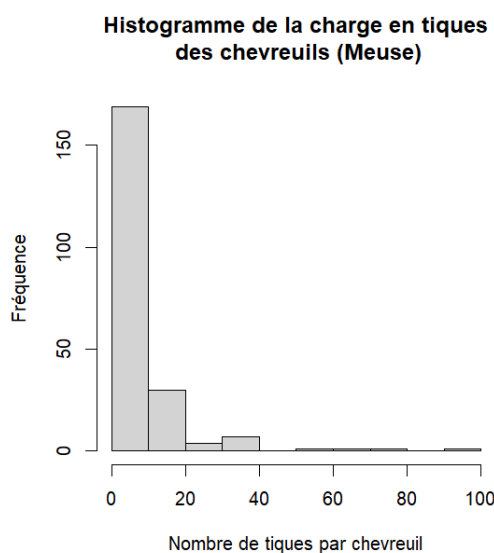
PARTIE 3. RESULTATS

L'analyse des données a porté dans un premier temps sur une analyse descriptive des données de la distribution des tiques et de la borréliose, à l'aide des données obtenues lors du travail de thèse d'Ollivier (2023) et des différentes bases de données utilisées (CiTIQUE, Santé Publique France, IGN). Nous présentons ensuite les résultats portant sur l'analyse moléculaire des tiques identifiées, puis à l'analyse sérologique des sérums de chevreuils.

1. Les populations de chevreuil comme indicateur du risque

1.1. Charge en tiques du chevreuil

L'histogramme de la charge en tiques des 265 chevreuils de la Meuse a permis de visualiser la distribution des données. En calculant le 80^{ème} percentile, on remarque que 80% des chevreuils ont une charge entre 0 et 10 tiques.



*Figure 12. Distribution de la charge en tiques des chevreuils de la Meuse
(source : Personnelle, d'après la base de données CHEVREUIL)*

1.1.1. Domaine vital du chevreuil

Le lien entre le pourcentage de forêt dans le domaine vital et la charge en tiques des chevreuils n'est statistiquement pas significatif (p -value = 0.7057). De ce fait, le pourcentage de forêt ne semble pas, dans notre modèle, être un bon prédicteur de la charge en tiques sur chevreuil (**Figure 12.**). L'hypothèse de la question 1 n'est pas validée.

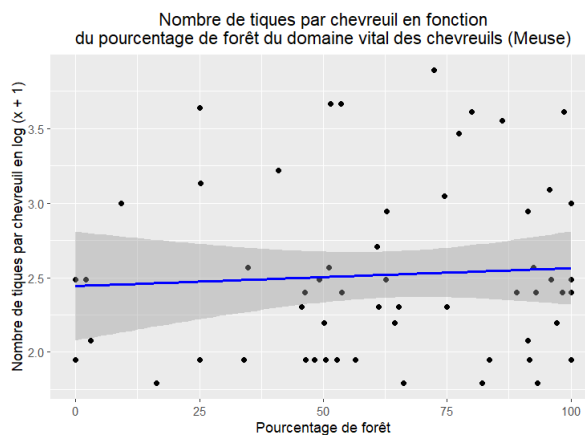


Figure 13. Charge en tiques par chevreuil (log) en fonction du pourcentage de forêt de leur domaine vital (Meuse)

1.2. Piqûres de tiques chez l'humain et abondance relative des chevreuils

Pour la Creuse, le Jura et le Nord, aucune relation statistiquement significative n'est constatée (respectivement : la p-value est égale à 0.548 ; 0.324 et 0.944) entre le nombre de signalement de piqûres de tiques chez l'humain et l'abondance relative des chevreuils (p-value > 0.05). L'illustration de la régression linéaire entre le nombre de signalements de piqûres de tiques et l'abondance relative des chevreuils des trois départements est donné en exemple ci-dessous (**Figure 12**). L'hypothèse de la question 2 n'est donc pas validée.

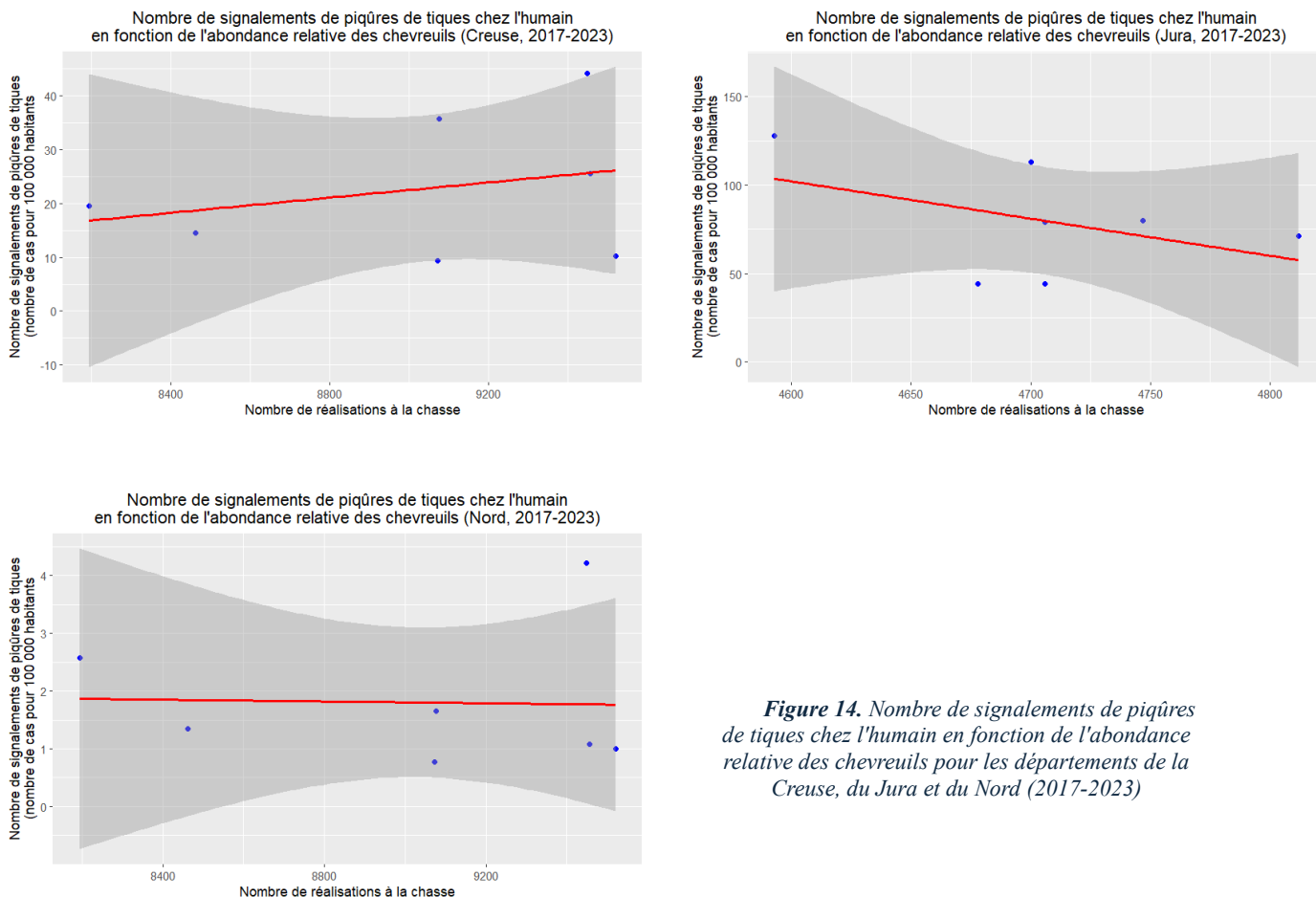


Figure 14. Nombre de signalements de piqûres de tiques chez l'humain en fonction de l'abondance relative des chevreuils pour les départements de la Creuse, du Jura et du Nord (2017-2023)

1.3. Incidence de la maladie de Lyme chez les humains et abondance relative des chevreuils

Pour le Jura, une corrélation statistiquement significative est montrée entre l'abondance relative des chevreuils et l'incidence humaine (p -value = 0.0311), contrairement à la Creuse et au Nord (respectivement, les p -values sont de 0.879 et de 0.0778). Selon notre modèle et pour le Jura, plus l'abondance relative des chevreuils est élevée et plus le taux d'incidence humaine augmente. L'hypothèse de la question 3 est donc validée pour le Jura.

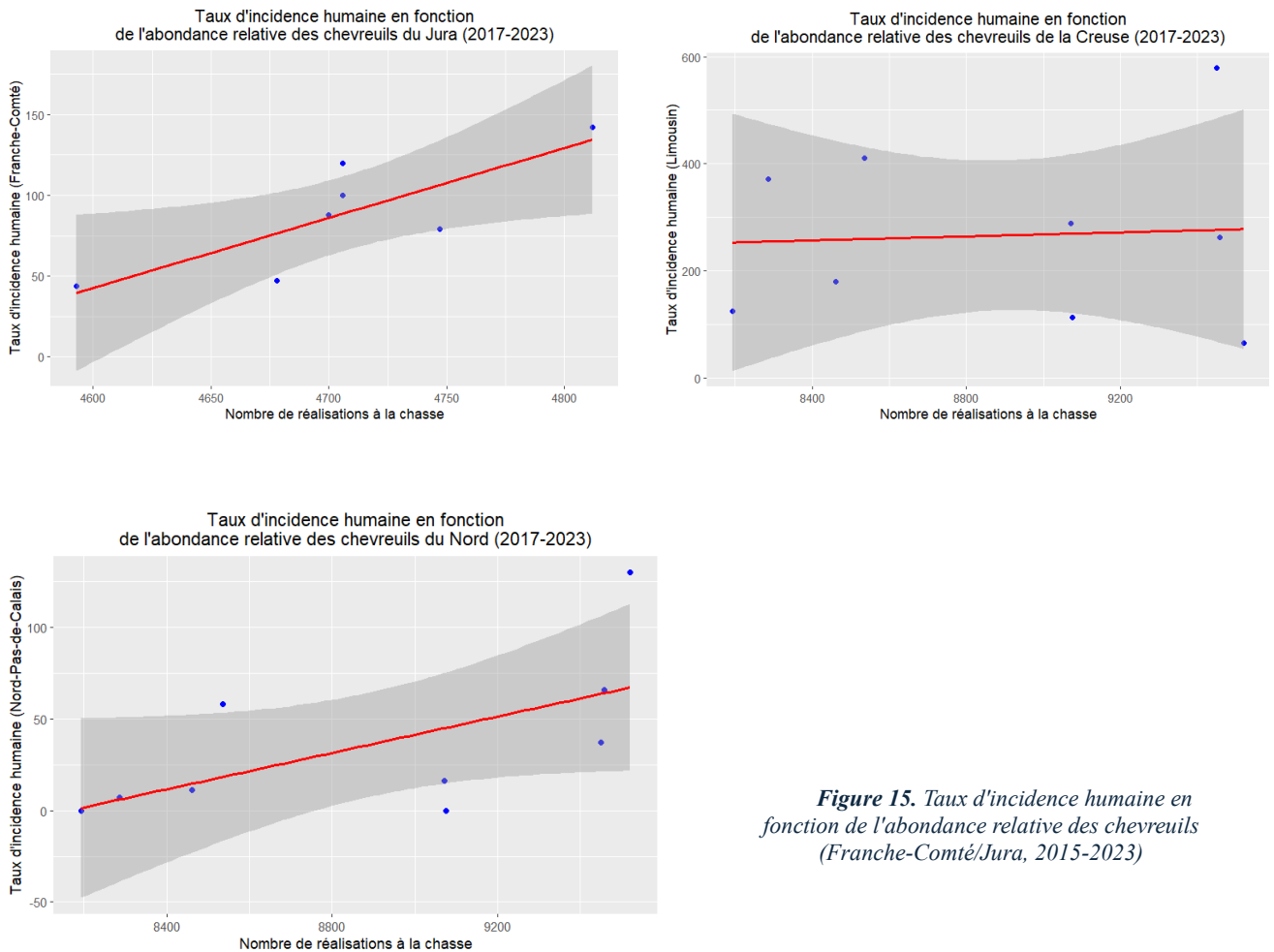


Figure 15. Taux d'incidence humaine en fonction de l'abondance relative des chevreuils (Franche-Comté/Jura, 2015-2023)

2. Les tiques comme indicateur du risque

2.1. Agents pathogènes détectés chez les tiques de la Meuse

L'efficacité de la PCR microfluidique a été vérifiée grâce au design témoin *Escherichia coli*, positif pour chaque échantillon, ce qui valide l'absence d'inhibition de la PCR. Cependant, seulement 29/285 échantillons sont positifs pour le design *Tique spp 16S* et 135/285 échantillons sont positifs pour le design *Ixodes ricinus ITS2*. Le **Tableau 3.** ci-dessous répertorie les agents pathogènes retrouvés positifs dans l'ADN extrait des tiques de la Meuse.

Agent pathogène	Nombre d'échantillons positifs / 285	Prévalence (%)
<i>Borrelia miyamotoi</i>	2	0.7
<i>Ehrlichia spp.</i>	4	1.4
<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	4	1.4
<i>Rickettsia helvetica</i>	39	13,7
<i>Rickettsia felis</i>	2	0.7
<i>Coxiella burnettii</i> ¹⁶	11	3.9
<i>Apicomplexa</i>	2	0.7
<i>Babesia venatorum</i>	2	0.7

Tableau 3. Liste des agents pathogènes identifiés dans les extraits d'ADN de tiques (Meuse)

Du fait de ces résultats, l'analyse a été poursuivie uniquement pour *R. helvetica*. En comparant avec les données de CiTIQUE, on observe que les tiques provenant de la Meuse, ayant piqué des humains qui les ont signalées et envoyées pour analyse, ont une prévalence d'environ 9% pour *R. helvetica*. En revanche, aucun des agents pathogènes du **Tableau 3**. n'a été détecté par CiTIQUE. L'hypothèse de la question 4 a été testée : on retrouve *R. helvetica* chez les tiques sur chevreuils et les tiques sur humains.

2.2. Prévalence et niveau d'engorgement

2.2.1. Comparaison entre nymphes gorgées et non gorgées pour la présence de *R. helvetica*

	Nymphes non gorgées	Nymphes gorgées
Absence de <i>R. helvetica</i>	73	174
Présence de <i>R. helvetica</i>	14	24

Tableau 4. Engorgement des nymphes selon l'absence ou la présence de *R. helvetica*

Le test du Khi² montre que les variables sont indépendantes (p-value = 0.4722), la prévalence de *R. helvetica* ne varie pas en fonction de l'engorgement des nymphes infectées. L'hypothèse de la question 5 n'est pas validée, les nymphes gorgées n'ont pas une plus forte prévalence pour *R. helvetica*.

