



HAL
open science

La dynamique du Pathobiome des tiques, l'exemple d'*Ixodes ricinus*

Emilie Lejal

► **To cite this version:**

Emilie Lejal. La dynamique du Pathobiome des tiques, l'exemple d'*Ixodes ricinus*. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2020. Français. NNT : 2020PESC0071 . tel-03603126

HAL Id: tel-03603126

<https://theses.hal.science/tel-03603126v1>

Submitted on 9 Mar 2022

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.

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-Est

Spécialité : Microbiologie

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Présentée et soutenue publiquement par

Emilie LEJAL

Le mardi 21 janvier 2020

La dynamique du Pathobiome des tiques, l'exemple d'*Ixodes ricinus*

Directrice de thèse : Muriel VAYSSIER-TAUSSAT¹

Co-encadrant de thèse : Thomas POLLET²

Financée par la région Ile-de-France dans le cadre du DIM MALINF

Composition du jury :

Mme Claire VALIENTE-MORO, Maître de Conférence, UCB Lyon 1

M. Olivier PLANTARD, Directeur de Recherche, INRAE

Mme Julie REVEILLAUD, Chargée de Recherche, INRAE

M. Jean-François GUÉGAN, Directeur de Recherche, IRD/INRAE

Mme Muriel VAYSSIER-TAUSSAT, Directrice de recherche, INRAE

M. Thomas POLLET, Chargé de Recherche, INRAE

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Président du jury

Directrice de thèse

Co-encadrant de thèse

UMR 956 BIPAR

14 rue Pierre et Marie Curie, 94 700 Maisons-Alfort, France

¹ INRAE, Département de Santé Animale, Nouzilly, France

² UMR BIPAR, INRAE, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

REMERCIEMENTS

Après ces trois années de thèse, cette partie est loin d'être la plus facile à écrire. Tant de personnes ont été présentes, que ce soit d'un point de vue professionnel, amical ou familial.

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse, qui ont eu la gentillesse d'accepter de prendre de leur temps pour évaluer ce travail. Merci à Claire Valiente-Moro et Olivier Plantard d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Merci également à Julie Reveillaud et Jean-François Guégan d'avoir accepté de faire partie des membres du jury en tant qu'examineurs.

Un grand MERCI bien sûr à mes directeurs de thèses Muriel Vayssier-Taussat et Thomas Pollet. Merci évidemment pour vos conseils tout au long de cette thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès et d'effectuer plusieurs voyages à l'étranger (souvent au soleil !). Muriel, je te remercie plus particulièrement pour la confiance que tu m'as accordée en me donnant l'opportunité d'effectuer cette thèse et pour m'avoir préparée aux deux concours qu'il a fallu passer pour la décrocher. Merci d'avoir toujours trouvé/pris du temps, plus particulièrement dans les moments les plus difficiles. Je t'en suis infiniment reconnaissante. Thomas, je te remercie profondément pour ton accompagnement et ton soutien tout au long de cette thèse, et ce en toutes circonstances. Merci aussi pour ta gentillesse, ta patience ainsi que ta positive et zen attitude quotidienne, surtout vers la fin de l'écriture de ce manuscrit, ce n'était pas de trop ! Merci !

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse : Sara Moutailler, Jean-François Cosson, Jean-François Humbert et Hein Sprong pour leurs précieux conseils et leur disponibilité. Un grand merci également à Françoise Rul, mon encadrante de stage de DUT et de Master, pour avoir accepté d'être ma référente et avoir pris le temps d'assister à mes comités de thèse ; mais aussi et surtout, pour m'avoir donné l'envie de poursuivre dans cette belle voie qu'est la recherche et de poursuivre en thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de cette thèse et qui ont ainsi participé son avancée. Plus particulièrement, un grand merci à Julien Chiquet pour son aide précieuse dans la réalisation des modèles, ainsi que pour sa

disponibilité et pour nos nombreux échanges. Merci également aux biostatisticiens et bio-informaticiens de la plateforme Migale, Mahendra Mariadassou, Olivier Rué et Cédric Midoux. Merci à Karine Chalvet-Monfray, pour son aide et pour nos nombreux échanges dans le cadre de l'écriture de l'article dynamique des agents pathogènes. Un grand merci à Maud Marsot pour sa gentillesse, sa disponibilité, et pour ses réponses à mes nombreuses questions statistiques. Je tiens également à remercier Agustín Estrada-Peña, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant trois mois. Merci pour toutes les discussions stimulantes, pour son aide précieuse dans l'analyse des données. Mais aussi pour sa sympathie et sa bienveillance. Merci à lui ainsi qu'à Natalia, pour tous les bons moments passés pendant ces trois mois. Je remercie également (et à nouveau) Hein Sprong pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dans le cadre de la mission STSM du COST EurNegVec. Merci pour toutes nos discussions stimulantes avec Aleksandra Krawczyk. Je la remercie également pour son accueil et sa gentillesse.

Je remercie évidemment l'ensemble des membres de l'UMR BIPAR, plus particulièrement les occupants, passés et présents, de notre maisonnette, le bâtiment carré. Camille, Clémence, Léna, Lisa, Lourdes, Matthieu, Elodie, Adrien, Mathilde, Tamara, Sandy, Maëlllys, Mohamed, Lara, Consuelo, Sabine, Baptiste, Eléonore, Béatrice, Zineb, Evelyne, Françoise, Martine, Ladislav, Grégoire, Anne-Claire, Clotilde, Jean-François, Marie-Pierre, les Sara(h), Muriel et Thomas, je vous remercie tous pour les bonnes tranches de rigolades et de gâteaux, les blagues (même les ratées !), les batailles d'eau, les mots ~~croisés~~ (fléchés !) ... Bref, pour tous les beaux moments passés avec vous ...

J'ai une pensée particulièrement émue pour Jean-François. J'ai vraiment adoré réaliser les animations scolaires et grand public à tes côtés. Je te suis très reconnaissante de m'y avoir associée. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur à toutes épreuves. Optimiste en toutes circonstances. C'est le souvenir que je garderai de toi.

Un grand merci à tous mes proches qui m'ont soutenue au cours de cette thèse.

Je pense bien sûr à la fine équipe du Master & Cie : Mahnaz, Jean-Gabriel, Yoann, Margaux, Mélanie, Xavier, Antoine, Emilie, Maher, sans oublier la relève, l'adorable Logan. Nous sommes plusieurs à avoir vécu nos thèses ensemble ces trois dernières années. Merci pour votre soutien, pour nos éclats de rires, pour nos soirées à refaire le monde jusque tard dans la nuit ...

Mes compères de la licence, Ophé, Coco, Clément, Thib et Quentin. Merci pour nos délires, pour les soirées, pour les moments de joie et de bonheur passés ensemble.

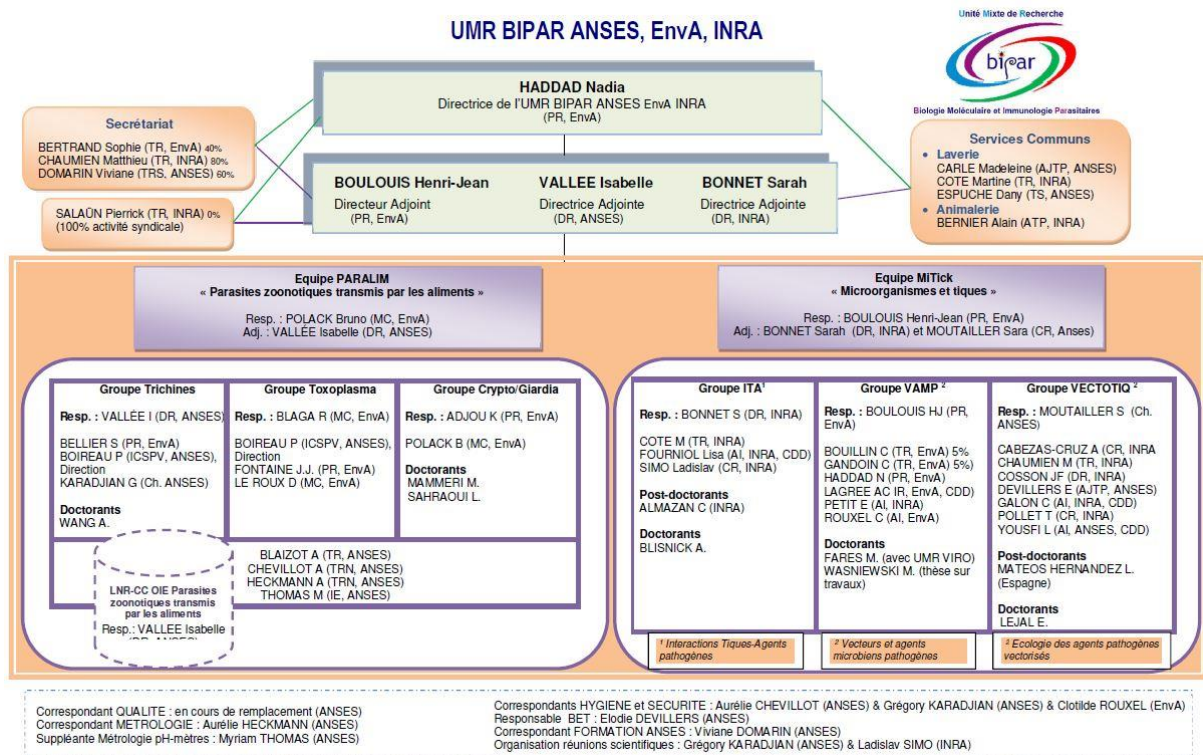
Ma petite Ln, survivante du DUT, merci pour ta bonne humeur, toujours au rendez-vous, et tes bons conseils, précieux pour me remonter le moral.

Mes amis de toujours, Tatou, Juju, Ninou, Ornella, Estelle, Barbidou, Jojo, Kéké, Titi, Léo ... On ne s'est pas beaucoup vu ces derniers temps, mais à chaque fois c'est comme si on s'était quittés hier. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

J'adresse évidemment un grand merci à ma famille. Mes grands-parents, Audrey, Thibault, Maman et Papa. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'être d'un soutien sans faille, dans tous les aspects de la vie. Sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. Maman, je crois que l'on peut affirmer sans se tromper que ce n'est pas de papa que me vient l'amour des sciences, merci à toi pour ce bel héritage. Papa, merci de m'avoir toujours encouragée à me dépasser et à aller toujours plus loin.