3. La séroprévalence comme indicateur du risque

3.1. Séroprévalence chez le chevreuil et incidence humaine

Sur la période 2017-2023, la séroprévalence moyenne des chevreuils pour *Bbsl* est de 45,2% pour la Creuse, 25,6% pour le Jura et 72,5% pour le Nord. Pour le Jura, une corrélation négative significative existe entre la séroprévalence des chevreuils du Jura et le taux d'incidence humaine en Franche-Comté (p-value = 0.019), contrairement pour la Creuse (p-value = 0.621) et le Nord (p-value = 0.901) (**Figure 16**).

¹⁶ *C. burnettii* est un endosymbionte c'est-à-dire un micro-organisme qui vit à l'intérieur d'une autre cellule ou d'un autre organisme. (<https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/11135/endosymbionte>)

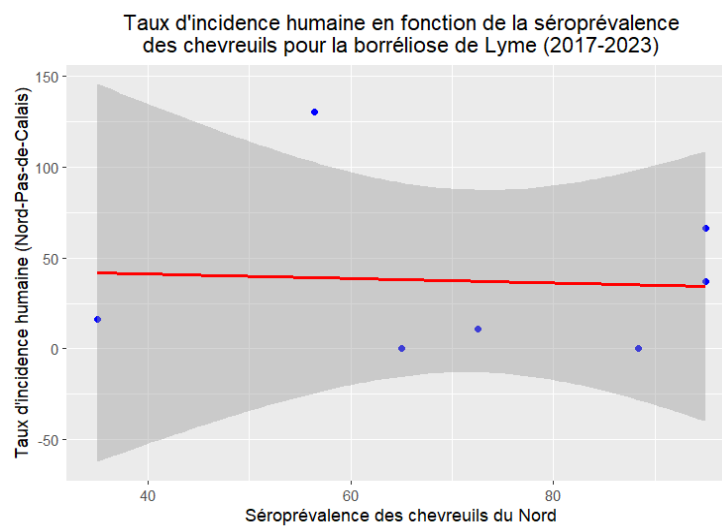
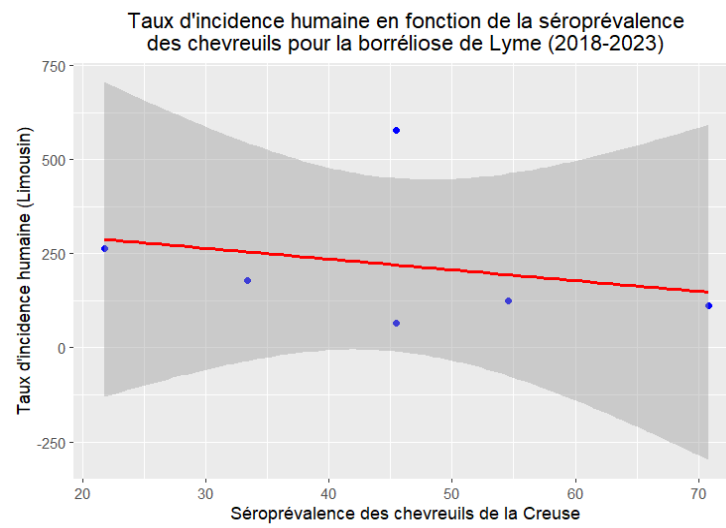
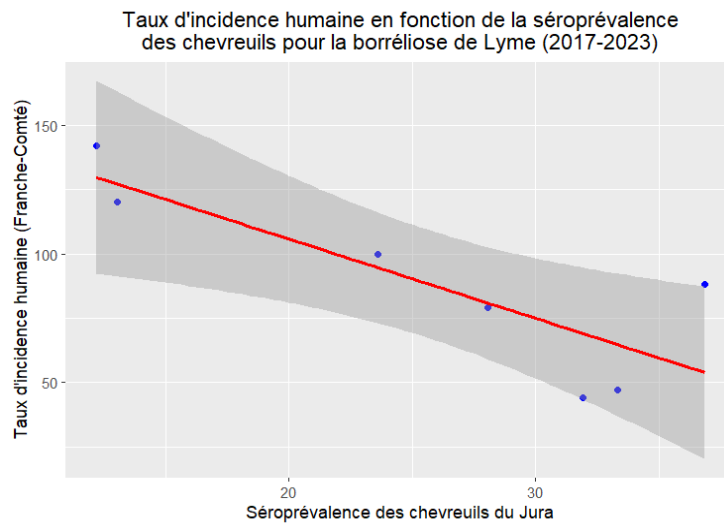


Figure 16. Incidence humaine en fonction de la séroprévalence des chevreuils (Jura, Creuse, Nord)

Ces séroprévalences ont ensuite été comparées aux taux d'incidence humaine à l'échelle des anciennes régions en fonction du temps. L'hypothèse de la question 6 est validée pour le Jura, il semble y avoir une corrélation entre les deux variables (**Figure 17**).

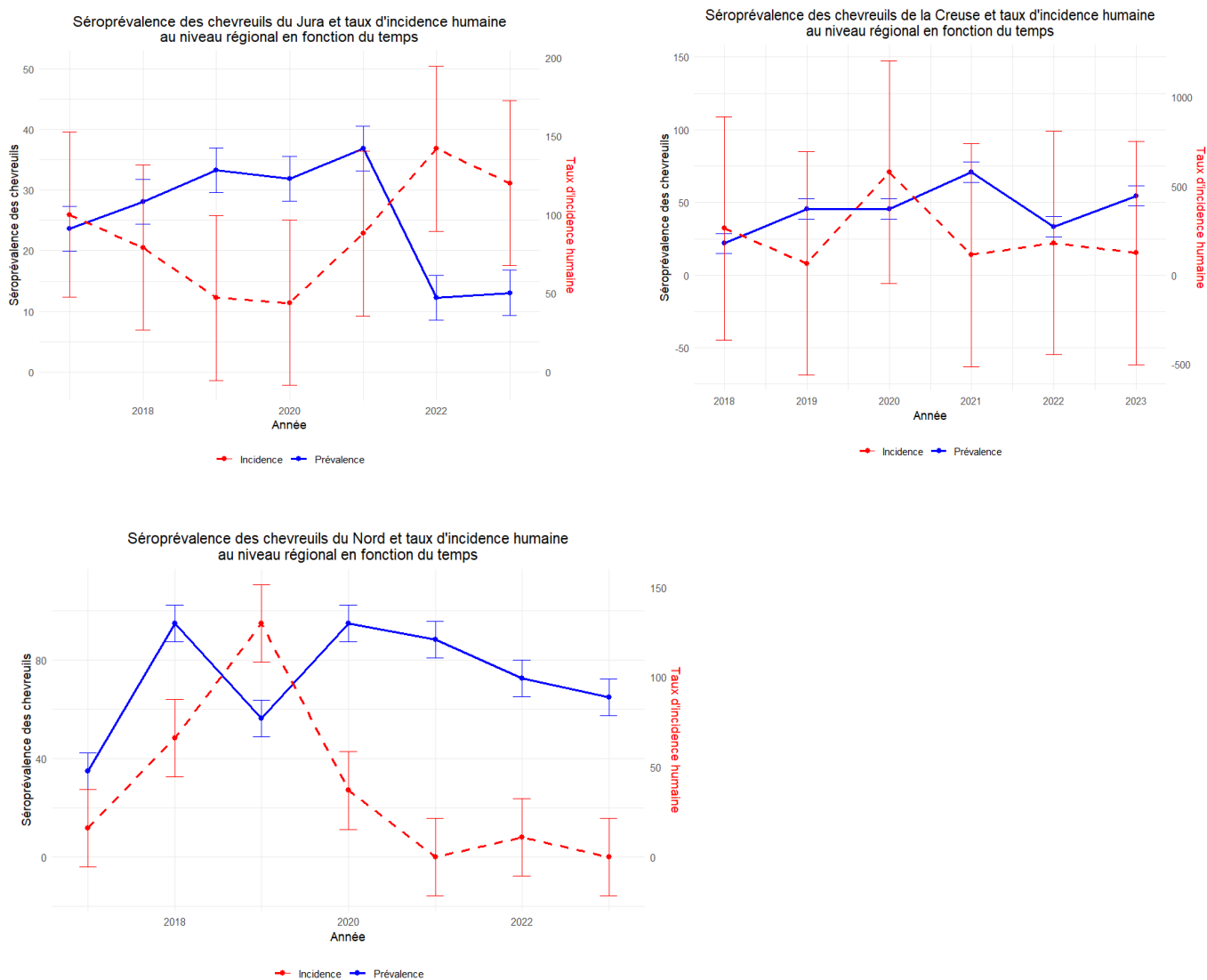


Figure 17. Séroprévalence des chevreuils de la Creuse, du Jura et de Nord en fonction de l'incidence humaine au niveau régional

3.2. Séroprévalence chez les chevreuils et abondance relative de leurs populations

La p-value obtenue après régression linéaire étant supérieure à 0.05 pour la Creuse, le Jura et le Nord (respectivement 0.703, 0.159 et 0.608), l'abondance relative des chevreuils n'a donc pas d'effet significatif sur la séroprévalence de ces cervidés (**Figure 18**). L'hypothèse de la question 7 n'est donc pas validée.

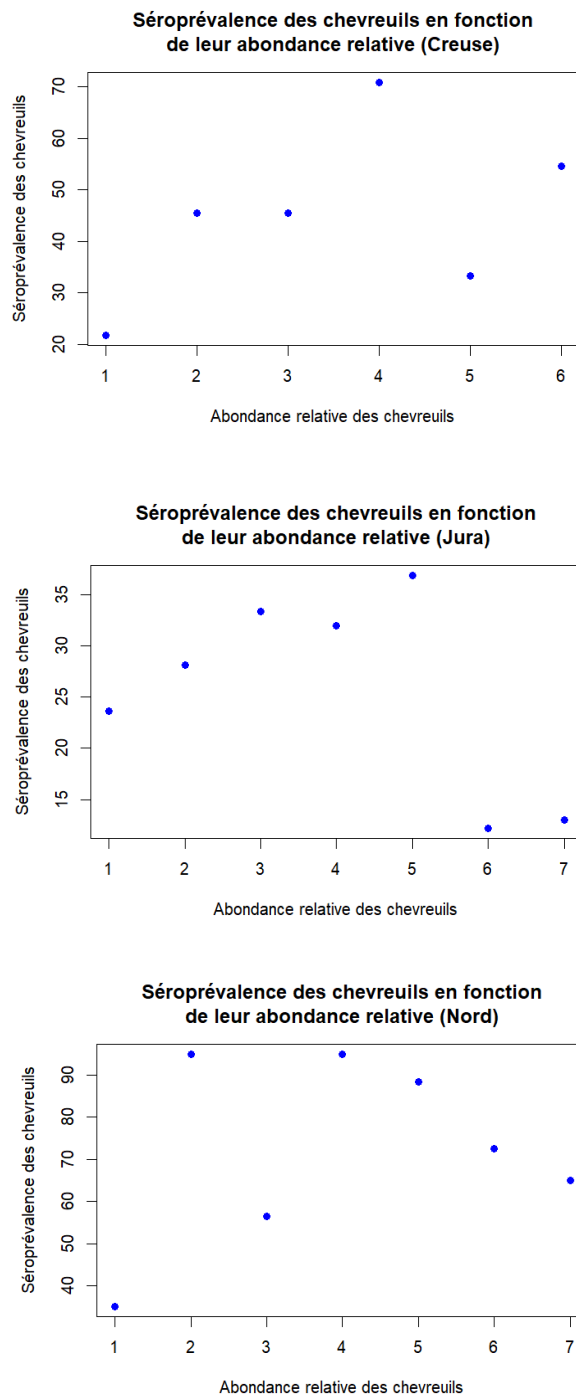


Figure 18. Séroprévalence des chevreuils de la Creuse, du Jura et du Nord en fonction de l'abondance de leur population

PARTIE 4. DISCUSSION

Dans cette partie, nous interpréterons les résultats précédemment présentés, en soulignant les principales difficultés rencontrées. Nous proposerons également des pistes d'amélioration pour approfondir les connaissances sur la faune sauvage, en particulier le chevreuil, en tant qu'indicateur du risque de contamination de l'humain par la borréliose de Lyme.

1. Etat de l'art

L'état de l'art concernant l'utilisation de la faune sauvage comme indicateur pour étudier et surveiller la circulation d'agents pathogènes à risque pour l'humain reste particulièrement sous-exploré. Bien qu'il existe diverses publications décrivant les tiques et leurs vecteurs, les recherches portant spécifiquement sur l'emploi de la faune sauvage comme marqueur d'un risque sanitaire demeurent nettement plus rares. Ce champ de recherche est encore très récent autour de la maladie de Lyme, qui jusqu'à récemment était mal comprise et peu reconnue par le système de santé.

La complexité de cette maladie réside dans la difficulté de son diagnostic car elle se manifeste par une diversité de symptômes qui peuvent être confondus avec ceux d'autres pathologies, et qui varient d'un patient à l'autre. Sur-diagnostiquée pour une part des médecins, sous-diagnostiquée pour une autre, cela alimente une controverse persistante, contribuant à l'aspect ambigu et méconnue de la maladie. Par exemple, la borréliose de Lyme est parfois considérée comme une maladie infectieuse aisément diagnostiquée et traitée, tandis que d'autres la voient comme une maladie chronique lourdement invalidante (Massart, cité dans Puppo et Préau, 2019).

Notre étude s'inscrit dans ce contexte, soulevant de nombreuses questions et mettant en lumière des zones d'ombre qui n'ont jusqu'à présent été pleinement explorées. En conséquence, les résultats obtenus nécessitent une interprétation prudente et nuancée.

2. Limites du projet

2.1. Participation des départements

Tous les départements n'ont pas répondu favorablement à notre demande de participation au projet pour estimer la séroprévalence des chevreuils, soit en raison du faible nombre de sérums prélevés par an, soit parce qu'ils n'ont pas répondu favorablement à notre demande. Ensuite, parmi les trois départements sélectionnés, deux représentent des cas extrêmes : la Creuse, qui est le deuxième département le moins peuplé de France et un véritable désert médical, et le Nord, département le plus peuplé de France. Cette disparité complique l'interprétation des résultats. Enfin, nous ne disposons pas d'un département témoin relativement peu favorables à l'implantation d'*I. ricinus*, et donc de l'infection possible par *Bbsl*, comme l'Hérault (**Annexe 1.**), pour comparer les résultats avec nos autres départements.

2.2. ADN dégradé extrait des tiques

La qualité des tiques peut expliquer la très faible quantité d'ADN retrouvé par PCR microfluidique. Cela peut être dû aux congélations et décongélations successives qui ont eu lieu depuis leur collecte (2019-2022) jusqu'à leur manipulation pour cette étude, les rendant particulièrement desséchées. Le broyage a également pu contribuer au problème de faible quantité d'ADN. En effet, les tubes contenant les nymphes à broyer n'étaient pas adaptés par

rapport au protocole en place (apparition de fissures lors de l'utilisation de Precellys). Le protocole a donc été ajusté et optimisé afin d'obtenir un broyat aussi homogène que possible et ainsi maximiser la quantité d'ADN récupérée. Toutefois, cette optimisation pourrait ne pas avoir été entièrement suffisante. Pour de futures études, il est donc recommandé d'identifier rapidement les tiques fraîchement collectées et de réaliser l'extraction d'ADN en suivant.

3. Les populations de chevreuils, un indicateur du risque ?

3.1. Abondance relative des populations de chevreuils

3.1.1. En fonction du nombre de signalement de piqûres humaines

D'après les résultats obtenus, l'évolution des populations de chevreuils ne semble pas avoir d'incidence sur le nombre de signalements de piqûres de tiques dans les trois départements analysés. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces résultats :

- **Densité des chevreuils** : des études expérimentales ont démontré que la densité de chevreuils influe positivement sur la présence des tiques dans l'environnement (Ginsberg et al., 2004 ; Agoulon et al., 2015). Par exemple, l'utilisation d'enclos a permis de bloquer l'accès des chevreuils à certaines zones, l'abondance des tiques s'y révélant alors plus faible. En conséquence, plus les tiques sont nombreuses dans l'environnement, plus le risque de piqûres chez les humains augmente. Dans notre étude, nous n'avons pas cette corrélation. Il est possible qu'à l'échelle du département, les densités de chevreuils sont lissées et ne permettent pas d'avoir suffisamment de variabilité au sein de ces populations.
- **Densité faunistique** : d'autres hôtes, tels que les rongeurs, pourraient également influencer le nombre de tiques dans l'environnement et, par conséquent, le nombre de signalements de piqûres chez l'humain. En effet, une étude montre que la densité de tiques est dépendante de la glandée de l'année n-2, qui influe sur la densité de rongeurs (Perez et al., 2020).
- **Autres facteurs d'influence** : les signalements de piqûres de tiques peuvent être davantage liés à des facteurs comportementaux humains (temps passé à l'extérieur, pratiques de protection contre les tiques, sensibilisation au risque de piqûres) ou à des facteurs environnementaux (climat, végétation), qu'à l'évolution des populations de tiques amenées par les chevreuils. Concernant les facteurs environnementaux, des études ont montré l'existence d'une saisonnalité dans les piqûres de tiques, avec un nombre accru de piqûres chez les humains en été (Kurtenbach et al., 2006 et Agoulon et al., 2015). Diverses publications explorent également l'utilité de facteurs climatiques, tels que la température moyenne quotidienne ou le point de rosé, comme indicateur du risque de piqûre (Hilami et al., 2024). Pour les facteurs comportementaux, toutes les piqûres ne sont pas systématiquement signalées par les personnes affectées, soit parce qu'elles ne jugent pas nécessaire de le faire, soit parce qu'elles ne réalisent pas qu'elles ont été piquées ou bien car elles ne connaissent pas les dispositifs mis en place pour le faire (application Signalement TIQUE, par exemple). De plus, la sensibilisation du grand public au risque de piqûres et la conscience des symptômes qui y sont associés doit encore être renforcée. Bien qu'en hausse par rapport à 2016, encore 21% de la

population française déclarait en 2019 n'avoir jamais entendu parler de cette maladie¹⁷, selon Santé Publique France. On peut donc supposer que ceux qui ignorent l'existence de la borréliose de Lyme sont également peu informés sur le problème des piqûres de tiques.

- **Méthode de mesure des populations** : l'abondance relative des populations de chevreuils a été estimée en s'appuyant sur les plans de chasse transmis par les FDC. Le nombre de réalisations a été utilisé comme approximation de l'évolution de l'abondance relative des populations de chevreuils. Bien que cette méthode ne soit pas validée scientifiquement, elle est souvent la seule donnée disponible en France pour évaluer l'abondance des populations du chevreuil (Dutraive, 2019). Actuellement, plusieurs méthodes de suivi existent concernant cette espèce : les comptages nocturnes dans les milieux ouverts, l'Indice Kilométrique d'Abondance (IKA) pédestres dans les milieux forestiers, le suivi des réalisations des plans de chasse (carnet de battue, poids des chevillards et animaux prélevés à la chasse, etc.) ou encore le suivi des dégâts¹⁸. La méthode choisie pour cette étude n'est peut-être pas la plus fiable pour déterminer l'évolution des populations de chevreuils.

En conclusion, la méthode utilisée pour estimer l'abondance relative des populations de chevreuil ainsi que la sous-déclaration potentielle des piqûres de tiques pourraient masquer une relation potentielle entre l'abondance des chevreuils et les signalements de piqûres de tiques chez les humains. Ces hypothèses mériteraient d'être explorées plus en profondeur pour mieux comprendre les dynamiques en jeu et identifier les facteurs qui influencent réellement le risque de piqûres de tiques humaines dans ces zones d'études. Dans l'hypothèse que les personnes piquées soient mieux sensibilisées au risque de piqûres et les signalent davantage, travailler à plus petite échelle (communale, par exemple) pourrait offrir une plus forte variabilité des populations de chevreuils et ainsi, permettrait la comparaison avec les signalements de piqûres.

3.1.2. En fonction du taux d'incidence humaine au niveau régional

Les résultats obtenus suggèrent que l'évolution des populations de chevreuils du Jura influence le taux d'incidence humaine de la Franche-Comté. Cependant, il convient de traiter cette conclusion avec prudence. En effet, si nous avions eu les données nécessaires à l'échelle départementale, peut-être que les comparaisons auraient été différentes pour le Jura mais également pour la Creuse ou le Nord. De la même manière, des données sur une période plus longue aurait permis d'avoir un recul intéressant sur ces évolutions.

4. Les tiques des chevreuils, un indicateur pertinent ?

4.1. Broyage et extraction d'ADN extrait des tiques

Parmi les 47 agents pathogènes recherchés dans l'ADN extrait des nymphes, seules *R. helvetica* (13,68%) et *R. felis* (0,70%) ont été confirmées par séquençage. D'après la littérature, *R. helvetica* figure parmi les espèces les plus fréquemment détectées, aux côtés d'*Anaplasma phagocytophilum*, dans les tiques prélevées sur les chevreuils (Lejal et al., 2019). Les rongeurs sont principalement identifiés comme réservoirs de cette bactérie, bien que les cervidés, dont le

¹⁷ <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2023/borreliose-de-lyme-et-prevention-des-piqures-de-tiques-ou-en-est-on-en-france>

¹⁸ https://www.nord.gouv.fr/contenu/telechargement/15965/98566/file/Sch%E9ma_59_gestion_cynegetique.pdf

rôle reste à confirmer, soient également suspectés. Comme pour *Bbsl*, il se pourrait que le chevreuil ne joue pas un rôle dans le cycle de vie de *R. helvetica*. (Overzier et al., 2013 ; Boyard, 2014 ; Perez et al., 2020). Toutefois, de récentes études se sont intéressées à l'utilisation du chevreuil comme indicateur potentiel pour mieux comprendre la circulation de cet agent infectieux à travers la détection des anticorps spécifiques contre cette bactérie (Barradas et al., 2024). D'autant plus que *R. helvetica* a été détectée dans les tiques ayant piqué des humains. Cela peut suggérer un risque de transmission de la bactérie des tiques parasitant les chevreuils vers l'être humain, ce qui soulève une problématique de santé publique.

Au regard des analyses statistiques, la charge en tiques des chevreuils n'a pas d'influence significative sur la présence de *R. helvetica*. Cette observation suggère que le chevreuil n'est probablement pas réservoir pour cette bactérie, d'autres hôtes que le chevreuil pourraient jouer un rôle plus important dans sa transmission. Par ailleurs, aucun lien significatif n'a été trouvé entre le niveau d'engorgement des nymphes et la présence de *R. helvetica*. Cela pourrait être attribué à une transmission principalement trans-ovarienne suspectée chez *I. ricinus*, comme le suggère une prévalence similaire dans les trois stases de la tique (Sprong, cité dans Perez et al, 2020). Cette observation renforce l'idée que le chevreuil ne serait pas un réservoir pour *R. helvetica*. De ce fait, la tique qui effectue son repas de sang sur le cervidé n'acquerrait donc pas la bactérie. On peut supputer que le système immunitaire du chevreuil affecter *R. helvetica* de manière similaire à ce qu'on observe avec *Bbsl*.

En ce qui concerne *Bbsl*, aucune séquence ADN n'a été détectée dans les échantillons, qu'ils s'agissent de nymphes gorgées ou non gorgées. Il est toutefois difficile de croire que ces échantillons en soient totalement indemnes, d'autant plus que les sérums des mêmes chevreuils avaient montré une séroprévalence d'environ 49% pour *Bbsl* (Ollivier, 2023). Cette absence de détection peut donc s'expliquer par la très faible quantité d'ADN présente dans les échantillons.

5. L'approche sérologique, pertinence de l'indicateur du risque

5.1. Sérothèque et test ELISA

De façon surprenante, les tests ELISA ont révélé une séroprévalence moyenne de *Bbsl* chez les chevreuils du Nord qui est presque 1,6 fois plus élevée que celle de la Creuse et près de trois fois supérieure à celle observée dans le Jura. Cela va à l'encontre des attentes que nous avons, étant donné la superficie forestière de ces départements. En effet, d'après la littérature, chevreuils et tiques préfèrent les zones boisées mixtes dominées par les feuillus (Gilot et al., 1994). Or, le Nord est le département avec la plus faible superficie forestières (**Tableau 2**).

Département	Séroprévalence moyenne (%)	Superficie forestière (%)	Part des feuillus (%)
Creuse	45,2	28,7	70
Jura	25,6	49,2	70
Nord	72,5	10,9	93

Tableau 5. Part des séroprévalences de *Bbsl* chez les chevreuils et superficie forestière des départements étudiés¹⁹

¹⁹ https://draaf.bourgogne-franche-comte.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Presentation_de_la_foret_cle8bc5d9.pdf ; https://inventaire-forestier.ign.fr/IMG/pdf/IFN_Publi_2010_Nord-PDC.pdf ; https://inventaire-forestier.ign.fr/IMG/pdf/Tome_E.pdf

Cette forte séroprévalence pourrait être attribuée au climat océanique du Nord, qui favorise la prolifération des tiques. Ce climat se caractérise par des hivers doux et pluvieux ainsi que des étés frais, créant des conditions propices à la survie d'*I. ricinus* tout au long de l'année. En hiver, les tiques peuvent éviter la diapause, et l'humidité relative durant l'été aide à supporter les températures plus élevées. De plus, les chevreuils dont les sérums ont été analysés ont été principalement chassés durant l'hiver. Finalement, les tiques du Nord sont peut-être plus actives en hiver que celles de la Creuse sur la même saison, ce qui pourrait expliquer la variation de la séroprévalence moyenne entre les différents départements étudiés.

En outre, le paysage du Nord, composé majoritairement de dunes, de zones humides et de plaines agricoles parsemées de petits bocages, ne correspond pas aux habitats forestiers privilégiés par les chevreuils (zones de transition où alternent espaces boisés et ouverts). Toutefois, les facultés d'adaptation des chevreuils leur permet d'exploiter divers milieux, y compris ceux présents dans le Nord, où leur domaine vital peut inclure jusqu'à 60% de plaines agricoles²⁰. Enfin, même si la superficie forestière du Nord est réduite, elle se compose très majoritairement de feuillus²¹, habitat propice à la prolifération des tiques.

Une autre hypothèse pourrait être la forte fragmentation des habitats naturels dans le Nord, ce qui pourrait concentrer les interactions entre chevreuils, tiques et hôtes réservoirs (tels que les rongeurs), augmentant ainsi la transmission de *Bbsl*. La combinaison de ces facteurs pourrait expliquer la forte séroprévalence de *Bbsl* des chevreuils du Nord.

L'interprétation des résultats doit également tenir compte des différents réactifs mis à disposition, de la sensibilité des kits et de la répétabilité des manipulations. Les différents éléments à considérer sont répertoriés et détaillés dans le **Tableau 5**. ci-dessous :

Point d'achoppement et élément à prendre en compte	Commentaire
Conjugué enzymatique	<p>Les plaques ELISA n'ont pas toutes utilisé le même conjugué enzymatique. En effet, après avoir testé les sérums du Jura, les faibles prévalences obtenues (< 30%) ont été attribuées à la qualité du conjugué, probablement affectée par les congélations et décongélations répétées, l'échantillon étant particulièrement sensible à ces variations de températures.</p> <p>Nous avons dû en commander de nouveaux en veillant à respecter strictement la chaîne du froid puis avons décidé de les conserver au réfrigérateur plutôt qu'au congélateur. Finalement, les sérums du Jura ont été réanalysés avec ces nouveaux conjugués : la séroprévalence moyenne étant similaire, aucun problème n'a été constaté sur les conjugués enzymatiques utilisés.</p>
Echantillons standards	<p>Les échantillons standards A, B et C mis à disposition, et dont les valeurs de DO étaient connues, ont été utilisés initialement pour établir une gamme étalon de concentration en anticorps supposée linéaire.</p>

²⁰ https://www.nord.gouv.fr/contenu/telechargement/15965/98566/file/Sch%E9ma_59_gestion_cynegetique.pdf

²¹ https://inventaire-forestier.ign.fr/IMG/pdf/PubDep/59-nord/ifn_59_3_nord_2000.pdf

	<p>Cependant, les concentrations obtenues se sont révélées non linéaires et peu répétables d'une plaque à l'autre. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'échantillons de sang sur buvards dont les valeurs de DO étaient connues et provenant de la thèse d'Ollivier, pour constituer notre propre gamme étalon.</p> <p><u>Exemple d'échantillons de sang sur buvard choisis :</u> $A' = 0,705$ $B' = 1.038$ $C' = 2.799$</p>								
Répétabilité	<p>Après avoir utilisé des échantillons de sang sur buvard pour construire notre gamme étalon linéaire croissante, nous avons eu à deux reprises des valeurs de DO incohérentes. Par exemple :</p> <table> <tr> <td>DO connues :</td> <td>DO observées :</td> </tr> <tr> <td>$A' = 0,705$</td> <td>$A' = 3,121$</td> </tr> <tr> <td>$B' = 1.038$</td> <td>$B' = 1,504$</td> </tr> <tr> <td>$C' = 2.799$</td> <td>$C' = 3,305$</td> </tr> </table>	DO connues :	DO observées :	$A' = 0,705$	$A' = 3,121$	$B' = 1.038$	$B' = 1,504$	$C' = 2.799$	$C' = 3,305$
DO connues :	DO observées :								
$A' = 0,705$	$A' = 3,121$								
$B' = 1.038$	$B' = 1,504$								
$C' = 2.799$	$C' = 3,305$								
Dilution	<p>Lors de la nouvelle analyse des sérums du Jura, les prévalences observées sont restées similaires. Une des hypothèses avancées était que la dilution au 101^{ème} était peut-être trop forte, ce qui pourrait expliquer ces résultats.</p> <p>La dilution a donc été réadaptée et les sérums de la Creuse et du Nord ont été utilisés purs. Etant donné les trop faibles quantités restantes de sérums du Jura, nous n'avons pas pu tester ces échantillons sans dilution. Toutefois, quelques barrettes d'une plaque ELISA a servi à tester une dilution au 1/2 et sans dilution sur des échantillons de la Creuse : les valeurs de DO étaient très similaires. Pour simplifier les manipulations et gagner du temps, les sérums ont donc été utilisés purs.</p>								
Manipulateur	<p>Au vu du temps imparti, deux des trois plaques du Nord ont été faites par une des techniciennes du LDV88, ce qui peut créer un biais de manipulation.</p>								

Tableau 6. Interprétation de l'analyse sérologique

De ce fait, les différentes plaques ELISA n'ont pas été réalisées dans des conditions expérimentales totalement identiques : l'ajustement des dilutions, les variations dans les échantillons standard ou les différents conjugués enzymatiques utilisés sont d'autant de facteurs qui doivent être pris en compte et expliquent les variabilités inter-plaques potentielles.