Benjamin, toi qui partages ma vie au quotidien, qui sais toujours me donner le sourire et me faire rire, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir soutenue tout au long de ces trois années.

Cette thèse a été financée par la région Ile-de-France *via* un financement du DIM Malinf (Domaine d'Intérêt Majeur Maladies Infectieuses, parasitaires et nosocomiales émergentes) ainsi que par l'INRAE *via* le métaprogramme MEM (Méta-omiques et Écosystèmes Microbiens) et le département santé animale. Elle a été réalisée au sein de l'unité mixte de recherche Biologie moléculaire et Immunologie PARasitaire, BIPAR (INRAE, ANSES, ENVA). Cette unité est composée de 2 équipes (Mitick et Paralim) elles-mêmes composées de trois groupes distincts. Mes activités de recherche, réalisées sous la direction scientifique de Muriel Vayssier-Taussat et Thomas Pollet s'intègrent dans les thématiques de recherche développées par l'équipe Mitick et plus particulièrement par le groupe VECTOTIQ dont la composition est donnée ci-dessous.



Questions de recherche développées au sein du groupe VECTOTIQ :

[https://www6.inra.fr/bipar/Qui-sommes-nous/Les-equipes/MiTick-Responsable-H.J.-](https://www6.inra.fr/bipar/Qui-sommes-nous/Les-equipes/MiTick-Responsable-H.J.-Boulouis/Groupe-Vectotiq-Responsable-S.-Moutailler)

[Boulouis/Groupe-Vectotiq-Responsable-S.-Moutailler](https://www6.inra.fr/bipar/Qui-sommes-nous/Les-equipes/MiTick-Responsable-H.J.-Boulouis/Groupe-Vectotiq-Responsable-S.-Moutailler)

SOMMAIRE

LISTE DES TABLES ET FIGURES	9
LEXIQUE	10
INTRODUCTION GÉNÉRALE	12
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Origine, phylogénie et systématique des tiques	17
II. Les tiques : un focus sur <i>Ixodes ricinus</i>	20
1. Répartition géographique	21
2. Anatomie	22
A. Anatomie externe.....	22
B. Anatomie interne	25
a. Le système circulatoire.....	26
b. Le système digestif	26
c. Le système excréteur.....	27
d. Les glandes salivaires.....	27
e. Le système nerveux	28
f. Le système respiratoire	28
g. Le système reproducteur	29
3. Cycle de vie, comportement et environnement	30
4. Importance en santé humaine et animale	33
A. Les impacts directs et indirects	33
B. Les agents pathogènes vectorisés par <i>I. ricinus</i>	34
a. <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	34
b. <i>Borrelia miyamotoi</i>	36
c. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	37
d. <i>Neoehrlichia mikurensis</i>	39
e. <i>Rickettsia helvetica</i> et <i>Rickettsia monacensis</i>	40
f. <i>Bartonella henselae</i>	41
g. <i>Coxiella burnetii</i>	41
h. <i>Francisella tularensis</i>	42
i. <i>Babesia divergens</i> , <i>Babesia venatorum</i> et <i>Babesia microti</i>	43
j. Le virus de l'encéphalite à tiques et le louping ill.....	45
C. Les co-infections	46

III.	Concept de Pathobiome et importance de l'étude du microbiote des tiques.....	47
1.	Le pathobiome.....	47
2.	Les communautés microbiennes des tiques	50
3.	Le microbiote d' <i>Ixodes ricinus</i>	54
	RAPPEL DES OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	57
	CHAPITRE I : Dynamique des agents pathogènes à différentes échelles.....	59
I.	Méthode de détection des agents pathogènes : La PCR micro-fluidique	60
1.	Principe.....	60
2.	Le criblage haut débit des agents pathogènes circulant chez les tiques	61
II.	Dynamique temporelle des agents pathogènes chez <i>Ixodes ricinus</i>	63
1.	Présentation générale de l'étude et principaux résultats	63
A.	Contexte de l'étude	63
B.	Méthodes	63
C.	Résultats principaux et discussion.....	64
2.	Article I : Publié dans la revue Parasites & Vectors.....	66
III.	Identification des agents pathogènes à l'échelle des organes chez <i>Ixodes ricinus</i>	80
1.	Présentation générale de l'étude et principaux résultats	80
A.	Contexte de l'étude	80
B.	Méthodes	80
C.	Résultats principaux et discussion.....	80
2.	Article II: Publié dans la revue Parasites & Vectors.....	82
	CHAPITRE II : Dynamique du microbiote et interactions microbiennes	90
I.	Méthode d'étude : Amplification et séquençage du gène de l'ARN 16s par la technique Illumina.....	92
II.	Contrôles négatifs et élimination des séquences contaminantes	95
1.	Présentation générale de l'étude et principaux résultats	95
A.	Contexte de l'étude	95
B.	Méthodes	96
C.	Résultats principaux et discussion.....	96
2.	Article III : Soumis dans la revue Frontiers in Microbiology.....	98
III.	Dynamique et interactions du microbiote d' <i>Ixodes ricinus</i>	119
1.	Présentation générale de l'étude et principaux résultats	119
A.	Contexte de l'étude	119
B.	Méthodes	119
C.	Résultats principaux et discussion.....	120
2.	Article IV : En préparation	122

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	148
BIBLIOGRAPHIE.....	163
ANNEXES.....	185

LISTE DES TABLES ET FIGURES

Table 1: Microbiote d' <i>Ixodes ricinus</i> , identifié par technologie de séquençage haut débit....	56
Figure 1: Représentation du concept d'échelle appliqué à l'étude du microbiote des tiques.	15
Figure 2: Systématique des tiques au sein des arthropodes et exemple d'espèces.	18
Figure 3: Principaux traits distinctifs entre Ixodidae et Argasidae.	18
Figure 4: Hypothèses de l'origine des tiques.	20
Figure 5: Distribution de la tique <i>Ixodes ricinus</i> en Europe.	21
Figure 6: Anatomie externe de la tique <i>Ixodes ricinus</i>	24
Figure 7: Anatomie interne d'une femelle Ixodidae.	25
Figure 8: Photographie du ganglion cérébroïde de la tique dure <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	28
Figure 9: Les étapes de l'oviposition chez une femelle Ixodidae.	29
Figure 10: Cycle de vie de la tique <i>Ixodes ricinus</i>	32
Figure 11: Photo d'une tique <i>Ixodes ricinus</i> à l'affût, prise en forêt de Sénart.	32
Figure 12: Plan d'étude.	58
Figure 13: Présentation d'une puce microfluidique (Biomark™ dynamic array, Fluidigm). .	61
Figure 14: Régions variables de l'ARN 16s d' <i>Escherichia coli</i>	92
Figure 15: Les étapes du séquençage Illumina.	94

LEXIQUE

Les définitions mentionnées ci-après, visent à informer le lecteur quant au sens qui a été considéré dans le contexte de l'écriture de ce manuscrit.

- **Agent pathogène** : Organisme susceptible de causer une maladie chez un hôte donné. Au cours de cette thèse, nous considérerons comme agent pathogène, tout micro-organisme responsable de maladie chez l'Homme et l'animal de compagnie ou d'élevage.
- **Pathobiome** : Concept visant à considérer l'agent pathogène intégré au sein de son écosystème, c'est-à-dire en interaction avec l'ensemble des micro-organismes qui composent cet écosystème.
- **Microbiote** : Ensemble des micro-organismes présents dans un écosystème donné.
- **Symbiose** : Établissement d'une relation stable et intime entre deux (micro)-organismes. Dans le cas de relation entre un organisme multicellulaire et un organisme unicellulaire, le premier est qualifié d'hôte et le second de **symbiote**. Ce dernier, lorsqu'il réside au sein des cellules de son hôte, est qualifié d'**endosymbiote**. Le (endo)symbiote est transmis verticalement chez son hôte.
- **Commensal** : Ce terme signifie littéralement « qui vit à la table de l'autre », en microbiologie il qualifie tout micro-organisme pouvant coloniser un hôte, sans y occasionner de coût.
- **Compétence vectorielle** : Désigne la faculté d'un vecteur à acquérir, maintenir et transmettre un agent pathogène en conditions expérimentales. À ne pas confondre avec la Capacité vectorielle, qui désigne l'ensemble des attributs d'un vecteur qui vont participer à sa capacité de transmettre un agent pathogène chez une population sensible, en conditions environnementales.
- **Unité Taxonomique Opérationnelle ou Operational Taxonomic Unit (=OTU)** : En séquençage du gène de l'ARN 16s, une OTU correspond à un groupe de séquences réunies sur la base de leur similarité (souvent basée sur un minimum de 97% d'homologie).
- **Diversité du microbiote** : Ce terme fait référence à la variabilité de l'ensemble des micro-organismes présents au sein d'un écosystème. La mesure de la diversité microbienne est une caractéristique très employée en écologie microbienne pour caractériser les communautés étudiées. Elle peut-être, taxonomique, phylogénétique ou fonctionnelle.

- **Composition du microbiote** : Est relative à l'identité des taxons/groupes phylogénétiques/groupes fonctionnels qui composent le microbiote.
- **Structure du microbiote** : Tient compte des abondances relatives des différents taxons/groupes phylogénétiques/groupes fonctionnels qui composent le microbiote.
- **Richesse du microbiote** : Correspond au nombre de taxons/groupes phylogénétiques/groupes fonctionnels qui composent le microbiote.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les tiques sont des organismes strictement hématophages, capables d'infester toutes les classes de vertébrés terrestres, mammifères, oiseaux, reptiles et même amphibiens. Du fait de leur mode de vie, elles sont responsables de la transmission d'un grand nombre d'agents pathogènes pour l'homme ou l'animal, aussi bien des bactéries, que des virus ou protozoaires et même des nématodes (de la Fuente *et al.*, 2008). Elles peuvent également être responsables, par le simple fait de leur piqûre, de paralysies, d'allergies, de plaies et abcès pouvant occasionner des infections secondaires. Elles peuvent même, en cas d'infestation d'un animal par un grand nombre de tiques, entraîner des cas de spoliation sanguine pouvant engendrer une anémie sévère. On compte actuellement plus d'une quinzaine de maladies à tiques chez l'homme et plus d'une vingtaine chez les animaux domestiques et d'élevage (de la Fuente *et al.*, 2008; Dantas-Torres, 2015). Ces maladies constituent des enjeux importants, que ce soit en termes de santé humaine et animale ou d'un point de vue économique. En Europe, les tiques représentent d'ailleurs les premiers vecteurs d'agents pathogènes pour l'homme et l'animal, et constituent ainsi un problème de santé publique et vétérinaire préoccupant (Parola and Raoult, 2001; Jongejan and Uilenberg, 2004; de la Fuente *et al.*, 2008; Heyman *et al.*, 2010). Les maladies à tiques connaissent d'ailleurs une recrudescence (Rizzoli *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2012; ECDC, 2014; Rosenberg, 2018) pouvant être due à plusieurs facteurs, à la fois climatiques (changements globaux influant sur les températures et précipitations, pouvant impacter la survie des populations de tiques), écologiques (expansion du couvert forestier, augmentation des populations de réservoirs d'agents pathogènes et d'hôtes des tiques...) et sociologiques (meilleures connaissances dans le domaine médical, meilleure sensibilisation du grand public, changements des comportements humains favorisant le contact avec les tiques...). Dans un tel contexte, l'un des objectifs de nombreux acteurs de la recherche sur les tiques et maladies à tiques est de caractériser les mécanismes qui sont à l'origine de la compétence vectorielle des tiques pour ces différents agents pathogènes. Une meilleure compréhension de ce système constitue une base nécessaire à l'amélioration des méthodes de lutte et de prévention contre les maladies à tiques. Jusqu'à il y a peu, cet objectif était principalement réalisé en étudiant l'interaction entre l'hôte (la tique) et les agents pathogènes responsables des maladies. Toutefois, une nouvelle vision a

récemment émergé avec la proposition d'un nouveau paradigme, le pathobiome, qui est de considérer l'agent pathogène dans son environnement biotique (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014). En effet, outre les agents pathogènes, les tiques sont également porteuses d'une multitude d'autres micro-organismes, dont certains peuvent être cruciaux dans la physiologie et l'activité de la tique mais aussi capables d'influencer l'acquisition et/ou la transmission des agents pathogènes (Narasimhan *et al.*, 2014; Duron *et al.*, 2018). L'ensemble de ces micro-organismes portés par les tiques forme leur microbiote.

L'importance de la composition et de la dynamique du microbiote a été démontré dans de nombreux écosystèmes. Chez l'Homme, par exemple, l'étude du microbiote et des interactions existant entre les différents micro-organismes qui le compose (antagonisme ou coopération), a permis de montrer son importance dans l'établissement de maladies inflammatoires, dans l'obésité ou même dans la dépression (Chow *et al.*, 2011; Ridaura *et al.*, 2013; Naseribafrouei *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2016). Dans le cas des arthropodes, il a récemment été démontré chez plusieurs espèces de moustiques que la composition de leur microbiote jouait un rôle significatif dans leur compétence vectorielle vis-à-vis de plusieurs virus et protozoaires (Moreira *et al.*, 2009; Cirimotich *et al.*, 2011; Mousson *et al.*, 2012), ouvrant ainsi la voie à la mise en place de méthodes de lutte innovantes contre ces agents pathogènes (World mosquito program : <http://www.eliminatedengue.com/program>)

Ainsi, la mise en évidence de l'importance que peut avoir le microbiote dans l'établissement de maladies infectieuses ou encore dans leur dissémination, vient étayer la nécessité de changer de paradigme et de se tourner vers la notion de pathobiome. Dans le cas des maladies à tiques, cette nécessité a été soulignée par plusieurs membres de la communauté travaillant sur ces vecteurs (Vayssier-Taussat *et al.*, 2015). Toutefois, malgré cette prise de conscience de la nécessité de considérer l'ensemble des membres de la communauté microbienne portée par les tiques, d'étudier leur écologie et d'identifier leurs potentielles interactions pour mieux appréhender les maladies à tiques, peu d'informations sont actuellement disponibles sur le pathobiome des tiques et sa dynamique. Ceci est particulièrement vrai chez *Ixodes ricinus*, l'espèce de tique la plus répandue en Europe et qui revêt une grande importance en termes de santé humaine et animale. C'est, en effet, la tique qui transmet la plus grande variété d'agents pathogènes (Heyman *et al.*, 2010), dont les bactéries du complexe *Borrelia burgdorferi* s.l., agents de la maladie de Lyme.

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées chez cette espèce de tique et l'identité des agents pathogènes qu'elle peut potentiellement transmettre est assez bien documentée (Rizzoli *et al.*, 2014). Plusieurs études ont notamment montré que la prévalence des agents pathogènes portés par *I. ricinus* pouvait varier selon leur localisation ou même selon la saison à laquelle elles sont échantillonnées, très probablement en fonction du spectre d'hôtes disponibles dans la zone d'échantillonnage au moment de leur dernier repas sanguin (Wielinga *et al.*, 2006; Sprong *et al.*, 2009; Gassner *et al.*, 2010; Coipan *et al.*, 2013a; Takken *et al.*, 2016; Chvostáč *et al.*, 2018; Little *et al.*, 2019). En revanche, peu d'études portant sur l'ensemble du microbiote d'*I. ricinus* (et ses interactions avec les agents pathogènes) étaient disponibles au début de ce travail de thèse. Néanmoins, l'étude des communautés microbiennes chez d'autres genres ou espèces de tiques, telles qu'*I. scapularis*, *Dermacentor variabilis* ou encore *D. andersoni*, a montré l'existence d'un lien entre la composition du microbiote et l'installation de certains agents pathogènes chez les tiques (Burgdorfer *et al.*, 1981; Burgdorfer, 1988; Macaluso *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2008; Telford, 2009; Narasimhan *et al.*, 2014; Gall *et al.*, 2016; Abraham *et al.*, 2017). Tout comme pour les agents pathogènes, il semble également que la composition et la diversité du microbiote puisse varier en fonction de différents facteurs, tels que l'organe étudié, le sexe, la stase, le lieu d'échantillonnage ou encore la saison à laquelle les tiques sont collectées (Carpi *et al.*, 2011; Lazar *et al.*, 2012; Menchaca *et al.*, 2013; Williams-Newkirk *et al.*, 2014; Van Treuren *et al.*, 2015; Trout Fryxell and DeBruyn, 2016; Zolnik *et al.*, 2016). Ces résultats soulèvent ainsi la problématique de la notion d'échelle qui doit être considérée pour étudier ces communautés. L'échelle a, en effet, une influence déterminante sur la façon dont nous allons conduire une étude, interpréter les résultats et comprendre les processus qui en découlent. Elle influence donc profondément notre capacité à prédire l'effet des facteurs abiotiques ou biotiques sur les communautés microbiennes. De fait, un schéma apparent à une certaine échelle peut disparaître en changeant l'échelle d'étude (Pollet *et al.*, 2020). La perception et la compréhension des processus seraient donc échelle dépendantes. Dans le contexte des communautés microbiennes existant chez les tiques, leur composition et structure seraient susceptibles de varier à la fois dans l'espace et dans le temps, mais également à l'échelle de la tique, notamment en fonction de l'organe étudié ou de la stase de développement considérée.

Dans ce contexte, nous percevons bien que pour mieux appréhender et potentiellement gérer le risque associé aux maladies à tiques, il est nécessaire, non seulement, de considérer la notion de pathobiome, dans l'étude des tiques et des agents pathogènes qu'elles transmettent, mais aussi, de bien considérer cette notion d'échelle et l'aspect dynamique de ce système en interaction avec un ensemble de facteurs biotiques et abiotiques (**Figure 1**).

Figure 1: Représentation du concept d'échelle appliqué à l'étude du microbiote des tiques.
Figure adaptée de Pollet et al. (2020).

Ainsi, mon projet de thèse visait à caractériser et mieux appréhender la dynamique du pathobiome d'*I. ricinus*. Pour cela, il me fallait décrire la dynamique des agents pathogènes ainsi que celle du reste du microbiote de cette tique pour, *in fine*, évaluer la potentielle influence de l'une sur l'autre. Pour cela, deux échelles d'étude ont été considérées : l'échelle temporelle et l'échelle des organes de la tique.

Ce manuscrit de thèse s'articule donc autour de ces deux études et se divisent en trois grandes parties :

- Une synthèse des données bibliographiques décrivant : d'une part, les tiques et plus particulièrement *I. ricinus*, et d'autre part, les agents pathogènes que cette

dernière est susceptible de véhiculer, mais aussi le reste des communautés microbiennes qu'elle héberge ainsi que leurs interactions.

- Les résultats obtenus au cours de ma thèse, qui sont présentés en deux grands chapitres : Un premier, portant sur l'étude de la dynamique des agents pathogènes circulant chez *I. ricinus*, d'une part à l'échelle temporelle, et d'autre part à l'échelle de deux organes clés dans l'acquisition et la transmission des agents pathogènes ; Un second, comprenant une étude de la dynamique temporelle du microbiote d'*I. ricinus* ainsi que l'identification des potentielles co-occurrences existant entre les différents micro-organismes hébergés chez cette espèce de tique.
- Une discussion générale mettant en avant les résultats majeurs de mon projet de thèse ainsi que les perspectives qui pourront en découler.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Origine, phylogénie et systématique des tiques

Les tiques sont des arthropodes appartenant au sous-embranchement des Chélicérates. Les membres de ce groupe se distinguent des Mandibulates, non seulement par la présence de chélicères plutôt que de mandibules, mais aussi par l'absence d'antennes. Les Chélicérates auraient divergé il y a plus de 500 millions d'années au cours du Cambrien (Weygoldt, 1998). Les tiques appartiennent à la classe des Arachnides, divisées en 11 sous-classes, parmi elles, les Acariens, regroupant les ordres : des Acariformes (acariens) et des Parasitiformes (tiques). Parmi les parasitiformes, les tiques appartiennent au sous ordre des Ixodida. Ce sont des organismes strictement hémato-phages dont les grandes caractéristiques morphologiques sont les suivantes : une forme de corps aplatie (lorsqu'elles ne sont pas gorgées), ainsi que la présence de 4 paires de pattes (sauf pour les larves qui en ont trois) et d'un rostre en forme de harpon et composé de nombreuses dents recourbées, adapté à la prise de repas sanguin. Les tiques sont classées dans trois familles : Les Ixodidae, les Argasidae et les Nuttalliellidae, au sein desquelles nous comptons désormais environ 900 espèces décrites dans la littérature (**Figure 2** ; Sonenshine and Roe, 2014). Les Ixodidae, ou tiques dures, sont caractérisées par la présence d'une plaque dorsale chitinisée (le scutum) et par la localisation antérieure des pièces buccales (capitulum). Cette famille comprend à ce jour 692 espèces de tiques (Sonenshine and Roe, 2014). Les Argasidae, ou tiques molles, se distinguent des tiques dures par l'absence de scutum, à la place duquel se trouve une cuticule souple, et par la localisation du capitulum au niveau de la face ventrale (**Figure 3**). On dénombre aujourd'hui 186 espèces de tiques appartenant à cette famille. La famille des Nuttalliellidae, quant à elle, est composée d'une seule espèce *Nuttalliella namaqua* (Nava, 2009) qui présente des caractères morphologiques intermédiaires aux deux autres familles, tels que : la présence d'un scutum, pareil aux tiques dures et d'un tégument mou à l'instar des tiques molles. Quant à la localisation du capitulum de cette espèce, elle se situe à une position intermédiaire à celles observées chez les tiques dures et les tiques molles (Mans *et al.*, 2011).