5.2. Comparaison avec taux d'incidence humaine, comparabilité des échelles et année « exceptionnelle »

La corrélation négative entre la séroprévalence des chevreuils du Jura et le taux d'incidence humaine en Franche-Comté est à la fois surprenante et inattendue. Nous nous attendions plutôt à une corrélation positive ou à l'absence de corrélation. Au regard de l'écologie des tiques et de

la diversité de leurs hôtes, l'hypothèse avancée pour interpréter cette corrélation est celle de l'effet dilution des chevreuils. De manière générale, plus il y a d'espèces animales différentes et avec des propriétés de réservoirs spécifiques vis-à-vis d'un agent pathogène, plus celui-ci se trouve dilué parmi les hôtes vertébrés présents. Aux Etats-Unis, plusieurs études ont montré qu'une plus grande richesse d'espèces est associée à une plus faible circulation de *Bbsl* dans l'environnement (Ostfeld et Keesing, et Linske, cités dans Cosson, 2019).

En ce qui concerne les chevreuils, cette hypothèse repose sur le fait que les tiques vont se nourrir sur des hôtes non compétents, qui ne transmettent donc pas *Bbsl*. Ainsi, une augmentation du nombre de chevreuil entraîne une hausse du nombre de tiques se nourrissant de ces hôtes, réduisant la probabilité d'acquisition de *Bbsl*. En d'autres termes, dans des années où la population de tiques est faible, elles se concentrent sur un nombre limité d'hôtes, augmentant ainsi la probabilité de transmission de *Bbsl*. En revanche, lorsque la population de tiques est élevée, la diversité des hôtes augmente également, entraînant une répartition plus large des piqûres de tiques. Plus il y a de chevreuils, plus les tiques se nourrissent sur eux, ce qui dilue la transmission de l'agent pathogène, les chevreuils n'étant pas des hôtes compétents pour *Bbsl*. Cela pourrait expliquer pourquoi une augmentation du nombre de chevreuils, bien qu'accompagnée d'une augmentation de la population de tiques, peut paradoxalement conduire à une diminution de la prévalence de *Bbsl* chez les tiques. Cette dynamique souligne l'importance des interactions complexes entre les populations d'hôtes et de vecteurs dans la transmission des maladies infectieuses.

Néanmoins, l'effet de dilution reste un sujet de débat au sein de la communauté scientifique. Une étude récente suggère que cet effet serait en réalité très peu perceptible en Europe (Ruyts, cité dans Cosson, 2019). Notre analyse doit donc être considérée avec précaution, d'autant plus que les variables « séroprévalence » et « incidence » sont difficilement comparables. En effet, les sérums testés sont analysés à une échelle départementale, tandis que les taux d'incidence humaine sont traités à l'échelle des anciennes régions. Comparer des variables ayant des échelles géographiques différentes peut s'avérer délicat, cela peut introduire des biais d'interprétation. Les dynamiques locales de transmission de *Bbsl* peuvent varier considérablement d'un département à l'autre, ce qui n'est pas nécessairement reflété au niveau régional. De plus, l'agrégation des données à une échelle plus large peut masquer des variations locales importantes, rendant difficile l'établissement de corrélations précises entre les deux variables.

A titre d'exemple, le taux d'incidence humaine de la maladie de Lyme repose sur la participation des médecins généralistes au réseau Sentinelles. Dans le cas de la Creuse, zone géographique considérée comme médicalement déserte, seulement un à deux médecins ont recensé les cas de Lyme entre 2017 et 2021 et aucun médecin n'a pris le relais par la suite. Cette faible participation rend les données moins représentatives de la réalité épidémiologique du département, et plus largement de la région. Lorsque le nombre de médecins participants est limité, le calcul du taux d'incidence est fortement biaisé car il dépend de la vigilance et de l'effort d'investissement de ces quelques praticiens. Les cas de Lyme pourraient donc être sous-estimés, influençant ainsi la précision des taux d'incidence rapportés. Et en l'absence de données robustes et représentatives, les tendances observées à une échelle locale ne peuvent pas toujours être généralisées ou comparées à une autre, ce qui complique l'analyse et l'interprétation des résultats. Il est donc indispensable de tenir compte de ces différences d'échelles pour éviter de tirer des conclusions hâtives ou inexactes. De plus, il faut garder à

l'esprit que la borréliose de Lyme n'est pas une maladie à déclaration obligatoire, ce qui signifie que les chiffres estimés sont probablement bien en deçà de la réalité. A titre d'exemple, lorsqu'elle est devenue une maladie à déclaration obligatoire au Canada, le nombre de cas humains signalés est passé de 144 cas en 2009 à plus de 2 800 cas en 2021 (Tapsoba, 2023). On peut supposer la même évolution en France métropolitaine.

De plus, la participation des départements rend la généralisation d'une tendance encore plus difficile à proposer. Tout d'abord car peu de départements ont souhaité et/ou pu participer à l'étude, soit en raison du faible nombre de sérums prélevés par an, soit parce qu'ils n'ont pas répondu favorablement à notre demande. Ensuite, parmi les trois départements sélectionnés, deux représentent des cas extrêmes : la Creuse, qui est le deuxième département le moins peuplé de France et un véritable désert médical, et le Nord, département le plus peuplé de France. Cette disparité complique l'interprétation des résultats. Enfin, nous ne disposons pas d'un département témoin relativement peu favorables à l'implantation d'*I. ricinus*, comme l'Hérault (**Annexe 1.**), pour comparer les résultats avec nos autres départements.

Enfin, l'année 2020, marquée par la pandémie de Covid-19 rend difficile l'interprétation de ce genre d'analyses, en raison des comportements exceptionnels adoptés par la population française. En effet, durant cette période, les confinements ont profondément modifié les habitudes quotidiennes des gens. Ces derniers se sont mis à davantage sortir dans la nature durant les créneaux de sortie quotidienne. Parallèlement à ces sorties, les populations ont davantage pris le temps de renseigner leurs piqûres de tiques grâce à l'application Signalement TIQUE créée par CiTIQUE. Par exemple, de 2017 à 2023, le nombre de signalements dans le Nord est de 37 piqûres en moyenne alors qu'il en est recensé 110 en 2020, soit presque trois fois plus. A cela s'ajoute un autre effet : le nombre de cas diagnostiqués pour la borréliose de Lyme durant l'année 2020. Pour la Creuse et le Nord, un pic est largement visible concernant l'incidence humaine. Cette tendance peut s'expliquer par l'augmentation du nombre de personnes venues consulter un médecin sur cette période, pensant avoir le Covid. Lorsque les patients testés étaient négatifs au Covid, d'autres analyses ont dû être proposées pour trouver la cause des maux. De ce fait, davantage de personnes ont été diagnostiquées positives pour Lyme, augmentant conjointement les taux d'incidence pour *Bbsl*. Cela va en faveur de l'hypothèse comme quoi la maladie est sous-estimée au sein des populations. Cette année « exceptionnelle » pourrait constituer une anomalie dans les analyses épidémiologiques, nécessitant une prudence accrue lors de la comparaison avec d'autres années.

Pour toutes ces raisons, on ne peut donc pas confirmer l'existence réelle d'un lien entre l'incidence humaine et la séroprévalence des chevreuils pour *Bbsl*.

5.3. Comparaison de la séroprévalence des chevreuils et de leur abondance relative

L'abondance relative des populations de chevreuils ne semble pas influencer leur séroprévalence pour *Bbsl*. Nous nous attendions à avoir une corrélation négative entre les deux variables, ce qui aurait été en faveur de l'hypothèse « effet dilution » mentionnée dans la section précédente. La méthode de mesure de l'abondance relative des chevreuils pourrait masquer une relation potentielle entre ces deux variables.

6. Résumé des réponses aux questions de recherche

NUMERO	QUESTION DE RECHERCHE	RESUME REPONSES
1	Comment varie l'infestation par les tiques chez les chevreuils selon leur domaine vital ?	NON Pas de lien entre le pourcentage de forêt et la charge en tiques des chevreuils.
2	Y a-t-il une corrélation au fil du temps entre l'évolution des populations de chevreuils et les piqûres de tiques chez les humains ? Et si oui, à quelle échelle géographique ?	NON Aucune relation significative constatée entre les deux variables
3	Y a-t-il une corrélation entre l'abondance des chevreuils et l'incidence humaine de la borréliose de Lyme ?	OUI (pour le Jura) Plus l'abondance relative des chevreuils est élevée et plus le taux d'incidence humaine augmente pour le Jura/Franche-Comté
4	Est-ce que les agents pathogènes retrouvés dans les tiques des chevreuils sont les mêmes que ceux retrouvés dans les tiques piqueuses d'humain ?	OUI (pour <i>R. helvetica</i>) <i>(Résultats peu exploitables)</i>
5	Y a-t-il une différence de portage bactérien entre les tiques gorgées et celles qui ne le sont pas ? Voire entre niveaux d'engorgement ?	NON <i>(Résultat uniquement sur <i>R. helvetica</i>)</i>
6	Dans un département donné, est-ce que la séroprévalence de la borréliose chez les chevreuils est corrélée au taux d'incidence annuel humaine ?	OUI (pour le Jura) Corrélation négative
7	L'évolution des populations de chevreuils influence-t-elle la séroprévalence de la borréliose de Lyme chez ces cervidés ?	NON La variable « abondance relative » n'explique pas la variation de la variable « séroprévalence ».

Tableau 7. Réponses résumées aux hypothèses par question de recherche

CONCLUSION

Pour conclure, les résultats obtenus à travers les différentes approches descriptives, moléculaires et sérologiques de cette étude nous apportent un éclairage sur **l'influence de l'environnement** dans lequel évoluent les chevreuils. Contrairement à ce que suggère la littérature, il ne semble pas y avoir de lien entre la charge en tiques des chevreuils et la proportion de forêts mixtes dominées par des feuillus dans leur domaine vital, bien que ces zones soient associées à une plus forte densité de tiques. En ce qui concerne les **populations de chevreuils** : nos analyses n'ont pas révélé de relation claire avec le nombre de signalements de piqûres de tiques chez l'humain, ni avec la séroprévalence de la borréliose de Lyme chez ces cervidés. **L'utilisation des tiques** comme indicateur du risque nous a permis d'identifier un agent pathogène commun aux cervidés et aux humains : *R. helvetica*. En revanche, la comparaison entre nymphes gorgées et nymphes non gorgées n'a montré aucune différence quant à la présence de cette bactérie. Par ailleurs, la **séroprévalence** pour *Bbsl* des sérums de chevreuils du Jura, comparée au nombre de cas humain en Franche-Comté, a révélé une corrélation négative.

Ces résultats ne permettent pas de confirmer que le chevreuil possède des indicateurs fiables et pertinents pour étudier et surveiller la circulation des agents pathogènes transmis par les tiques, notamment pour *Bbsl*. Cette question reste très peu explorée dans la littérature, et l'utilisation du chevreuil comme indicateur du risque de borréliose de Lyme soulève finalement plus d'interrogations que de certitudes.

Toutefois, ce travail a permis de pointer du doigt les éléments cruciaux à considérer pour de futures recherches : l'abondance des populations de chevreuils en lien avec les signalements de piqûres de tiques chez l'humain, l'évolution des séroprévalences des chevreuils pour *Bbsl* comparée à celle des cas humains, ou encore la détection d'agents pathogènes similaires entre les tiques parasitant les chevreuils et les tiques chez l'humain. Les limites de cette étude ont également été mises en évidence et permettent de proposer une investigation plus poussée autour de perspectives qui tiennent compte de la complexité de la relation chevreuils-tiques-humains. En effet, la stratégie de surveillance qui semble la plus intéressante à l'issue de cette étude serait de reproduire toutes les informations à grande échelle, au niveau des régions. Ainsi, la comparaison de l'incidence humaine de la borréliose de Lyme et de la séroprévalence des chevreuils pourra être plus facile à effectuer et permettra de vérifier si la corrélation entre les deux variables reste négative, par exemple. Au niveau de *R. helvetica*, de nombreuses zones d'ombres sont révélées, notamment vis-à-vis de ses hôtes réservoirs. Le chevreuil n'est pour l'instant que suspecté. Nos analyses suggèrent qu'il aurait probablement le même profil que pour *Bbsl* : il ne serait donc pas réservoir de l'agent pathogène.

Néanmoins, nous restons convaincus que les animaux sauvages prélevés lors de la chasse (prélèvements biologiques frais et sans contrainte) peuvent fournir des informations épidémiologiques précieuses pour la prévention de la santé humaine, en raison de la diversité des milieux qu'ils fréquentent. De plus, cette approche favorise la recherche participative en impliquant une partie importante de la population. Ce type de recherche rentre parfaitement dans le cadre du concept « One Health » qui met en jeu les santés animale, environnementale et humaine. Il serait donc intéressant de partir des données descriptives de la thèse d'Ollivier et d'utiliser cette étude pour orienter au mieux ce type d'investigation à grande échelle, tout en favorisant la recherche participative. Par exemple, il serait envisageable de déterminer la

persistance des anticorps dirigés contre *R. helvetica* et de vérifier s'ils sont détectables dans les sérums de chevreuils. De plus, les échantillons de sérums de chevreuils pourraient finir par être utilisés à court terme pour des actions de prévention et de sensibilisation autour de la maladie de Lyme, du fait de la faible persistance des anticorps.