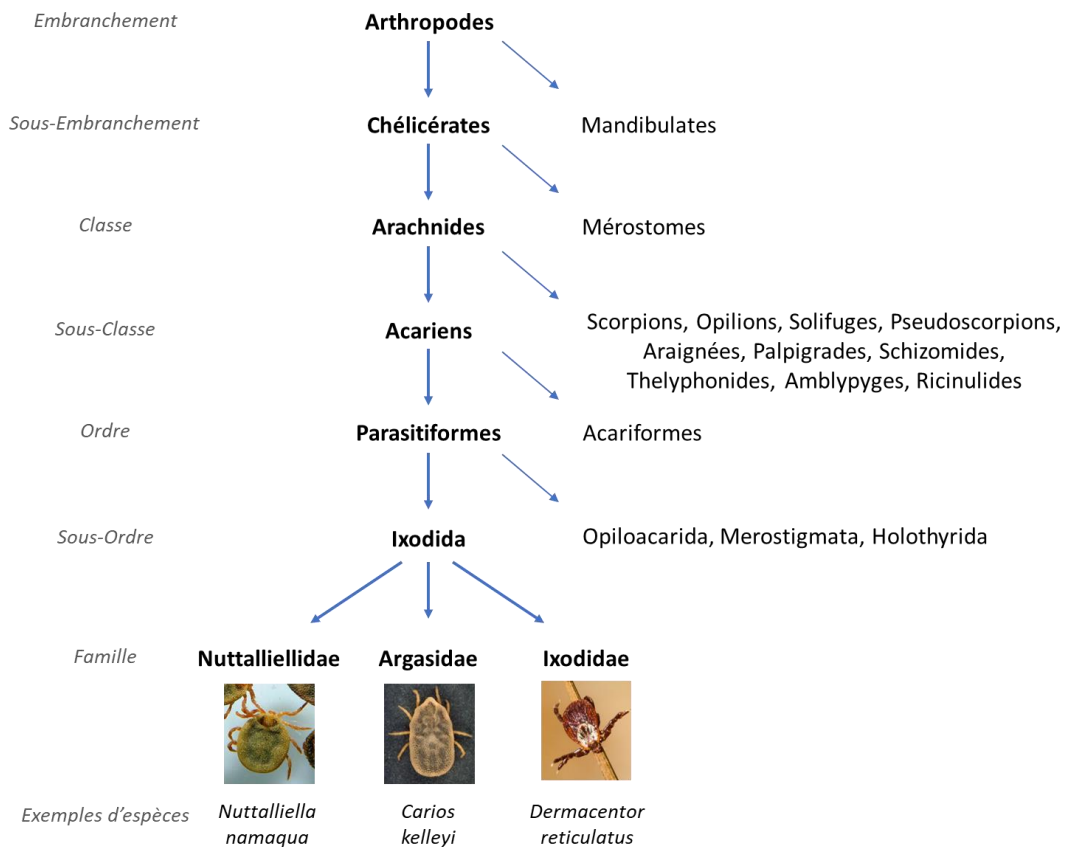


Figure 2: Systématique des tiques au sein des arthropodes et exemple d'espèces.

Figure adaptée de McCoy et Boulanger (2016). Photographie *Nuttalliella namaqua*, source : Mans B.J., de Klerk D., Pienaar R., Latif A.A. – https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nuttalliella_namaqua.png – Rognée. Photographie *Carios kelleyi*, source : CDC, Nicholson W.L. – https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carios_kelleyi_bat.jpg – Basculée. Photographie *Dermacentor reticulatus*, source : Gondard M.

Figure 3: Principaux traits distinctifs entre Ixodidae et Argasidae.

Exemple de tique Ixodidae appartenant au genre *Hyalomma* et exemple de tique Argasidae appartenant au genre *Ornithodoros*. Figure adaptée de Barker et Walker (2014).

Au cours des 150 dernières années, l'existence de plusieurs fossiles de tiques, parfaitement conservés dans de l'ambre, a été rapportée. Ces découvertes ont ainsi permis d'apporter de nouvelles indications aidant à la compréhension de l'évolution de ces arthropodes et de leurs origines (de la Fuente, 2003; Poinar and Brown, 2003; Poinar, 2015; Chitimia-Dobler *et al.*, 2017; Peñalver *et al.*, 2017). La datation de la base du positionnement des tiques est d'ailleurs un sujet controversé et plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet (**Figure 4**). Parmi les fossiles découverts jusqu'ici, on compte à la fois des spécimens correspondants aux tiques dures et aux tiques molles, datant du milieu du Crétacé (90-100 millions d'années). Sachant que des fossiles des représentants de deux des trois familles de tiques circulant aujourd'hui ont été retrouvés, il est très probable que l'existence des tiques soit bien antérieure à cette période (McCoy and Boulanger, 2016). En effet, une origine des tiques datant du début crétacé, comme il a déjà été suggéré par Filippova (1977) et soutenu plus récemment par Klompen *et al.* (2000), impliquerait une divergence rapide des tiques vers les trois familles actuellement connues en moins de 30 millions d'années ce qui, au regard des distances génétiques observées sur les arbres moléculaires, semble peu probable (Mans *et al.*, 2019). Au début des années 80, Hoogstraal et Aeschlimann (Hoogstraal and Aeschlimann, 1982; Hoogstraal, 1985) proposaient une origine des tiques vers la fin du Paléozoïque et le début du Mésozoïque. D'après Hoogstraal, les tiques ancestrales seraient très proches des Argasidae que nous connaissons aujourd'hui et leurs hôtes auraient été des reptiles à peau lisse et à mouvement lent ayant vécu il y a 250 millions d'années. En 1989, basant son hypothèse sur l'existence avérée d'acariens à l'époque du Dévonien, Oliver (1989) avait quant à lui proposé que les tiques, appartenant à l'ordre sœur des Acariformes, devaient probablement déjà exister à cette époque. Point de vue partagé plus tard par Dobson et Barker (1999). En 1994, en se basant sur l'étude des caractères biogéographiques de la dérive des continents, Balashov (1994) avait estimé l'apparition des tiques avant la rupture de la Pangée au début du Jurassique, il y a plus de 200 millions d'années. Plus récemment, plusieurs études basées sur des considérations phylogéographiques ainsi que sur la datation moléculaire de plusieurs spécimens, ont estimé l'origine des tiques entre la fin du Carbonifère et le Permien (Jeyaprakash and Hoy, 2009; Mans *et al.*, 2011, 2012, 2019). Plus particulièrement, l'étude de Mans *et al.* (2011), reposant sur l'étude de spécimens de tiques échantillonnés en Afrique du Sud, appartenant à l'espèce *Nuttalliella namaqua*, qualifiée par ces auteurs de « fossile vivant », estime l'origine des tiques au cours du Permien dans le bassin de Karoo, situé à

l'époque dans le super continent du Gondwana. D'après ces auteurs, l'extinction de masse ayant lieu à la fin du Permien et étant à l'origine de la diversification des espèces de vertébrés au cours de la période du Trias (Botha and Smith, 2006; Sahney and Benton, 2008), aurait eu pour conséquence la spéciation des tiques, donnant ainsi lieu à l'apparition des principales familles de tiques circulant aujourd'hui.

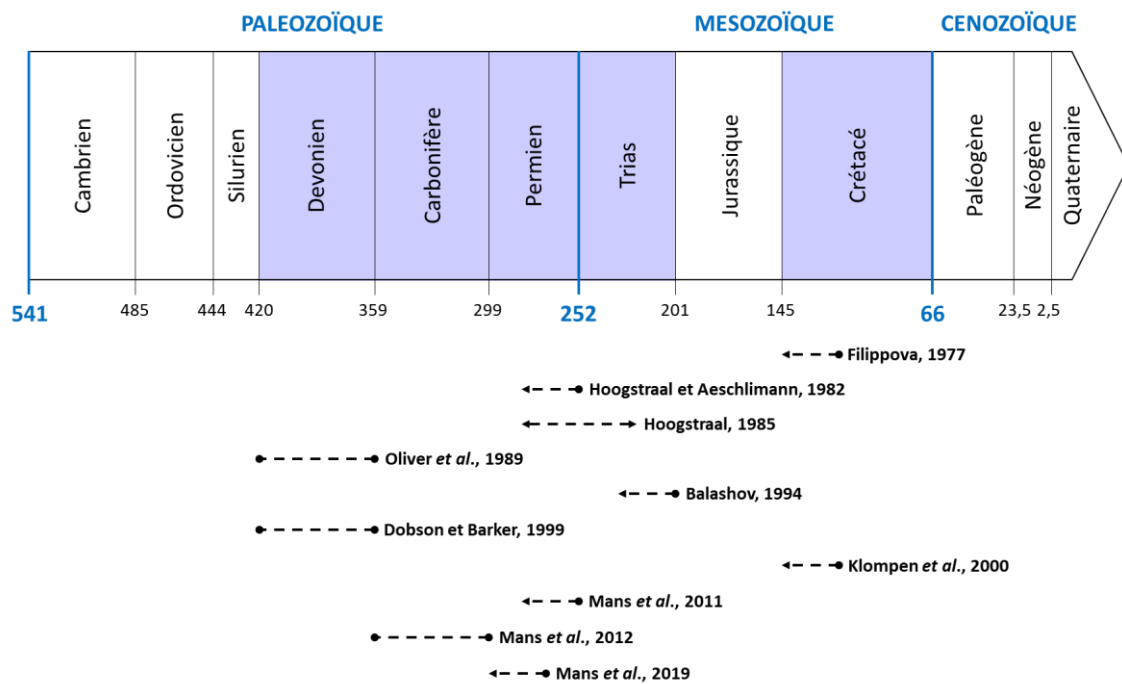


Figure 4: Hypothèses de l'origine des tiques.

Échelle des temps géologiques de l'éon du Phanérozoïque, selon la classification de 2018 de la Commission Internationale de Stratigraphie. Les périodes colorées en bleu sont celles au cours desquelles la datation de la base du positionnement des tiques a été suggérée dans la littérature.

II. Les tiques : un focus sur *Ixodes ricinus*

Les parties II.1., II.3. et II.4. ont fait l'objet d'un article de revue, publié dans *La Revue de Biologie Médicale* (**Annexe 1**):

Vayssier-Taussat, M., Lejal, E., Pollet, T., 2020. Les agents pathogènes transmis par la tique *Ixodes ricinus* : quoi de neuf ? *La Revue de Biologie Médicale* 353-Mars-Avril 2020.

Comme évoqué précédemment, il existe environ 900 espèces de tiques décrites aujourd'hui. Au cours de cette thèse, je me suis focalisée sur l'étude de la tique dure *Ixodes ricinus*, espèce la plus importante en terme de santé publique et animale en Europe,

car elle y constitue le principal vecteur de nombreux agents pathogènes pour l'homme et/ou l'animal, dont l'agent responsable de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi* s.l..

Dans cette partie, je décrirai donc la répartition géographique, l'anatomie ainsi que le cycle de vie des tiques du genre *Ixodes*, et plus particulièrement *Ixodes ricinus*, dont j'expliquerai également l'importance en santé humaine et animale.

1. Répartition géographique

Les tiques du genre *Ixodes* sont présentes dans les 12 zones biogéographiques de la planète (McCoy and Boulanger, 2016). En Europe, *Ixodes ricinus* est l'espèce la plus commune et elle y est largement distribuée (Figure 5).

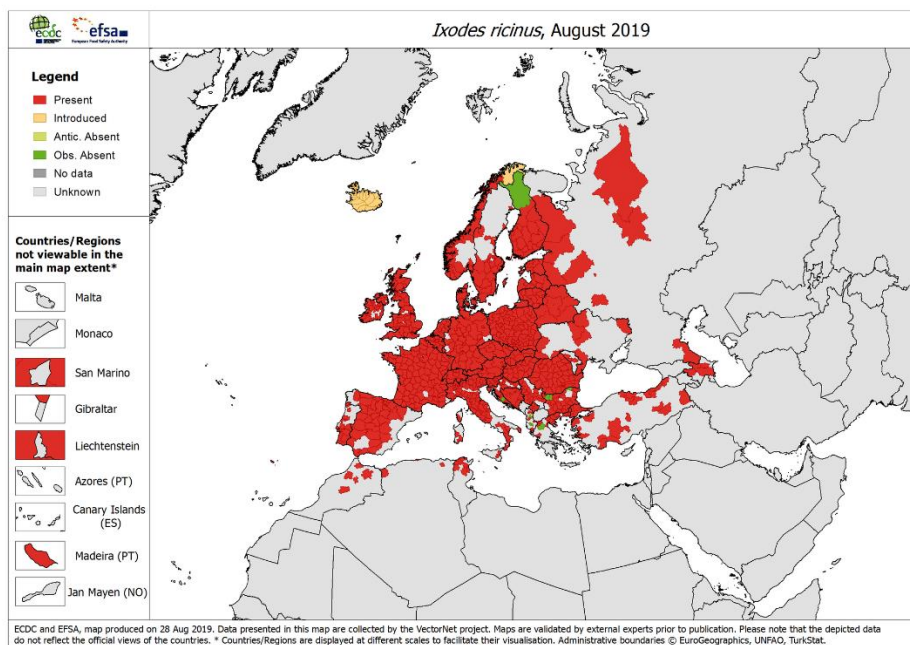


Figure 5: Distribution de la tique *Ixodes ricinus* en Europe.

D'après le centre Européen de prévention et contrôle des maladies (ECDC - European Centre for Disease prevention and Control) et l'autorité Européenne de sureté des aliments (EFSA – European Food Safety Authority) – Mise à jour: Août 2019 - <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-january-2019>

Les tiques *I. ricinus*, ne sont capables de parcourir d'elles-mêmes que de faibles distances (Gray, 1985), mais leur mode de vie parasitaire leur offre la possibilité d'être véhiculées par leurs hôtes sur de plus larges distances, allant de quelques kilomètres (lorsqu'elles sont transportées par de gros mammifères dont les cervidés - Quiller *et al.*, 2016) à plusieurs centaines (lorsqu'elles sont portées par des oiseaux migrateurs - Hasle *et al.*, 2009;

Hasle, 2013). Cela étant, cette capacité à elle seule n'est pas suffisante pour expliquer leur localisation, qui semble être principalement déterminée par leur aptitude à s'épanouir dans un environnement donné. En effet, *I. ricinus* est sensible à la dessiccation. En conséquence, sa localisation est principalement restreinte aux zones présentant des précipitations modérées à élevées, où elle sera majoritairement retrouvée dans des biotopes offrant une végétation abondante permettant d'une part, de maintenir l'humidité nécessaire à sa survie, mais aussi d'abriter et de nourrir ses hôtes (Jaenson and Lindgren, 2011; Agoulon *et al.*, 2012; Medlock *et al.*, 2013). Ainsi, les principaux facteurs impactant sa distribution vont être des facteurs : climatiques (température, précipitation, couvert neigeux...), anthropogéniques (gestion de l'utilisation des terres ainsi que de la faune et de la flore), écologiques et géographiques (structure et connectivité des habitats, orientation des versants de montagnes, dispersion des hôtes) (Medlock *et al.*, 2013).

La distribution d'*I. ricinus* connaît actuellement une expansion à la fois vers le nord de l'Europe, mais aussi en altitude dans les zones montagneuses (Materna *et al.*, 2005, 2008; Jaenson *et al.*, 2012). Parmi l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer cette distribution, le changement climatique a notamment été incriminé dans son expansion. En effet, dans ces localités, l'augmentation globale des températures saisonnières et annuelles, associée à d'importantes précipitations, permettraient d'une part, d'augmenter la période d'activité d'*I. ricinus*, et d'autre part, d'augmenter la période de végétation, créant ainsi un environnement favorable à son développement et à celui de ses hôtes, dans des espaces qui n'étaient autrefois pas ou peu colonisables (Léger *et al.*, 2013; Medlock *et al.*, 2013).

2. Anatomie

A. Anatomie externe

Le corps des tiques est divisé en deux parties (**Figure 6A**) : le capitulum, qui comprend les pièces buccales, et l'idiosome sur lequel sont fixées quatre paires de pattes (sauf pour la stase larvaire qui n'en compte que trois). Chez les Ixodidae, le capitulum constitue la partie antérieure du corps. Ce dernier est constitué de deux pédipalpes, organes sensoriels intervenant dans le repérage de l'hôte, ainsi que d'un rostre, impliqué dans la prise du repas sanguin. Ce rostre est constitué de deux chélicères mobiles, dont l'extrémité denticulée permet la dilacération des chairs, ainsi que d'un hypostome denticulé en forme de harpon,

qui, avec les chélicères, va participer à l'ancrage de la tique dans l'épiderme de l'hôte lors du repas sanguin (**Figure 6A** ; Richter *et al.*, 2013). Il existe 3 stases de développement chez les tiques (**Figure 6B**) : la larve, la nymphe et les adultes (mâle et femelle), mesurant respectivement moins de 1mm, 2 à 3mm et 3 à 4mm pour les individus appartenant au genre *Ixodes*. Au sein de ce genre, les femelles sont toujours sensiblement plus grandes que les mâles. Outre leur taille, ces stases présentent plusieurs disparités anatomiques, caractéristiques de leurs comportements: capacité de s'accoupler ou d'effectuer un repas sanguin (McCoy and Boulanger, 2016). Chez la femelle, le capitulum comprend au niveau de sa partie basale, deux dépressions, les aires poreuses, qui vont avoir une activité sécrétoire lors de la ponte des œufs (Pérez-Eid, 2007). L'idiosome, sur sa face dorsale, est recouvert d'une cuticule extensible qui va permettre l'augmentation du volume de la tique lors du repas sanguin. Chez les tiques dures, telles qu'*I. ricinus*, son élasticité n'étant pas suffisante pour contenir l'ensemble du repas sanguin, cette cuticule va être synthétisée par la tique tout au long de son gorgement. Chez les membres de cette famille, l'idiosome est en partie recouvert, en position antérieure, par une surface chitinisée, le scutum. Chez les mâles adultes, ce scutum recouvre même la totalité de l'idiosome. Sur la face ventrale de l'idiosome, en position postérieure se trouve plusieurs orifices : 1) l'anوس, retrouvé chez les 3 stases des tiques ; 2) l'orifice génital (ou gonopore) en forme de fente, uniquement retrouvé chez les adultes ; 3) deux stigmates (orifices respiratoires), situés en position latéro-ventrale juste en dessous de la 4^{ème} paire de pattes, absents chez la stase larvaire dont la respiration se fait au travers de la cuticule. Les pattes sont fixées par une coxa à la face ventrale de l'idiosome, elles sont chacune divisées en six segments et leur extrémité est composée d'une paire de griffes et d'une pulville (sorte de ventouse), permettant la fixation sur l'hôte (McCoy and Boulanger, 2016).

Figure 6: Anatomie externe de la tique *Ixodes ricinus*.