Enfin, d'autres agents pathogènes zoonotiques pourraient faire l'objet d'une recherche plus approfondie afin de prévenir l'émergence ou la réémergence de zoonoses chez l'humain. Dans cette étude, l'obtention des échantillons a été difficile : les données et les prélèvements disponibles n'ont pas été réalisés dans l'optique de répondre à la problématique du stage, amenant ainsi plusieurs biais qui compliquent nos interprétations. De ce fait, il serait intéressant, voire nécessaire, de développer des programmes spécifiques de collectes de données et d'échantillons, en collaboration avec différents acteurs afin de croiser les disciplines et les expertises de chacun.

BIBLIOGRAPHIE

AENISHAENSLIN, Cécile, RAVEL, André, MICHEL, Pascal, GERN, Lise, MILORD, François, WAAUB, Jean-Philippe et BÉLANGER, Denise, 2014. From Lyme disease emergence to endemicity: a cross sectional comparative study of risk perceptions in different populations. *BMC Public Health*. 18 décembre 2014. Vol. 14, n° 1, pp. 1298. DOI [10.1186/1471-2458-14-1298](https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1298).

AGOULON, Albert, BUTET, Alain, HOCH, Thierry, PEREZ, Grégoire, PLANTARD, Olivier, VERHEYDEN, Hélène et VOURC'H, Gwenaël, 2015. 3. Dynamique des populations de tiques et liaison avec les facteurs environnementaux. In : MCCOY, Karen D. et BOULANGER, Nathalie (éd.), *Tiques et maladies à tiques* [en ligne]. IRD Éditions. pp. 85-112. [Consulté le 16 août 2024]. ISBN 978-2-7099-2100-8. Disponible à l'adresse : <http://books.openedition.org/irdeditions/9027>

ALBERDI, M. P., WALKER, A. R. et URQUHART, K. A., 2000. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiology and Infection*. avril 2000. Vol. 124, n° 2, pp. 315-323. DOI [10.1017/S0950268899003684](https://doi.org/10.1017/S0950268899003684).

ANCI AUX, M.R. et LIBOIS, Roland, 1990. Atlas des mammifères sauvages de Wallonie: le chevreuil, *Capreolus capreolus* L. *Cahiers d'Ethologie*. 1 janvier 1990. Vol. 10, pp. 183-196.

ANSES, 2022a. Surveiller et alerter. *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail* [en ligne]. 2022. [Consulté le 19 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/content/surveiller-et-alerter>

ANSES, 2022b. Évaluer les risques sanitaires. *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail* [en ligne]. 22 février 2022. [Consulté le 30 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/content/evaluer-les-risques-sanitaires>

BARRADAS, ABRANTES, VIEIRA E BRITO et MESQUITA, 2024. Cervids as Sentinels for *Rickettsia* spp. in Portugal. *Acta Tropica*. 1 juin 2024. Vol. 254, pp. 107202. DOI [10.1016/j.actatropica.2024.107202](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107202).

BECK, Alyssa, BJORK, Jenna, BIGGERSTAFF, Brad J., EISEN, Lars, EISEN, Rebecca, FOSTER, Erik, SIGNS, Kimberly, TSAO, Jean I., KOUGH, Erin, PETERSON, Molly, SCHIFFMAN, Elizabeth, MUGANDA, Christine P., OSBORN, Rebecca, WOZNI AK, Ryan, BRON, Gebbiena M., PHANEUF, Daniel, SMITH, Danielle, BARTHOLOMAY, Lyric, PASKEWITZ, Susan et HINCKLEY, Alison F., 2022. Knowledge, attitudes, and behaviors regarding tick-borne disease prevention in Lyme disease-endemic areas of the Upper Midwest, United States. *Ticks and tick-borne diseases*. mai 2022. Vol. 13, n° 3, pp. 101925. DOI [10.1016/j.ttbdis.2022.101925](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101925).

BHIDE, Mangesh R., TRAVNICEK, Milan, LEVKUTOVA, Maria, CURLIK, Jan, REVAJOVA, Viera et LEVKUT, Mikulas, 2005. Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. février 2005. Vol. 43, n° 2, pp. 165-172. DOI [10.1016/j.femsim.2004.07.012](https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.07.012).

BOGUMIŁA, Skotarczak et ADAMSKA, Małgorzata, 2005. *Capreolus capreolus* and *Ixodes ricinus* as a reservoir of *Bartonella* in north-western Poland. *Wiadomości parazytologiczne*. 1 janvier 2005. Vol. 51, n° 2, pp. 139-143.

BONNARD, R, 2001. *Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque* [en ligne]. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. [Consulté le 18 avril 2024]. Disponible à l'adresse : https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/Le_risque_biologique_et_la_methode_d_evaluation_du_risque.pdf

BOULANGER, Nathalie, 2015. Piqûre de tiques : les risques. . 2015. Vol. 29, n° 948, pp. 679-680.

BOYARD, Chloé, 2007. *Facteurs environnementaux de variation de l'abondance des tiques Ixodes ricinus dans des zones d'étude modèles en Auvergne* [en ligne]. phdthesis. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. [Consulté le 16 août 2024]. Disponible à l'adresse : <https://theses.hal.science/tel-00930307>

CLAUDE, Océane, 2020. Evaluation des risques épidémiologiques associés aux tiques en zone urbaine : Cas des parcs urbains de Seine–Saint–Denis. . 2020. pp. 30.

COSSON, Jean-François, 2018. Écologie de la maladie de Lyme. *Revue Forestière Française*. 2018. N° 2-3-4, pp. 185. DOI [10.4267/2042/69996](https://doi.org/10.4267/2042/69996).

COVARS, 2023. *RISQUE SANITAIRE de GRIPPE AVIAIRE lié à L'INFLUENZA AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGENE (IAHP)* [en ligne]. [Consulté le 26 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2023-06/avis-du-covars-du-8-juin-2023---risque-sanitaire-li-l-iahp-et-la-grippe-aviaire-28112.pdf>

COVARS, 2024. *Evaluation des Risques de Situations Sanitaires Exceptionnelles majeures pour la santé humaine en France au cours des années 2025-2030* [en ligne]. [Consulté le 26 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2024-04/avis-du-covars-du-3-avril-2024---sse-32661.pdf>

DAB, William, 2021. 24. Caractéristiques de l'activité de surveillance. In : *Les fondamentaux de l'épidémiologie* [en ligne]. Rennes : Presses de l'EHESP. pp. 149-150. Vademecum Pro. [Consulté le 18 avril 2024]. ISBN 978-2-8109-0936-0. Disponible à l'adresse : <https://www.cairn.info/les-fondamentaux-de-l-epidemiologie--9782810909360-p-149.htm>

DE LA FUENTE, Jose, ESTRADA-PENÑA, Agustín, VENZAL, José, KOCAN, Katherine et SONENSHINE, Daniel, 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008. Vol. 13, pp. 6938-6946. DOI [10.2741/3200](https://doi.org/10.2741/3200).

DE COCK, Marieke P., DE VRIES, Ankje, FONVILLE, Manoj, ESSER, Helen J., MEHL, Calvin, ULRICH, Rainer G., JOERES, Maike, HOFFMANN, Donata, EISENBERG, Tobias, SCHMIDT, Katja, HULST, Marcel, VAN DER POEL, Wim H.M., SPRONG, Hein et MAAS, Miriam, 2023. Increased rat-borne zoonotic disease hazard in greener urban areas. *Science of The Total Environment*. 20 octobre 2023. Vol. 896, pp. 165069. DOI [10.1016/j.scitotenv.2023.165069](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165069).

DEDET, Jean-Pierre, 2020. Histoire des épidémies. *Les Tribunes de la santé*. 2020. Vol. 66, n° 4, pp. 25-33. DOI [10.3917/seve1.066.0025](https://doi.org/10.3917/seve1.066.0025).

DELVES, Peter J., [sans date]. Système du complément - Immunologie; troubles allergiques. *Édition professionnelle du Manuel MSD* [en ligne]. [Consulté le 30 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.msmanuals.com/fr/professional/immunologie-troubles-allergiques/biologie-du-systeme-immunitaire/systeme-du-complement>

DORWARD, D W, SCHWAN, T G et GARON, C F, 1991. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *Journal of Clinical Microbiology*. juin 1991. Vol. 29, n° 6, pp. 1162-1170. DOI [10.1128/jcm.29.6.1162-1170.1991](https://doi.org/10.1128/jcm.29.6.1162-1170.1991).

DULIPATI, Vinaya, MERI, Seppo et PANELIUS, Jaana, 2020. Complement evasion strategies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *FEBS Letters*. 2020. Vol. 594, n° 16, pp. 2645-2656. DOI [10.1002/1873-3468.13894](https://doi.org/10.1002/1873-3468.13894).

DUTRAIVE, Justine, 2019. *ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE LA DENSITE DE LA TIQUE IXODES RICINUS ET LA DENSITE DES CHEVREUILS EN REGION TOULOUSAINNE* [en ligne]. Toulouse : Université Paul-Sabatier. [Consulté le 11 avril 2024]. Disponible à l'adresse : https://oatao.univ-toulouse.fr/25835/1/DutraiveJ_25835.pdf

EISEN, Lars et STAFFORD, Kirby C, III, 2021. Barriers to Effective Tick Management and Tick-Bite Prevention in the United States (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 1 juillet 2021. Vol. 58, n° 4, pp. 1588-1600. DOI [10.1093/jme/tjaa079](https://doi.org/10.1093/jme/tjaa079).

FABRI, Nannet D., SPRONG, Hein, HOFMEESTER, Tim R., HEESTERBEEK, Hans, DONNARS, Björn F., WIDEMO, Fredrik, ECKE, Frauke et CROMSIGT, Joris P. G. M., 2021. Wild ungulate species differ in their contribution to the transmission of *Ixodes ricinus*-borne pathogens. *Parasites & Vectors*. 10 juillet 2021. Vol. 14, n° 1, pp. 360. DOI [10.1186/s13071-021-04860-w](https://doi.org/10.1186/s13071-021-04860-w).

FIGONI, J., CHIROUZE, C., HANSMANN, Y., LEMOGNE, C., HENTGEN, V., SAUNIER, A., BOUILLER, K., GEHANNO, J. F., RABAUD, C., PERROT, S., CAUMES, E., EL DIN, C., DE BROUCKER, T., JAULHAC, B., ROBLOT, F., TOUBIANA, J., SELLAL, F., VUILLEMET, F., SORDET, C., FANTIN, B., LINA, G., GOCKO, X., DIEUDONNÉ, M., PICONE, O., BODAGHI, B., GANGNEUX, J. P., DEGEILH, B., PARTOUCHE, H., LENORMAND, C., SOTTO, A., RAFFETIN, A., MONSUEZ, J. J., MICHEL, C., BOULANGER, N., CATHEBRAS, P. et TATTEVIN, P., 2019. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French Scientific Societies (I): prevention, epidemiology, diagnosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 août 2019. Vol. 49, n° 5, pp. 318-334. DOI [10.1016/j.medmal.2019.04.381](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.04.381).

FLIGNY, Camille, 2021. *SYNTHESE SUR LES RISQUES SANITAIRES LIES AUX ONGULES SAUVAGES EN FRANCE METROPOLITAINE ET EN CORSE*. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Lyon : Université Claude-Bernard.

FONTENILLE, Didier, LAGNEAU, Christophe, LECOLLINET, Sylvie, LEFAIT ROBIN, Régine, SETBON, Michel, TIREL, Bernard et YÉBAKIMA, André (éd.), 2009. *La lutte antivectorielle en France* [en ligne]. Marseille : IRD Éditions. [Consulté le 16 avril 2024].

Expertise collégiale. ISBN 978-2-7099-1777-3. Disponible à l'adresse : <https://books.openedition.org/irdeditions/1214>

FRIBERG HOLM, Matilda, 2023. *Tick-borne diseases in roe deer Seroprevalence, possible cut-off and effects on health* [en ligne]. [Consulté le 8 avril 2024]. Disponible à l'adresse : https://stud.epsilon.slu.se/19562/1/friberg_holm_m_230619.pdf

GERTH, H.-J., GRIMSHANDL, D., STAGE, B., DÖLLER, G. et KUNZ, C., 1995. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. *Epidemiology and Infection*. octobre 1995. Vol. 115, n° 2, pp. 355-365. DOI [10.1017/S0950268800058477](https://doi.org/10.1017/S0950268800058477).

GILOT, B., BONNEFILLE, M., DEGEILH, B., BEAUCOURNU, J.-C., PICHOT, J. et GUIGUEN, C., 1994. La colonisation des massifs forestiers par *Ixodes ricinus* (linné, 1758) en France : utilisation du chevreuil, *Capreolus capreolus* (l. 1758) comme marqueur biologique. *Parasite*. mars 1994. Vol. 1, n° 1, pp. 81-86. DOI [10.1051/parasite/1994011081](https://doi.org/10.1051/parasite/1994011081).

GINSBERG, Howard S., ZHIOUA, Elyes, MITRA, Shaibal, FISCHER, James, BUCKLEY, P. A., VERRET, Frank, UNDERWOOD, H. Brian et BUCKLEY, Francine G., 2004. Woodland Type and Spatial Distribution of Nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Environmental Entomology*. 1 octobre 2004. Vol. 33, n° 5, pp. 1266-1273. DOI [10.1603/0046-225X-33.5.1266](https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.5.1266).

GUGLIELMONE, Alberto A., ROBBINS, Richard G., APANASKEVICH, Dmitry A., PETNEY, Trevor N., ESTRADA-PEÑA, Agustín, HORAK, Ivan G., SHAO, Renfu et BARKER, Stephen C., 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 6 juillet 2010. Vol. 2528, n° 1, pp. 28. DOI [10.11646/zootaxa.2528.1.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1.1).

GUITTARD, Déborah, [sans date]. Évaluation de l'impact du plan Lyme sur la sensibilisation, les connaissances et les attitudes préventives des patients consultant chez les médecins généralistes de Picardie. .

HAUT CONSEIL DE LA SANTÉ PUBLIQUE, 2014. *La borréliose de Lyme* [en ligne]. Avis et Rapports. Disponible à l'adresse : https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140328_borreliose Lyme.pdf

HAYDON, Daniel T., 2002. Identifying Reservoirs of Infection: A Conceptual and Practical Challenge. *Emerging Infectious Diseases*. décembre 2002. Vol. 8, n° 12, pp. 1468-1473. DOI [10.3201/eid0812.010317](https://doi.org/10.3201/eid0812.010317).