A : Schéma représentatif d'une femelle adulte. B : Schéma représentatif des différentes stases de la tique. *Figure adaptée de Estrada-Peña et al. (2018a).*

Les tiques possèdent plusieurs organes sensoriels nécessaires à l'évaluation des conditions climatiques, la recherche d'hôte ou encore d'un partenaire sexuel, processus indispensables à leur survie à court, moyen et long terme. Parmi ces organes sensoriels, on compte, les soies, qui sont des sensilles mécano-proprioceptives ou chémoréceptrices, distribuées sur l'ensemble du corps. Les tiques sont également pourvues, à l'extrémité de chacune des deux premières pattes, d'un organe sensible au degré d'hygrométrie ainsi qu'aux phéromones, l'organe de Haller (Lees, 1948; Waladde and Rice, 1982). Il va leur permettre, entre autres, de détecter la présence d'un hôte en captant les variations de CO₂ ainsi que la chaleur des métabolites qu'il dégage (McCoy and Boulanger, 2016). Comme évoqué ci-dessus, les pédipalpes jouent également un rôle sensoriel. Situées de part et d'autre du rostre, elles sont formées de 4 articles, le terminal étant pourvu d'un champ sensoriel composé de 10 à 15 sensilles (mécano-proprioceptives ou chémoréceptrices). Ces pédipalpes ont uniquement un rôle sensoriel et ne pénètrent pas dans l'épiderme lors du repas sanguin (Sonenshine and Roe,

2014). Enfin, certaines espèces de tiques sont pourvues d'yeux (ou ocelles), mais ce n'est pas le cas d'*I. ricinus* (McCoy and Boulanger, 2016). Elle dispose en revanche d'une vingtaine de cellules photosensibles disposées de façon dorsolatérale (Perret *et al.*, 2003).

B. Anatomie interne

L'anatomie interne des tiques molles et tiques dures est très semblable. Tout au long de cette partie, je décrirai les parties communes et les distinctions propres à la famille et au genre auxquels *I. ricinus* appartient.

Le corps des tiques est constitué de différents systèmes : circulatoire, digestif, salivaire, respiratoire, nerveux, reproducteur, excréteur et musculaire. L'ensemble des organes et tissus formant ces systèmes se trouve au sein de la cavité interne des tiques (hémocoèle) et baigne dans l'hémolymphe, liquide s'apparentant au sang des vertébrés, et permettant le transport et l'échange de nutriments, d'hormones et de produits du métabolisme cellulaire (Sonenshine and Roe, 2014). L'anatomie interne des tiques est représentée en **Figure 7**.

Figure 7: Anatomie interne d'une femelle Ixodidae.

A : Coupe frontale, adaptée de Peirez-Eid (2007); B : Coupe sagittale, adaptée de Mehlhorn (2001).

a. Le système circulatoire

Le système circulatoire est un système ouvert qui va permettre la circulation de l'hémolymphe au sein de l'hémocoèle, des pattes et du capitulum. Pour cela, il est composé d'un organe pulsatile (le cœur), situé sur la ligne dorsale médiane du corps de la tique, d'une artère aorte ainsi que de plusieurs sinus et vaisseaux artériels (Sonenshine and Roe, 2014). L'hémolymphe est pompée depuis l'hémocoèle par le cœur, qui va ensuite la propulser vers le sinus periganglionique (entourant le synganglion) à partir duquel elle sera redistribuée par des artères jusqu'aux pattes et aux sinus antérieurs et ventraux. De là, elle sera transportée jusqu'à la base du capitulum ainsi que dans les pièces buccales et l'hémocoèle irrigant ainsi l'ensemble du corps (Sonenshine and Roe, 2014). L'hémolymphe est composée de plasma, dans lequel baignent une variété de cellules, les hémocytes, ainsi que diverses protéines. Parmi les plus abondantes, l'hème-lipoglycoprotéine (présente à chacune des stases de tiques), et, uniquement chez les femelles la vitellogénine, qui permettent le stockage et le transport de la molécule d'hème, issue de la digestion de l'hémoglobine de l'hôte (Sonenshine and Roe, 2014). Dans le plasma des tiques se trouvent aussi des défensines, lectines et lysozymes, qui, en association avec les cellules immunitaires des tiques, constituent le système de défense immunitaire innée des tiques (McCoy and Boulanger, 2016).

b. Le système digestif

Dans l'ordre de parcours du repas sanguin, le système digestif est composé : du canal préoral, du pharynx, de l'œsophage, de l'intestin moyen (composé de cæcums, ou diverticules, reliés à un estomac central), et de l'intestin postérieur (composé d'un intestin tubulaire étroit, d'un sac rectal et d'un rectum). Les tiques étant dépourvues de canaux salivaire et alimentaire individualisés, le canal préoral permet l'aspiration du sang et la sécrétion de la salive. L'alternance entre ces deux mécanismes est permise grâce à une valve pharyngale, qui, lors de la contraction du pharynx, se ferme, empêchant la régurgitation et contrôlant ainsi l'influx du sang. Le sang ingéré va passer ensuite par l'œsophage pour rejoindre l'intestin moyen, le lieu de la digestion sanguine, qui joue également un rôle d'organe de stockage, permettant la digestion progressive de son contenu sur plusieurs mois ou même années. Après la lyse des érythrocytes et autres cellules sanguines, ayant lieu dans la lumière de l'intestin moyen, l'hémoglobine libérée va être internalisée et digérée de façon intracellulaire par les cellules digestives présentes au niveau des cæcums. Les déchets du

repas sanguin, c'est-à-dire, les cellules digestives mortes ou mourantes, les résidus cellulaires, l'hématine, cristaux d'hémoglobines non digérés, fluides venants de la lumière de l'intestin moyen, sont évacués *via* l'intestin postérieur par l'anus (Sonenshine and Roe, 2014).

c. Le système excréteur

Ce système est constitué d'une paire de tubes de Malpighi, reliés au sac rectal. Ces tubes vont recueillir les déchets nitrogénés issus du catabolisme de la tique et circulant dans l'hémolymphe (McCoy and Boulanger, 2016). Ils y seront accumulés avant d'être transformés en cristaux de guanine qui seront ensuite sécrétés dans le sac rectal et évacués par l'anus.

d. Les glandes salivaires

Les tiques possèdent deux glandes salivaires, situées chacune d'un côté du corps dans la partie antérieure de l'idiosome. Ces glandes salivaires sont impliquées dans plusieurs processus biologiques indispensables à la survie des tiques. Elles sont constituées de grains, les acini, regroupés en grappes, et responsables de la production de divers fluides, circulant par des canaux reliant les acini entre eux et débouchant sur le canal préoral.

La sécrétion de ces fluides serait contrôlée par l'action des nerfs du synganglion (Šimo *et al.*, 2012). Chez les tiques dures, il existe quatre types d'acini (Sonenshine and Roe, 2014). Les acini de type I, sont responsables de la sécrétion d'une substance hygroscopique sur les pièces buccales de la tique, qui va lui permettre de capter la vapeur d'eau présente dans l'air ambiant, assurant ainsi son hydratation (Kahl and Knülle, 1988; Needham *et al.*, 1990). Les acini de type II assurent, quant à eux, la production de la salive, riche en substances pharmacologiquement actives et immunomodulatrices, indispensables au repas sanguin. En effet, lors du repas, la tique va alterner des cycles d'injection de salive puis d'aspiration du sang. Les propriétés cytosoliques, vasodilatatrices, anticoagulantes, anti-inflammatoires, et immunosuppressives de la salive (Kazimirova and Stibraniova, 2013) vont, d'une part, favoriser la création d'un micro-hématome au niveau du site de la piqûre, permettant l'aspiration du sang de l'hôte, et d'autre part, assurer la pérennité de ce processus notamment en protégeant la tique du système immunitaire de l'hôte. Par ailleurs, lors du repas sanguin, la tique est amenée à ingérer un volume de sang tel, qu'il lui est indispensable d'en excréter l'eau en excès. Ce processus appelé la transsudation postprandiale est assuré grâce aux acini de type III (Sonenshine and Roe, 2014). Les acini de type II et III, peuvent également être

impliquées dans la synthèse et la sécrétion du ciment, sorte de colle permettant de consolider l'ancrage des pièces buccales dans l'épiderme de l'hôte lors du repas sanguin (Sonenshine and Roe, 2014). Enfin, les acini de type IV, présents uniquement chez les mâles de la famille des Ixodidae, vont permettre la lubrification et le transfert du spermatophore à la femelle lors de l'accouplement (Sonenshine and Roe, 2014).

e. Le système nerveux

Le système nerveux des tiques se compose du synganglion (ou ganglion cérébroïde) (**Figure 8**), qui entoure l'œsophage et est relié aux différents organes de la tique *via* un réseau de nerfs périphériques. De même, les organes sensoriels de la tique (l'organe de Haller et les soies sur l'ensemble du corps ou sur les palpes), qui sont chacun composés d'une ou plusieurs cellules neuronales dans l'épiderme, permettent de capter l'information du milieu extérieur (Sonenshine and Roe, 2014). Le synganglion produit également des neuropeptides (Šimo *et al.*, 2009) qui pourraient être impliqués dans le contrôle de l'ensemble des fonctions vitales des tiques (McCoy and Boulanger, 2016).

Figure 8: Photographie du ganglion cérébroïde de la tique dure *Rhipicephalus appendiculatus*.
Figure adaptée de Šimo et al. (2009).

f. Le système respiratoire

Le système respiratoire est composé d'un très grand nombre de trachées formant une arborescence au sein de l'hémocoèle (visibles sur la **Figure 8**), permettant les échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone. Chez les adultes et les nymphes, ces trachées s'ouvrent sur deux stigmates (ou spiracles) situés en position latéro-ventrale sous la 4^{ème} paire de pattes. Outre son rôle dans l'échange de gaz, le système trachéal sert aussi de tissu connectif entre

les différents organes, participant ainsi à leur maintien en place. Chez les larves, qui sont dépourvues de système respiratoire, l'échange de gaz se fait directement *via* la cuticule (Sonenshine and Roe, 2014).

g. Le système reproducteur

Mises à part quelques rares exceptions, la reproduction sexuée est obligatoire chez les tiques. Chez les femelles du genre *Ixodes*, le système reproducteur est constitué d'un ovaire unique (en forme de chapelet disposé en U), d'une paire d'oviductes, d'un utérus et d'un vagin, qui va également servir de spermathèque. En dehors de la zone génitale, ce système comprend également l'organe de Géné, situé entre la bordure antérieure du scutum et la bordure postérieure de la base du capitulum (**Figure 9**). Lors de la ponte, cet organe va former des protrusions (« doigts »), qui vont permettre d'attraper les œufs, et les enrober d'une substance protectrice qu'il sécrète (Sonenshine and Roe, 2014; McCoy and Boulanger, 2016).