HILAMI, Khaldoune, GODARD, Vincent et NOÛS, Camille, 2024. Explorer la répartition spatiotemporelle des piqûres de tiques sur les humains en France : la température moyenne comme indicateur du risque acarologique. *Cybergeo: European Journal of Geography* [en ligne]. 20 mars 2024. [Consulté le 16 août 2024]. DOI [10.4000/cybergeo.40927](https://doi.org/10.4000/cybergeo.40927). Disponible à l'adresse : <https://journals.openedition.org/cybergeo/40927>

HOBY, Stefan, MATHIS, Alexander, DOHERR, Marcus G., ROBERT, Nadia et RYSER-DEGIORGIS, Marie-Pierre, 2009. BABESIA CAPREOLI INFECTIONS IN ALPINE CHAMOIS (RUPICAPRA R. RUPICAPRA), ROE DEER (CAPREOLUS C. CAPREOLUS) AND RED DEER (CERVUS ELAPHUS) FROM SWITZERLAND. *Journal of Wildlife Diseases*. 2009. N° 45, pp. 748-753200.

JAENSON, Thomas G. T. et TÄLLEKLINT, Lars, 1992. Incompetence of Roe Deer as Reservoirs of the Lyme Borreliosis Spirochete. *Journal of Medical Entomology*. 1 septembre 1992. Vol. 29, n° 5, pp. 813-817. DOI [10.1093/jmedent/29.5.813](https://doi.org/10.1093/jmedent/29.5.813).

JAENSON, Thomas GT, JAENSON, David GE, EISEN, Lars, PETERSSON, Erik et LINDGREN, Elisabet, 2012. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasites & Vectors*. 10 janvier 2012. Vol. 5, n° 1, pp. 8. DOI [10.1186/1756-3305-5-8](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-8).

JAULHAC, B., SAUNIER, A., CAUMES, E., BOUILLER, K., GEHANNO, J. F., RABAUD, C., PERROT, S., EL DIN, C., DE BROUCKER, T., ROBLLOT, F., TOUBIANA, J., SELLAL, F., VUILLEMET, F., SORDET, C., FANTIN, B., LINA, G., SOBAS, C., GOCKO, X., FIGONI, J., CHIROUZE, C., HANSMANN, Y., HENTGEN, V., CATHEBRAS, P., DIEUDONNÉ, M., PICONE, O., BODAGHI, B., GANGNEUX, J. P., DEGEILH, B., PARTOUCHE, H., LENORMAND, C., SOTTO, A., RAFFETIN, A., MONSUEZ, J. J., MICHEL, C., BOULANGER, N., LEMOGNE, C. et TATTEVIN, P., 2019. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French scientific societies (II). Biological diagnosis, treatment, persistent symptoms after documented or suspected Lyme borreliosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 août 2019. Vol. 49, n° 5, pp. 335-346. DOI [10.1016/j.medmal.2019.05.001](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.05.001).

KAUFMAN, W., 2010. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1 mars 2010. Vol. 1, n° 1, pp. 11-22. DOI [10.1016/j.ttbdis.2009.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.12.001).

KIFFNER, C., LÖDIGE, C., ALINGS, M., VOR, T. et RÜHE, F., 2011. Attachment site selection of ticks on roe deer, *Capreolus capreolus*. *Experimental and Applied Acarology*. 1 janvier 2011. Vol. 53, n° 1, pp. 79-94. DOI [10.1007/s10493-010-9378-4](https://doi.org/10.1007/s10493-010-9378-4).

KIFFNER, C., VOR, T., HAGEDORN, P., NIEDRIG, M. et RÜHE, F., 2012. Determinants of tick-borne encephalitis virus antibody presence in roe deer (*Capreolus capreolus*) sera. *Medical and Veterinary Entomology*. 2012. Vol. 26, n° 1, pp. 18-25. DOI [10.1111/j.1365-2915.2011.00961.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00961.x).

KLOPFENSTEIN, Timothée, JAULHAC, Benoît, BLANCHON, Thierry, HANSMANN, Yves et CHIROUZE, Catherine, 2019. Épidémiologie de la borréliose de Lyme en France : entre incertitudes et certitudes. *Santé Publique*. 2019. Vol. S1, n° HS1, pp. 51-63. DOI [10.3917/spub.190.0051](https://doi.org/10.3917/spub.190.0051).

KRÓL, Nina, CHITIMIA-DOBLER, Lidia, DOBLER, Gerhard, KARLIUK, Yauhen, BIRKA, Stefan, OBIEGALA, Anna et PFEFFER, Martin, 2020. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*) from Saxony, Germany, and detection of tick-borne encephalitis virus in attached ticks. *Parasitology Research*. 1 avril 2020. Vol. 119, n° 4, pp. 1387-1392. DOI [10.1007/s00436-020-06637-z](https://doi.org/10.1007/s00436-020-06637-z).

KURTENBACH, Klaus, HANINCOVÁ, Klára, TSAO, Jean I., MARGOS, Gabriele, FISH, Durland et OGDEN, Nicholas H., 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews Microbiology*. septembre 2006. Vol. 4, n° 9, pp. 660-669. DOI [10.1038/nrmicro1475](https://doi.org/10.1038/nrmicro1475).

LEBERT, Isabelle, BORD, Séverine, SAINT-ANDRIEUX, Christine, CASSAR, Eva, GASQUI, Patrick, BEUGNET, Frédéric, CHALVET-MONFRAY, Karine, VANWAMBEKE, Sophie O., VOURC'H, Gwenaël et RENÉ-MARTELLET, Magalie, 2022. Habitat suitability map of Ixodes ricinus tick in France using multi-criteria analysis. *Geospatial Health*. 17 mai 2022. Vol. 17, n° 1, pp. 14. DOI [10.4081/gh.2022.1058](https://doi.org/10.4081/gh.2022.1058).

LEJAL, Emilie, MARSOT, Maud, CHALVET-MONFRAY, Karine, COSSON, Jean-François, MOUTAILLER, Sara, VAYSSIER-TAUSSAT, Muriel et POLLET, Thomas, 2019. A three-years assessment of Ixodes ricinus-borne pathogens in a French peri-urban forest. *Parasites & Vectors*. 21 novembre 2019. Vol. 12, n° 1, pp. 551. DOI [10.1186/s13071-019-3799-7](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3799-7).

LESCHNIK, M. W., KHANAKAH, G., DUSCHER, G., WILLE-PIAZZAI, W., HÖRWEG, C., JOACHIM, A. et STANEK, G., 2012. Species, developmental stage and infection with microbial pathogens of engorged ticks removed from dogs and questing ticks. . 2012. pp. 7.

LOUWAGIE, Véronique, 2021. 3937 : *Rapport d'information relatif au financement et à l'efficacité de la lutte contre la maladie de Lyme* [en ligne]. Assemblée nationale. [Consulté le 27 mai 2024]. Disponible à l'adresse : https://www.assemblee-nationale.fr/dyn/15/rapports/lymefin/115b3937_rapport-information.pdf

MANSFIELD, Karen L., JIZHOU, Lv, PHIPPS, L. Paul et JOHNSON, Nicholas, 2017. Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [en ligne]. 11 juillet 2017. Vol. 7. [Consulté le 15 août 2024]. DOI [10.3389/fcimb.2017.00298](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00298). Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2017.00298/full>

MCCOY, Karen D. et BOULANGER, Nathalie, 2015. *Tiques et maladies à tiques Biologie, écologie évolutive, épidémiologie* [en ligne]. IRD Editions. Marseille. [Consulté le 4 avril 2024]. Didactiques. Disponible à l'adresse : <https://books.openedition.org/irdeditions/9001?lang=fr>

MICHELET, Lorraine, DELANNOY, Sabine, DEVILLERS, Elodie, UMHANG, Gérald, ASPAN, Anna, JUREMALM, Mikael, CHIRICO, Jan, VAN DER WAL, Fimme J., SPRONG, Hein, BOYE PIHL, Thomas P., KLITGAARD, Kirstine, BØDKER, Rene, FACH, Patrick et MOUTAILLER, Sara, 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [en ligne]. 29 juillet 2014. Vol. 4. [Consulté le 6 août 2024]. DOI [10.3389/fcimb.2014.00103](https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00103). Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2014.00103/full>

MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DE LA PRÉVENTION, 2023. *Décret n° 2023-716 du 2 août 2023 relatif à la liste des maladies devant faire l'objet d'un signalement en application de l'article L. 3113-1 du code de la santé publique* [en ligne]. 2023. 2023-716. [Consulté le 27 mai 2024]. Disponible à l'adresse : https://www.legifrance.gouv.fr/download/pdf?id=pALB_HHcGGM1E8zfalIP9Ne28XWm-Rn2rXJfi6SAZBY=

MINISTÈRE DU TRAVAIL, DE LA SANTÉ ET DES SOLIDARITÉS, 2023. Avis du Comité de Veille et d'Anticipation des Risques Sanitaires (COVARs). *enseignementsup-recherche.gouv.fr* [en ligne]. 12 juin 2023. [Consulté le 26 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/fr/avis-du-comite-de-veille-et-d-anticipation-des-risques-sanitaires-covars-91163>

MINISTÈRE DU TRAVAIL, DE LA SANTÉ ET DES SOLIDARITÉS, 2024. Comité de veille et d'anticipation des risques sanitaires. *Ministère du travail, de la santé et des solidarités* [en ligne]. 30 avril 2024. [Consulté le 30 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://sante.gouv.fr/actualites/presse/dossiers-de-presse/article/comite-de-veille-et-d-anticipation-des-risques-sanitaires>

MOORE, Thomas C., PULSCHER, Laura A., CADDELL, Luke, FRICKEN, Michael E. von, ANDERSON, Benjamin D., GONCHIGOO, Battsetseg et GRAY, Gregory C., 2018. Evidence for transovarial transmission of tick-borne rickettsiae circulating in Northern Mongolia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 27 août 2018. Vol. 12, n° 8, pp. e0006696. DOI [10.1371/journal.pntd.0006696](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006696).

MYSTERUD, Atle, HATLEGJERDE, Idar Lauge et SØRENSEN, Ole Jakob, 2014. Attachment site selection of life stages of *Ixodes ricinus* ticks on a main large host in Europe, the red deer (*Cervus elaphus*). . 2014. pp. 5.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON ANIMALS AS MONITORS OF ENVIRONMENTAL HAZARDS, 1991. *Animals as sentinels of environmental health hazards* [en ligne]. Washington (DC) : National Academies Press (US). [Consulté le 5 avril 2024]. ISBN 978-0-309-04046-4. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234944/>

NBK234944

OLLIVIER, Valentin, 2023. *Cartographie du risque d'exposition à des agents de maladies à tiques par la sérologie : le cas du Chevreuil et de la maladie de Lyme* [en ligne]. thesis. Université de Montpellier. [Consulté le 24 novembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://theses.fr/s232282>

OLLIVIER, Valentin, CHOQUET, Remi, GAMBLE, Amandine, BASTIEN, Matthieu, COMBES, Benoit, GILOT-FROMONT, Emmanuelle, PELLERIN, Maryline, GAILLARD, Jean-Michel, LEMAITRE, Jean-Francois, VERHEYDEN, Helene et BOULINIER, Thierry, 2023. Temporal dynamics of antibody level against Lyme disease bacteria in roe deer: Tale of a sentinel? *ECOLOGY AND EVOLUTION*. 2023. Vol. 13, n° 8, pp. 15. DOI [10.1002/ece3.10414](https://doi.org/10.1002/ece3.10414).

OVERZIER, Evelyn, PFISTER, Kurt, HERB, Ingrid, MAHLING, Monia, BÖCK, Georg et SILAGHI, Cornelia, 2013. Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2013. Vol. 4, n° 4, pp. 320-328. DOI [10.1016/j.ttbdis.2013.01.004](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.004).

PEREZ, Grégoire, BOULOUIS, Henri-Jean, BONNET, Sarah, BOULANGER, Nathalie, LIVOREIL, Barbara, MCCOY, Karen, QUILLERY, Elsa, BOURNEZ, Laure, RENÉ-MARTELLET, Magalie et FITE, Johanna, 2020. *Rapport bibliographique sur l'écologie*,

l'épidémiologie, la surveillance, la prévention et la lutte contre la tique Ixodes ricinus en France métropolitaine [en ligne]. report. INRAE ; Anses. [Consulté le 16 août 2024]. Disponible à l'adresse : <https://anses.hal.science/anses-03263410>

PÉREZ-EID, Claudine, 2007. *Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Tec&Doc. Lavoisier. Monographies de microbiologie. ISBN 978-2-7430-1956-3.

PICHON, Bruno, MOUSSON, Laurence, FIGUREAU, Claude, RODHAIN, François et PEREZ-EID, Claudine, 1999. Density of deer in relation to the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* nymphs in Rambouillet forest, France. *Experimental & Applied Acarology*. 1 mars 1999. Vol. 23, n° 3, pp. 267-275. DOI [10.1023/A:1006023115617](https://doi.org/10.1023/A:1006023115617).

PRYEN, Amélie, 2013. *La maladie de Lyme et sa prévention en France*.

PUPPO, Costanza, [sans date]. *Maladie de Lyme: l'élaboration sous tension d'une représentation sociale*. .

RANDOLPH, Sarah et GERN, Lisa, 2003. Co-feeding Transmission and Its Contribution to the Perpetuation of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia afzelii* (In Reply). *Emerging Infectious Diseases*. juillet 2003. Vol. 9, n° 7, pp. 893-894. DOI [10.3201/eid0907.030116](https://doi.org/10.3201/eid0907.030116).

RIVIÈRE, Jean-Louis, 1993. Les animaux sentinelles. *Paris : Institut national de la recherche agronomique. Délégation permanente à l'environnement*. 1993. Vol. 20, n° 20, pp. 59-68.

SANTÉ PUBLIQUE FRANCE, 2023. *Borréliose de Lyme et prévention des piqûres de tiques : où en est-on en France ?* [en ligne]. 2023. [Consulté le 24 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2023/borreliose-de-lyme-et-prevention-des-piqures-de-tiques-ou-en-est-on-en-france>

SEPTFONS, Alexandra, [sans date]. *Borréliose de Lyme: de l'exposition aux formes graves en France: quelles données pour appréhender l'épidémiologie de la Borréliose de Lyme en France?* .

STEINBRINK, Antje, BRUGGER, Katharina, MARGOS, Gabriele, KRAICZY, Peter et KLIMPEL, Sven, 2022. The evolving story of *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmission in Europe. *Parasitology Research*. 1 mars 2022. Vol. 121, n° 3, pp. 781-803. DOI [10.1007/s00436-022-07445-3](https://doi.org/10.1007/s00436-022-07445-3).

TAPSOBA, Rodolphe, 2023. *Identification des variables favorisant l'adoption des comportements préventifs de la maladie de Lyme*. . 2023. pp. 103.

TONTERI, Elina, JOKELAINEN, Pikka, MATALA, Juho, PUSENIUS, Jyrki et VAPALAHTI, Olli, 2016. Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in moose and deer in Finland: sentinels for virus circulation. *PARASITES & VECTORS*. 29 janvier 2016. Vol. 9, pp. 54. DOI [10.1186/s13071-016-1335-6](https://doi.org/10.1186/s13071-016-1335-6).

VAUGHAN, J.P. et MORROW, R.H., 1991. *MANUEL D'ÉPIDÉMIOLOGIE POUR LA GESTION DE LA SANTÉ AU NIVEAU DU DISTRICT* [en ligne]. World Health Organization. [Consulté le 18 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/41554/9242544043.pdf?sequence=1>

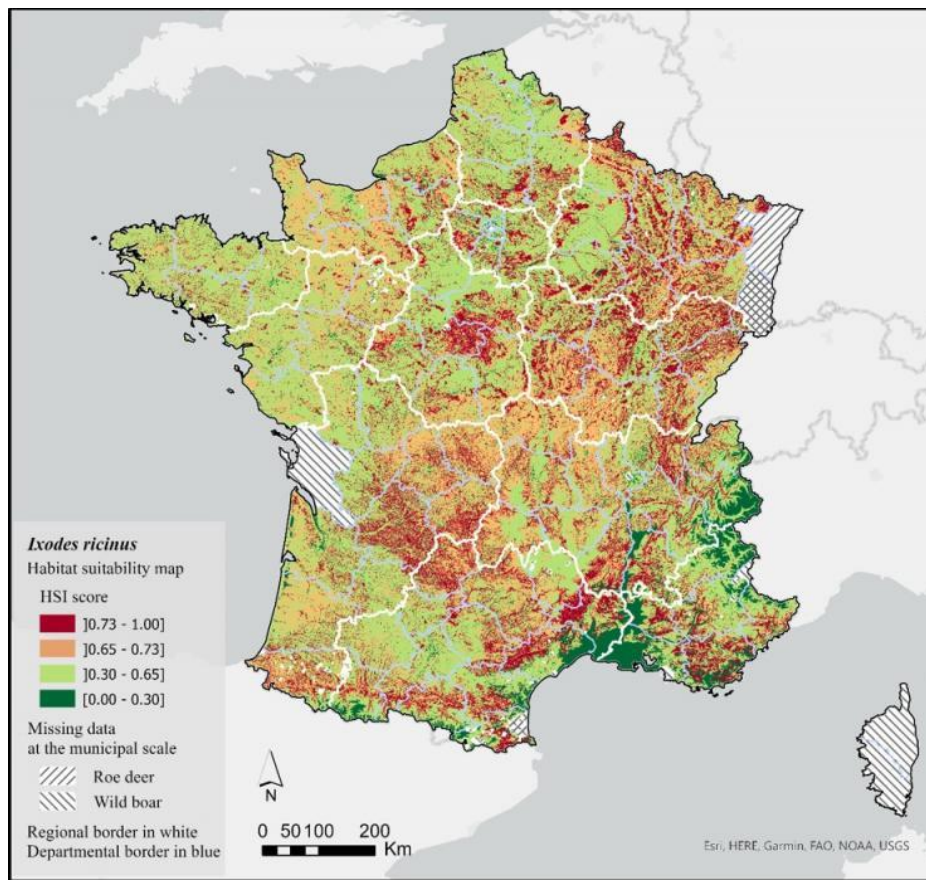
VOORDOUW et MAARTEN, 2015. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*. février 2015. Vol. 142, n° 2, pp. 290-302. DOI [10.1017/S0031182014001486](https://doi.org/10.1017/S0031182014001486).

VOR, Torsten, KIFFNER, Christian, HAGEDORN, Peter, NIEDRIG, Matthias et RÜHE, Ferdinand, 2010. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Experimental and Applied Acarology*. août 2010. Vol. 51, n° 4, pp. 405-417. DOI [10.1007/s10493-010-9337-0](https://doi.org/10.1007/s10493-010-9337-0).

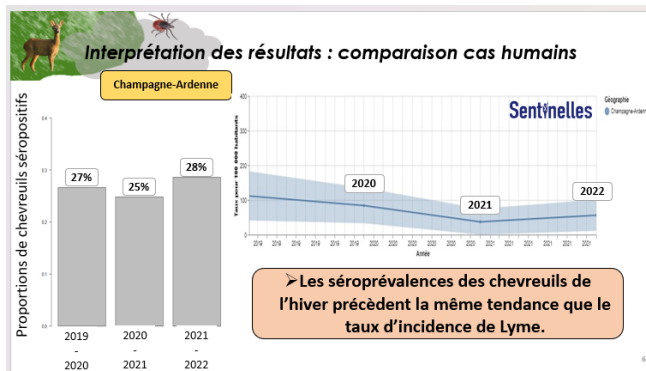
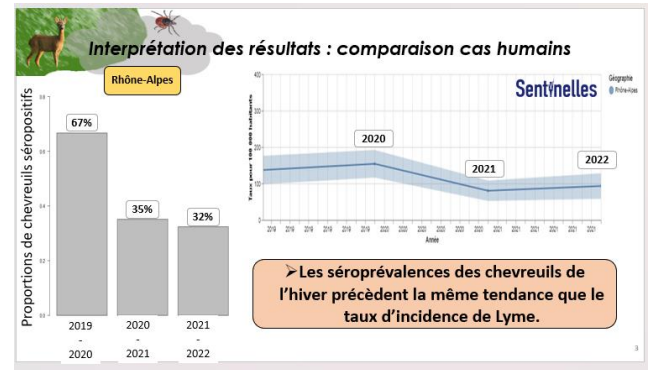
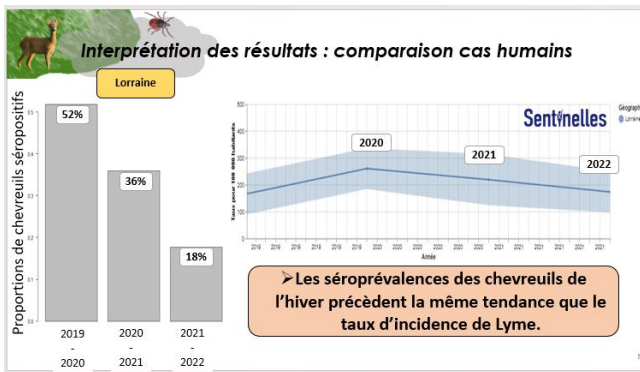
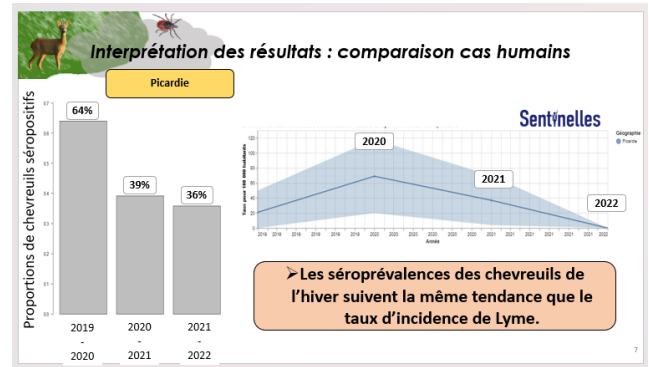
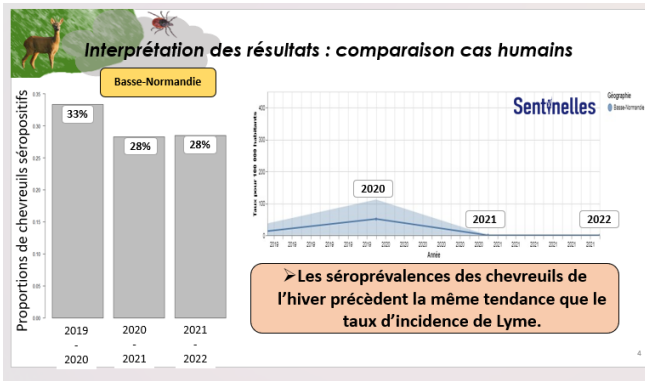
WONGNAK, Phrutsamon, BORD, Séverine, JACQUOT, Maude, AGOULON, Albert, BEUGNET, Frédéric, BOURNEZ, Laure, CÈBE, Nicolas, CHEVALIER, Adélie, COSSON, Jean-François, DAMBRINE, Naïma, HOCH, Thierry, HUARD, Frédéric, KORBOULEWSKY, Nathalie, LEBERT, Isabelle, MADOUASSE, Aurélien, MÅRELL, Anders, MOUTAILLER, Sara, PLANTARD, Olivier, POLLET, Thomas, POUX, Valérie, RENÉ-MARTELLET, Magalie, VAYSSIER-TAUSSAT, Muriel, VERHEYDEN, Hélène, VOURC'H, Gwenaël et CHALVET-MONFRAY, Karine, 2022. Meteorological and climatic variables predict the phenology of *Ixodes ricinus* nymph activity in France, accounting for habitat heterogeneity. *Scientific Reports*. 12 mai 2022. Vol. 12, n° 1, pp. 7833. DOI [10.1038/s41598-022-11479-z](https://doi.org/10.1038/s41598-022-11479-z).

WORMSER, Gary P., DATTWYLER, Raymond J., SHAPIRO, Eugene D., HALPERIN, John J., STEERE, Allen C., KLEMPNER, Mark S., KRAUSE, Peter J., BAKKEN, Johan S., STRLE, Franc, STANEK, Gerold, BOCKENSTEDT, Linda, FISH, Durland, DUMLER, J. Stephen et NADELMAN, Robert B., 2006. The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 1 novembre 2006. Vol. 43, n° 9, pp. 1089-1134. DOI [10.1086/508667](https://doi.org/10.1086/508667).

ANNEXES



*Annexe 1. Carte de score des habitats favorables à la tique *Ixodes ricinus* en France métropolitaine (Lebert et al., 2022)*



Annexe 2. Comparaison de la séroprévalence des chevreuils aux cas humains de Bbsl en France métropolitaine au niveau régional sur la période 2019-2022 (ELIZ, 2023)

Protocole
Extraction ADN de tique
Kit Macherey-Nagel (Nucleospin DNA Insect)
complété par Tous Chercheurs

Tous Chercheurs a apporté les compléments « hygiène et sécurité » nécessaires à la manipulation au laboratoire et quelques suggestions/précisions pour certains points du protocole. L'ensemble est à relire et compléter si nécessaire par ELIZ




1. Objet et domaine d'application

Protocole décrivant les étapes à suivre pour effectuer une extraction d'ADN de tique grâce au kit Macherey-Nagel (Nucleospin DNA Insect)

2. Documents de référence

Notice utilisation du Kit Macherey-Nagel (Nucleospin DNA Insect)

3. Matériels et réactifs

Matériel	Consommables	Réactifs
Pipettes automatiques	Microtubes 1,5ml (A fournir)	Ethanol 96-100% (A fournir) ATTENTION ! Inflammable / Irritant 
Centrifugeuse microtubes	Cônes (A fournir)	Lysis Buffer MG (KIT) DANGER Corrosif / Toxique / Irritant 
Vortex	Colonnes Nucleospin Tissue (KIT)	Wash Buffer BW (KIT) ATTENTION! Inflammable / Toxique / Irritant 
Ribolyseur de type « Precellys 24 »	Tubes 2ml (KIT)	Wash Buffer B5 (concentré) (KIT)
Portoirs	Parafilm (A fournir)	Elution Buffer BE (KIT)
Boîte plastique (transport échantillons)		Protéinase K liquide (KIT)

Protocole
Extraction ADN de tique
Kit Macherey-Nagel (Nucleospin DNA Insect)
complété par Tous Chercheurs

4. Mode opératoire



Se rendre au congélateur 1 à l'étage pour récupérer les tubes contenant les tiques, les transporter jusqu'au **laboratoire 9** sur un portoir dans une boîte en plastique.

Entrer dans le SAS du laboratoire, poser la boîte avec les échantillons sur la pailasse.

Se vêtir d'une sur-blouse et enfiler une paire de sur-chaussures au moment de passer de l'autre côté du banc représentant la limite du sas.

Se laver les mains selon le protocole affiché.

- Mettre en route le PSM (Cf. Fiche d'instruction d'utilisation n° XXXXX) et y déposer la boîte d'échantillons.



Tous les déchets générés durant la manipulation seront à jeter, selon leur catégorie, dans les poubelles déchets biologiques infectieux, déchets solides ou liquides prévues à cet effet et évacuer selon la réglementation. Les lames de scalpel doivent être jetées dans des poubelles spécifiques.

4.1. Préparation des réactifs

- **Sous sorbonne et avec des gants**, préparer les aliquots de réactifs et la dilution du tampon B5 dans l'éthanol 96%, en fonction du nombre d'échantillons

4.2. Préparation des échantillons



Toutes les étapes ultérieures se dérouleront Sous PSM II (Cf. Fiche d'instruction d'utilisation du PSM II) et avec des gants.

- Laver les tiques 1 fois à l'éthanol 70% puis deux fois à l'eau distillée dans des tubes Eppendorf 1,5ml.
- Sécher les tiques sur un papier absorbant.
- Placer chaque tique dans un micro-tube contenant des billes (fournit par le kit) et l'identifier.
- Ajouter 100µl de tampon BE dans ces tubes, les parafilmer et procéder au broyage grâce au Precellys 24 (programme 3)
- Centrifuger 30s / 11 000g



Porter des lunettes de protection pour l'étape de broyage.

Protocole
Extraction ADN de tiqne
Kit Macherey-Nagel (Nucleospin DNA Insect)
complété par Tous Chercheurs

4.3. Lyse des échantillons

! Sous PSM II et avec des gants.

- Ajouter 40µl de tampon MG + 10µl de Protéinase K liquide dans chaque échantillon et parafilmer.
- Vortexer.
- Centrifuger 30 secondes à 11000g

! A partir de cette étape, la manipulation peut se faire sur pailasse avec gants.

4.4. Ajustement des conditions d'accrochage des acides nucléiques sur la colonne

! Cette étape nécessite de porter des lunettes de protection (tampon MG corrosif).

- Dans chaque tube d'échantillon lysé : ajouter 600µl de tampon MG et vortexer.
- Centrifuger 30 secondes à 11000g.

4.5. Accrochage de l'ADN sur la colonne

- Déposer délicatement 600µl sur la colonne puis centrifuger à 11000 g pendant 30 secondes.
- Redéposer si besoin le reste du contenu du tube sur la colonne puis centrifuger de nouveau à 11 000g pendant 30s
- Jeter le surageant (l'ADN s'est fixé à la colonne de silice).

4.6. Lavages

- Premier lavage :
 - Déposer 500µl de tampon BW sur la colonne.
 - Centrifuger à 11000g pendant 30 secondes et jeter le liquide.
- Deuxième lavage :
 - Déposer 500µl de tampon B5 sur la colonne.
 - Centrifuger à 11000g pendant 30 secondes et jeter le liquide.

4.7. Séchage de la membrane de silice

- Prendre un tube de collecte propre et sec et y insérer la colonne : Centrifuger à sec la colonne à 11000g pendant 30 secondes.