Figure 9: Les étapes de l'oviposition chez une femelle Ixodidae.

A : Flexion du capitulum pour réceptionner un œuf ; B: Eversion de l'organe de Géné associé à la protrusion du vagin à travers l'orifice vaginal; C: Capture de l'œuf par les doigts de l'appareil de Géné; D: Passage de l'œuf au-dessus du capitulum. *Figure adaptée de Sonenshine (1991).*

Chez les mâles, le système reproducteur est constitué de deux testicules tubulaires ainsi que de canaux déférents qui vont fusionner pour former le réceptacle séminal et le canal éjaculateur s'ouvrant au niveau du pore génital. La substance permettant la formation du

spermatophore qui va contenir les spermatozoïdes, est produite par une glande dorsale, accessoire au canal éjaculateur. Après avoir provoqué l'ouverture du gonopore de la femelle à l'aide de ses pièces buccales, le mâle y déposera le spermatophore. C'est dans les voies génitales de la femelle que sera finalisée la maturation des spermatozoïdes (McCoy and Boulanger, 2016).

Chez *I. ricinus*, et plus généralement chez les Ixodidae, il était communément admis que les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois, contrairement aux mâles. Cependant, plusieurs études, ont permis de démontrer une paternité multiple au sein de pontes d'Ixodidae (dont *I. ricinus* - Hasle *et al.*, 2008), remettant ainsi en cause le nombre de copulation par femelles (McCoy and Tirard, 2002; Hasle *et al.*, 2008; Cutullé *et al.*, 2009; Ruiz-López *et al.*, 2012).

3. Cycle de vie, comportement et environnement

Le cycle de vie des tiques est divisé en deux grandes phases de vie qui s'alternent : 1) la phase libre, pendant laquelle ont lieu les étapes de métamorphose, d'incubation des œufs et de ponte ; 2) la phase parasitaire, pendant laquelle elles effectuent leur repas sanguin sur l'hôte. *I. ricinus* est une tique exophile, c'est-à-dire évoluant dans l'environnement extérieur au cours de la phase libre, par opposition aux tiques endophiles, qui évoluent au sein d'environnements abrités à proximité de leurs hôtes comme les nids et terriers. *I. ricinus* passe la majorité de sa vie en phase libre à la recherche d'un hôte. Étant particulièrement sensible à la dessiccation, elle évolue idéalement dans un environnement humide (> 80% d'humidité relative) dont les températures sont à peu près comprises entre 5 et 25°C. Cela dit, il est important de noter que ces seuils de températures d'activité peuvent varier en fonction des sous populations d'*I. ricinus* séparées géographiquement (Gilbert *et al.*, 2014). De même, selon les régions, elle va présenter une activité saisonnière qui peut être bimodale (deux pics d'activité généralement au printemps et en automne) ou unimodale (un pic d'activité au printemps). Les adultes et les nymphes sont principalement actifs au printemps et à l'automne, tandis que les larves sont principalement retrouvées au début de l'été (Estrada-Peña *et al.*, 2018a). L'activité d'*I. ricinus* est influencée par différents facteurs abiotiques tels que la température, l'humidité, l'ensoleillement ou encore la photopériode qui jouent un rôle clé dans sa survie. De ce fait, elle est très peu active en été et en hiver. Durant cette dernière

saison, elle peut notamment entrer en diapause, réduisant ainsi son métabolisme à un niveau minimal (Gray *et al.*, 2016).

Le cycle de vie d'*I. ricinus*, représenté sur la **Figure 10**, est triphasique, c'est-à-dire qui implique trois hôtes différents entre chaque stase (McCoy and Boulanger, 2016). Pour trouver ses hôtes, la tique va se positionner au sommet de la végétation au sol, et tendre sa première paire de pattes, sur lesquelles se trouve l'organe de Haller lui permettant de capter le passage d'un hôte et ainsi de s'agripper à lui. Ce mode de chasse, dit « à l'affût » (**Figure 11**), représente un risque accru de déshydratation pour la tique, qui va devoir effectuer des voyages fréquents entre la surface de la végétation et le sol pour se réhydrater. Au cours de leur cycle de vie, les tiques vont être de moins en moins sensibles à la dessiccation. En effet, les adultes vont présenter des capacités de stockage de l'eau plus importantes du fait de leur plus grande taille ainsi que de leur plus faible ratio surface/volume. De plus, leurs réserves énergétiques sont plus importantes que celles des stases inférieures, ce qui semble contribuer à leur survie (Herrmann and Gern, 2010). Elles vont donc être capables de se positionner de plus en plus haut sur la végétation pour chasser, ce qui va d'ailleurs influencer sur le spectre d'hôtes accessible en fonction de la stase (Mejlon and Jaenson, 1997). En effet, *I. ricinus* est télotrope, c'est-à-dire qu'elle est capable d'infester un large spectre d'hôtes (plus de 300 espèces différentes, dont l'Homme). Elle aura toutefois un hôte préférentiel en fonction de sa stase de développement. Les larves vont en effet principalement se nourrir sur de petits mammifères, oiseaux et lézards, leur repas sanguin durant 2 à 3 jours. Les nymphes se nourrissent sur des mammifères plus gros avec un repas qui durera 5 à 6 jours. Une fois leur repas terminé, ces deux stases vont se décrocher de l'hôte et retourner en phase libre dans l'environnement, où elles pourront effectuer la métamorphose vers la stase suivante. Chez les femelles, le gorgement dure 8 à 10 jours et se prend principalement sur des grands mammifères (ongulés). Ce dernier repas sanguin s'effectue après ou en même temps que l'accouplement avec les mâles qui n'effectuent pas de repas sanguin. Chez les tiques dures, l'étape de gorgement est divisée en deux phases, une lente, au cours de laquelle la tique grossit peu, et une rapide pendant laquelle elle peut atteindre jusqu'à 100 fois son poids initial dans le cas des tiques dures (Sonenshine and Roe, 2014). Chez les femelles, l'initiation de cette phase rapide, et donc *in fine*, la complétion du repas sanguin, ne sera permise que si la fécondation a eu lieu. Une fois gorgées à réplétion et fécondées, les femelles vont se laisser tomber dans l'environnement où elles pourront pondre 2000 à 3000 œufs (=oviposition),

après quoi elles mourront. Les larves issues de l'éclosion des œufs pourront alors recommencer un nouveau cycle (McCoy and Boulanger, 2016). La complétion de ce cycle de vie dure 2 à 3 ans dans la nature. Le taux de survie moyen du début à la fin de ce cycle est de 0,1% : à partir de 2000 œufs, survivraient 100 larves puis 10 nymphes et enfin un mâle et une femelle (Randolph, 1998).

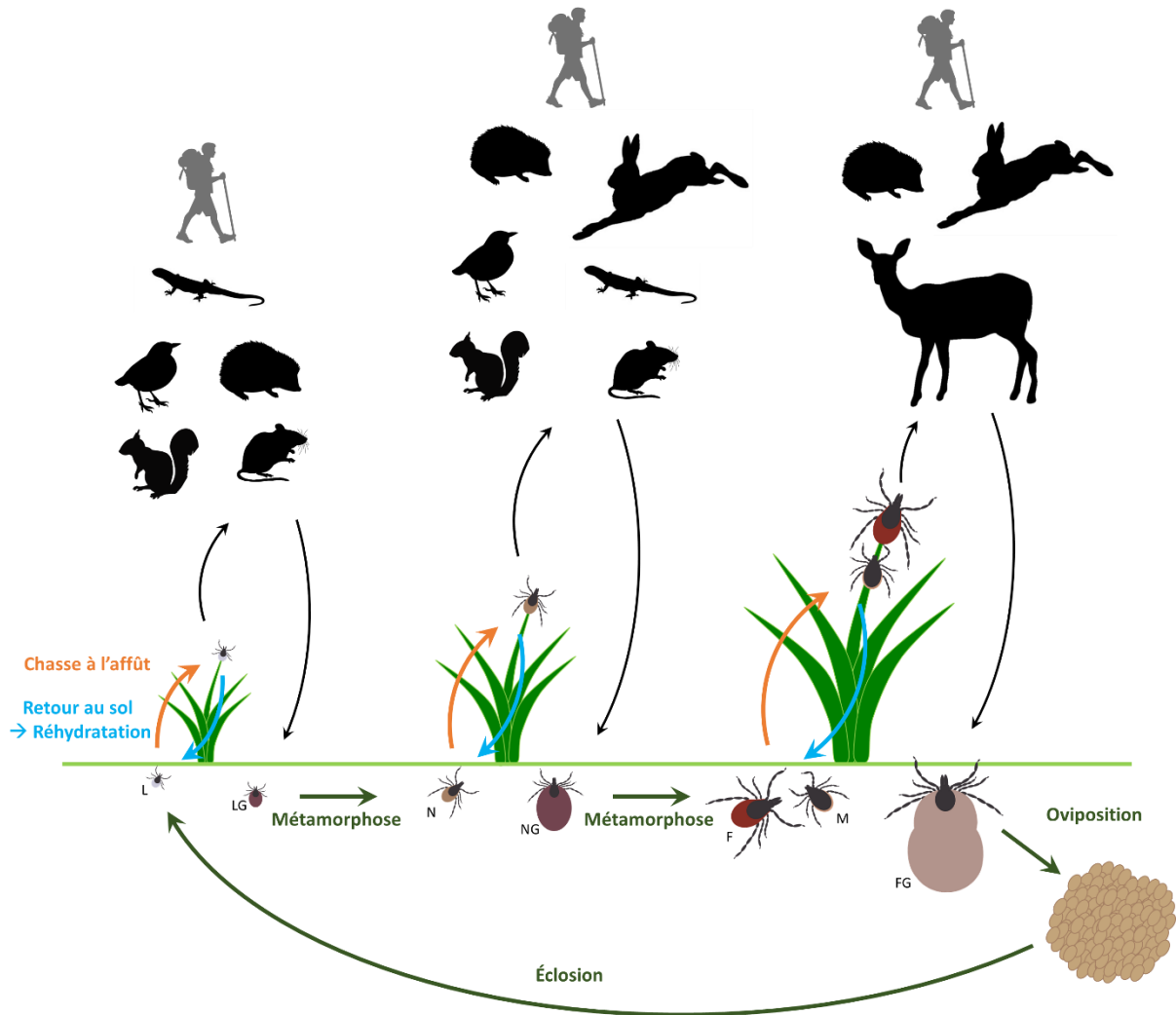


Figure 10: Cycle de vie de la tique *Ixodes ricinus*.