Protocole
Extraction ADN de tique
Kit Macherey-Nagel (Nucleospin DNA Insect)
complété par Tous Chercheurs

4.8. Elution

- Insérer la colonne dans un microtube propre et stérile.
- Déposer 50µl de tampon BE. Bien déposer le liquide au centre de la membrane de silice, attention de ne pas toucher la membrane.
- Laisser incuber 1 min à température ambiante (permet à la membrane de se réhydrater et de libérer l'ADN).
- Centrifuger 30 secondes à 11000g.

4.9. Fin de manipulation

- Récupérer les éluats des échantillons, les remettre dans la boîte en plastique posée sur la pailleuse près de la sortie.
- Retirer et jeter ses gants.
- Nettoyer les surfaces des paillasses et des appareils utilisés à l'éthanol 70%.
- Repasser le sas de sortie, retirer sa blouse et ses sur-chaussures.
- Se laver les mains.
- Sortir du laboratoire avec les échantillons dans la boîte en plastique
- Placer les tubes au congélateur n°1 en attendant son utilisation.

5. Contrôle qualité d'extraction par amplification du gène 18s de tiques

L'objectif est d'avoir un marqueur universel tiques pour s'assurer que l'extraction d'ADN a bien fonctionné pour toutes les tiques quelle que soient le genre et l'espèce et ainsi exclure d'éventuels négatifs dus à un échec de l'extraction.

Ixodida ^b	18S rRNA	908	F, GCTAGAGGTGAAATCTTGG (20)
		1031	R, AGAACTAGGGCGGTATCT (18)
		936	P, FAM-AAGACGAACTACTGCGAAAGCATT-BHQ1 (24)

BORRELIA + VISE IGG ELISA

IBL INTERNATIONAL

ADAPTE POUR LES PLASMA DE CHEVREUILS

Agent(s) infectieux ciblé : *Borrelia burgdorferi* (*garinii*, *afzelii* and *senso strictu*)
 Immunoglobuline(s) ciblée(s) : IgG

Préparation des échantillons issu de Papier buvard

Remarque : L'élution du papier buvard se fera dans le tampon de dilution (DILBUF) prêt à l'emploi présent dans le kit ELISA. Chaque papier buvard sera élué deux fois. Le premier aliquot sera analysé par ELISA par les laboratoires Vétérinaires Départementaux et le second aliquot sera envoyé au Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive à Montpellier pour constitution d'une sérothèque (Voir section Information du document).

Élution du papier buvard :

Placer un carré de 1 cm² de papier buvard imbibé de sang dans un Eppendorf contenant 300µl de tampon (DILBUF). Agiter durant la nuit à température ambiante (+18°C à +25°C). Centrifuger l'Eppendorf 10 minutes à 2000g et récupérer le surnageant.

Produits	Quantité/plaque	Utilité	Fournisseur	Reference
Agitateur rotatif à tambour digital*	-	Agitation du papier buvard	Le Laborantin	Ref : 702347
Ciseaux	1	Pour découper le papier buvard imbibé	-	-
DILBUF (kit ELISA IBL)	300µL	Tampon de dilution	IBL	Borrelia + Vise IgG ELISA - RE27201
Papier buvard	1	Échantillon	-	-
Pince à épiler	1	Pour manipulation le papier buvard	-	-
Lingette	1	Nettoyage des ciseaux et de la pince	-	-

*Exemple d'agitateur rotatif utilisé pour l'élution des rates

Préparation et conservation des réactifs

Remarque : Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (+18°C à + 25°C), environ 30 minutes avant leur utilisation.

- **Puits coatés :** Prêts à l'emploi. Ouvrir l'emballage protecteur refermable de la microplaque au-dessus de la fermeture rapide (zip). Ne pas ouvrir tant que la microplaque n'a pas atteint la température ambiante afin d'éviter toute condensation sur les barrettes individuelles.
- **Contrôles :** Prêt à l'emploi. Les réactifs doivent être homogénéisés soigneusement avant d'être utilisés.

- **Conjugué Enzymatique :**

- o **Humain :** Prêt à l'emploi. Le conjugué doit être homogénéisé soigneusement avant d'être utilisé.
- o **Lapin :** Le conjugué doit être dilué au **1 : 2000** selon le tableau ci-dessous. Le conjugué doit être homogénéisé soigneusement avant d'être utilisé.

Nombre de plaques	1	2	3	4
Volume	10ml	20ml	30ml	40ml
Solution d'IgG couplé à la Peroxydase anti-Chevreuil	5µl	10µl	15µl	20µl
Volume de la solution tampon (Dilbuf) à ajouter	10ml	20ml	30ml	40ml

- **Tampon de lavage :** Le tampon de lavage est concentré 10x. Si une cristallisation apparaît dans le tampon concentré, chauffer à +37°C et bien mélanger. Diluer la solution concentrée selon le nombre de plaque (voir ci-dessous).

Nombre de plaques	1	2	3	4
Volume	400ml	600ml	800ml	1000ml
Solution de lavage concentré (WASHBUF)	40ml	60ml	80ml	100ml
Eau osmosé	360ml	540ml	720ml	900ml

- **Solution de substrat :** Prête à l'emploi. Refermer le flacon immédiatement après utilisation car son contenu est sensible à la lumière. La solution de substrat doit être limpide au moment de son utilisation. Ne pas l'utiliser si elle est colorée en bleu.
- **Solution d'arrêt :** Prête à l'emploi.

Produits	Quantité/plaque	Utilité	Fournisseur	Reference
Plaque 96 puits du kit ELISA IBL	1	Pour réaliser les étapes de l'ELISA	IBL	Borrelia + VlsE IgG ELISA - RE27201
Pots de réactifs du kit ELISA IBL	5	Pour réaliser les étapes de l'ELISA	IBL	
Aliquot de conjugué anti-chevreuil	1 (5µl)	Pour détection des anticorps de chevreuil	KPL	KPL 04-31-06
Plaque de dilution	1	Dilution des échantillons standard	VWR	Nunc 96 MicroWell plate - 732-2746
Bouteille 50ml	-	Préparation de la solution de conjugué	-	
Bouteille de 1l	-	Préparation de la solution tampon de lavage	-	
Éprouvette gradué 1000ml	-	Préparation de la solution tampon de lavage	-	
Pipette P10 + cônes	> 96 cônes	Dilution des échantillons	-	
Pipette multi-canaux P300 + cônes	< 96 cônes	Étape de lavage	-	
Pipette P1000 + cônes	> 96 cônes	Différentes étapes	-	
Plaque 96 puits	1	Incubation	-	
Porte tubes	2		-	
Poubelle de table (Pot plastique)	1	Pour jeter les cônes	-	
Eau osmosé	360 ml			
Lot d'échantillons standard	3 échantillons	Comparaison des résultats entre plaques	-	

- **Nécessité de disposer de :**

- o Bancs de travail
- o Vortex
- o Étuve (37°C), Lecteur de Densité Optique Analyseur de micro plaque (TECAN-infinite 300))

Conservation et stabilité : le coffret doit être conservé entre +2°C et +8°C. Ne congeler que le conjugué enzymatique à -20°C.

Évacuation des déchets : Les échantillons de chevreuils, les contrôles et les barrettes de microplaque incubées doivent être manipulées comme déchets infectieux. Tous les réactifs doivent être éliminés selon les réglementations officielles en vigueur.

Préparation des échantillons standard

Dilution de l'échantillon : Les échantillons standard sont dilués au 1 :101 dans du tampon échantillon (2µl de l'échantillon dans 198µl de solution de dilution (DILBUF)) dans une microplaque non coatée (VWR).

Comparabilité inter-plaques et seuil de séropositivité

Il faut utiliser un lot d'échantillons standard (de Densités Optiques variées) afin de pouvoir réaliser ultérieurement des comparaisons entre plaques et séries d'analyses.

Le seuil de séropositivité pourra être déterminé en utilisant la méthode décrite dans le Garnier et al., 2017¹. Les codes sont disponibles dans le supplément en ligne.

¹ Garnier et al., 2017. Interpreting ELISA analyses from wild animal samples: some recurrent issues and solutions. *Functional Ecology*, 31, 2255–2262.

Réalisation du test

Mettre tous les réactifs à température ambiante (21°C ± 5°C) avant utilisation. L'étuve doit être réglée à 37°C. Homogénéiser tous les réactifs avec un vortex.

Inoculation de la plaque (1^{ère} Étape) - Déposer 100 µl :

- du contrôle négatif (puits A1 et B1)
- du contrôle positif (puits C1 et D1)
- des échantillons standard (puits F12 à H12)
- d'éluats de papier buvard dans les puits restants

Incuber la microplaque paraffinée 60 minutes à 37°C.

Lavage – Vider puis laver les puits **3 x 30 secondes** avec 300 µl de tampon de lavage par puits pour chaque lavage.

Incubation du conjugué – Déposer 100 µl du conjugué enzymatique Humain (anti-IgG humaine couplé à la peroxydase) dans les puits contrôles et 100 µl du conjugué enzymatique Lapin (anti-IgG lapin couplé à la peroxydase) dans les puits échantillons de la microplaque. Incuber la microplaque paraffinée 30 minutes à 37°C.

Lavage – Vider les puits. Laver comme décrit ci-dessus.

Incubation du substrat – Déposer 100µl de la solution du substrat dans chaque puits de la microplaque. Incuber 30 ± 3 min à température ambiante (21°C ± 5°C) et protéger de la lumière directe du soleil.

Réaction d'arrêt - Déposer 100µl de la solution d'arrêt dans chaque puits de la microplaque dans le même ordre et avec la même cadence que l'étape de distribution de la solution du substrat.

Lecture – La mesure photométrique de l'intensité de coloration doit être faite à une longueur d'onde de 450 nm dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction. Avant de mesurer, agiter soigneusement la microplaque pour assurer une bonne homogénéisation de la distribution de la solution. Les résultats sont ensuite rentrés dans le fichier Excel « résultats sérologie LDV (numéro du département) ».

Informations du document

Auteurs	Valentin Ollivier Amandine Gamble Thierry Boulinier Romain Garnier	Valentin.ollivier@e-l-i-z.com amandine.gamble@gmail.com thierry.boulinier@cefe.cnrs.fr romain.garnier1@gmail.com
Adresse	CEFE CNRS 1919 route de Mende 34293 MONTPELLIER FRANCE	



JULIENNE, Cassandra, 2024, Explorer les indicateurs potentiels chez le chevreuil pour étudier et surveiller la circulation des agents pathogènes transmis par les tiques à risque chez l'humain, 38 pages, mémoire de fin d'études, Clermont-Ferrand, 2024.

STRUCTURE D'ACCUEIL ET INSTITUTIONS ASSOCIEES :

- ◆ Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses (ELIZ)
- ◆ Laboratoire Départemental Vétérinaire des Vosges (LDV88)

ENCADRANTS :

- ◆ Maître de stage : COMBES, Benoît (ELIZ)
- ◆ Tuteur scientifique et technique : BASTIEN, Matthieu (ELIZ)
- ◆ Tuteur pédagogique : GILOT-FROMONT, Emmanuelle (VetAgro Sup)

OPTION : Agriculture Environnement Santé et Territoires

RESUMÉ

Présentes sur tous les continents, les tiques transmettent divers agents pathogènes (bactéries, virus, protozoaires) à des hôtes variés, dont les reptiles, oiseaux et mammifères y compris les humains, représentant un risque pour la santé publique. En France, la maladie à tiques la plus courante est la borréliose de Lyme, causée par *Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl)*, transmise par piqûre de tiques *Ixodes ricinus*. Face au manque de moyens pour lutter contre cette bactérie, les recherches se concentrent sur son vecteur. L'objectif est donc d'identifier des indicateurs permettant d'étudier et de suivre la circulation d'agents pathogènes à risque pour l'humain, dont *Bbsl*. Une piste envisagée est d'utiliser le chevreuil comme marqueur de ce risque. Pour répondre à la problématique, trois indicateurs ont été étudiés : l'abondance des populations de chevreuils, les tiques collectées sur cette espèce et leur séroprévalence pour *Bbsl*. Les résultats de cette étude ne permettent pas de confirmer que le chevreuil possède des indicateurs fiables et pertinents pour être marqueur de ce risque. Toutefois, ce travail souligne les éléments importants à considérer pour de futures recherches comme l'abondance des populations de chevreuils et les signalements de piqûres ou encore l'évolution des séroprévalences de ce cervidé face à l'évolution du taux d'incidence humaine. De plus, une bactérie commune a été trouvée dans les tiques parasitant les chevreuils et celles piquant les humains : *Rickettsia helvetica*. D'autres agents pathogènes zoonotiques pourraient alors faire l'objet de recherches plus approfondies afin de prévenir l'émergence ou la réémergence de zoonoses chez l'humain

Mots clés : *Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl)*, chevreuil, indicateur, *Ixodes ricinus*, *Rickettsia helvetica*, séroprévalence



JULIENNE, Cassandra, 2024, Exploring potential indicators in roe deer for studying and monitoring the circulation of tick-borne pathogens posing risks to humans, Master's thesis, Clermont-Ferrand, 2024

HOST ORGANIZATION AND ASSOCIATED INSTITUTIONS:

- ◆ Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses (ELIZ)
- ◆ Laboratoire Départemental Vétérinaire des Vosges (LDV88)

SUPERVISORS:

- ◆ Internship supervisor: COMBES, Benoît (ELIZ)
- ◆ Scientific and technical advisor: BASTIEN, Matthieu (ELIZ)
- ◆ Academic tutor: GILOT-FROMONT, Emmanuelle (VetAgro Sup)

OPTION: Agriculture Environment Health and Territories

ABSTRACT

Ticks, found on every continent, transmit various pathogens (bacteria, viruses, protozoa) to a wide range of hosts, including reptiles, birds, and mammals – humans among them – representing a significant public health risk. In France, the most common tick-borne disease is Lyme borreliosis, caused by *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Bbsl*), transmitted by the bite of *Ixodes ricinus* ticks. Due to the limited means to combat this bacterium, research is focusing on its vector. The goal is to identify indicators to study and monitor the circulation of pathogens posing a risk to humans, including *Bbsl*. One proposed approach is using roe deer as a marker of this risk. To address this, three indicators were studied: roe deer population abundance, ticks collected from this species, and their *Bbsl* seroprevalence. The results of this study do not confirm that roe deer provide reliable and relevant indicators for this risk. However, the research highlights key factors for future studies, such as the relationship between roe deer population abundance and tick bite reports, or changes in the species' seroprevalence alongside human incidence rates. Additionally, a common bacterium, *Rickettsia helvetica*, was found in ticks parasitizing both roe deer and humans. Other zoonotic pathogens could be the subject of further research to prevent the emergence or reemergence of zoonoses in humans.

Keywords : *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Bbsl*), indicator, *Ixodes ricinus*, *Rickettsia helvetica*, roe deer, seroprevalence