L = Larve ; LG = Larve gorgée ; N = Nympe ; NG = Nympe gorgée ; F = Femelle ; M = Mâle.



Figure 11: Photo d'une tique *Ixodes ricinus* à l'affût, prise en forêt de Sénart.
Prise par Philippe Garot, Agence Phanie.

4. Importance en santé humaine et animale

A. Les impacts directs et indirects

Les tiques sont des parasites qui vont possiblement impacter la santé de leur hôte à la fois de façon directe (i.e. du simple fait de leur piqûre) ou indirecte (i.e. transmission d'agents pathogènes). Parmi les effets directs de la piqûre de tique, on compte : la spoliation sanguine (principalement observée chez les tiques tropicales prenant un repas sanguin supérieur à 2mL), qui peut conduire à l'anémie, voire à la mort de l'animal en cas d'infestation par un grand nombre de tiques (Gauthier-Clerc *et al.*, 1998); les blessures cutanées provoquées par le mécanisme de piqûre (dilacération de la peau, insertion des pièces buccales et création du micro-hématome) auxquelles pourront potentiellement s'ajouter des surinfections cutanées (McCoy and Boulanger, 2016); des paralysies dues à la présence d'une toxine dans la salive de tique, principalement observées chez les animaux et rarement chez l'Homme, leur propagation dans l'ensemble du corps peut conduire au décès par arrêt respiratoire (Edlow and McGillicuddy, 2008); enfin la piqûre de tique peut également provoquer des réactions allergiques pouvant conduire au choc anaphylactique (Hilger *et al.*, 2005; Kleine-Tebbe *et al.*, 2006) ainsi que des allergies croisées à la viande rouge et à certains anticorps utilisés en médecine humaine, dues à la reconnaissance d'un sucre présent dans le tube digestif de la tique (Commins and Platts-Mills, 2013; Hamsten *et al.*, 2013a). Les effets indirects des tiques sur la santé humaine ou animale sont ceux qui découlent de la transmission d'agents pathogènes par les tiques. En effet, du fait de leur mode de vie hématophages, les tiques vont pouvoir ingérer, lors des repas sanguins, des agents pathogènes circulant chez leurs hôtes ou transmis directement par une tique partageant la même poche de sang (phénomène de co-repas; Randolph, 2011; States *et al.*, 2017). De plus, certains agents pathogènes pourront également être acquis verticalement, par transmission de la femelle infectée aux larves. Lors de leur repas sanguin, les tiques infectées pourront alors potentiellement transmettre ces agents pathogènes à leur nouvel hôte. L'injection concomitante des agents pathogènes et des substances immunosuppressives contenues dans la salive va faciliter leur transmission de la tique à l'hôte ainsi que leur dissémination dans l'hôte vertébré. Ainsi, les tiques assurent un rôle de vecteurs actifs, permettant la circulation et la retransmission de nombreux agents pathogènes (Randolph, 2009). En santé humaine, elles sont d'ailleurs les vecteurs qui en transmettent la plus grande diversité et représentent les deuxièmes vecteurs d'agents

pathogènes à l'échelle mondiale, après le moustique (de la Fuente *et al.*, 2008; Piesman and Eisen, 2008).

En ce qui concerne *I. ricinus*, il semblerait qu'elle puisse être impliquée dans des cas d'allergies (Hamsten *et al.*, 2013a, 2013b), mais elle va surtout avoir un impact indirect sur la santé humaine et vétérinaire. En effet, son large spectre d'hôtes lui offre la possibilité d'entrer en contact avec une grande variété d'agents pathogènes (bactéries, protozoaires et virus) lors de son repas sanguin. Sa large répartition géographique, sa forte densité et sa grande affinité pour l'homme font d'*I. ricinus* le vecteur d'agents pathogènes le plus important en Europe (Léger *et al.*, 2013). En effet, *I. ricinus* est vectrice d'une large variété d'agents pathogènes, responsables d'une dizaine de maladies en Europe, décrits ci-dessous.

B. Les agents pathogènes vectorisés par *I. ricinus*

a. *Borrelia burgdorferi* s.l.

Le complexe *Borrelia burgdorferi* s.l. est constitué d'une vingtaine d'espèces, parmi lesquelles on compte les agents de la Borréliose de Lyme. Cette maladie cause un syndrome inflammatoire multi-systémique due à la réponse immunitaire à l'encontre des *B. burgdorferi* s.l. transmises lors de la piqûre par les tiques du genre *Ixodes*, dont *I. ricinus*. D'un point de vue clinique, on peut observer trois formes successives : 1) la forme localisée précoce dans les 3 à 30 jours suivant la piqûre, qui se caractérise par l'apparition d'une inflammation cutanée ronde à ovale dont la taille va grossir (= érythème migrant) ; 2) la forme disséminée précoce dans les 6 mois après la piqûre, qui peut être caractérisée par des signes cliniques généraux (myalgie, fatigue, fièvre...) ou par d'autres signes cliniques (rhumatologiques, neurologiques, dermatologiques, etc.) ; 3) la forme disséminée tardive plus de 6 mois après la piqûre (acrodermatite chronique atrophiante, atteintes neurologiques tardives...) (HAS, 2018).

En Europe, cinq espèces du complexe *B. burgdorferi* s.l. sont actuellement reconnues comme responsables de cette maladie : *Borrelia burgdorferi* s.s., *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia bavariensis*. Les deux espèces les plus souvent recensées dans les cas de Borrélioses sont *B. garinii* et *B. afzelii* (Ruzić-Sabljić *et al.*, 2002; Strle and Stanek, 2009). Bien que ces espèces soient toutes susceptibles de provoquer un érythème migrant, elles vont souvent être associées à des manifestations cliniques particulières. Ainsi,

B. burgdorferi s.s. sera plus souvent associée à des cas d'arthrite ou de neuroborréliose ; *B. garinii* à des cas de neuroborréliose et *B. afzelii* à des manifestations cutanées tardives (Strle and Stanek, 2009; Rizzoli *et al.*, 2011). Par ailleurs, trois autres espèces, *Borrelia bissettii*, *Borrelia lusitaniae* et *Borrelia valaisiana*, ont été occasionnellement détectées chez des patients, mais leur pathogénicité n'est pas avérée (Collares-Pereira *et al.*, 2004; Diza *et al.*, 2004; Da Franca *et al.*, 2005; Rudenko *et al.*, 2008).

Les *Borrelia* peuvent circuler chez de nombreux hôtes vertébrés (rongeurs, lagomorphes, insectivores, oiseaux, reptiles...) communément présents dans nos régions et qui constituent des réservoirs pour ces bactéries. Chaque espèce de *Borrelia* va cependant présenter une certaine spécificité d'hôte. La réponse immunitaire innée de ce dernier, mise en place *via* la voie du complément, semble jouer un rôle important dans cette spécificité (Kurtenbach *et al.*, 1998). Par ailleurs, il existe également des hôtes totalement incompétents, comme c'est le cas des cervidés (Jaenson and Tälleklint, 1992). Ils jouent néanmoins un rôle dans l'écologie de cette maladie, puisqu'ils permettent le renouvellement de la population de tiques en nourrissant les femelles adultes. De plus, ils pourraient également permettre la circulation des *Borrelia* d'une tique à l'autre en cas de phénomènes de co-repas, mais cette hypothèse est controversée (Voordouw, 2015).

Au cours de la piqûre, les *Borrelia* pourront être transmises de la tique infectée à l'hôte par l'intermédiaire de la salive. En effet, chez la tique infectée, les *Borrelia* sont connues pour être initialement fixées aux cellules intestinales par l'intermédiaire d'une protéine de surface. La stimulation par le repas sanguin va engendrer un changement d'expression de ces protéines de surface, qui va permettre la libération des *Borrelia* et leur migration vers les glandes salivaires (Schwan and Piesman, 2000; Piesman and Schneider, 2002), ce qui engendrerait ainsi un délai entre le début de la piqûre et la transmission des *Borrelia* à l'hôte. En effet, il est communément admis que le risque de transmission est faible pendant les premières 24 heures et augmente avec le temps au fur et à mesure que le gorgement progresse (Meiners *et al.*, 2006). Ce délai variant en fonction de l'espèce concernée. Cependant, une étude récente a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs espèces du groupe *B. burgdorferi* s.l. dans les glandes salivaires de femelles adultes non gorgées ainsi que leur transmission moins de 12 heures après la fixation des tiques sur des souris (Sertour *et al.*, 2018).

En Europe, la prévalence de ces bactéries chez les tiques *I. ricinus* à l'affût échantillonnées au cours de plusieurs études réalisées de 2010 à 2016, est d'environ 12% (Strnad *et al.*, 2017). Bien que plusieurs études par le passé aient suspecté l'existence d'une transmission verticale de ces bactéries chez la tique *I. ricinus*, basée sur la détection de ces spirochètes chez des larves par de nombreuses études (Hubálek and Halouzka, 1998), ces conclusions sont aujourd'hui discutées. En effet, il semblerait que ces résultats soient en fait dus à la détection non spécifique d'une espèce n'appartenant pas au complexe *B. burgdorferi* s.l. et qui était encore inconnue à l'époque de la plupart de ces études : *Borrelia miyamotoi* (Rollend *et al.*, 2013). Néanmoins, une étude récente a permis de détecter, chez 0.62% des larves d'*I. ricinus* échantillonnées dans l'environnement, la présence de l'espèce *B. afzelii* (van Duijvendijk *et al.*, 2016). Outre la transmission verticale, une autre hypothèse expliquant cette détection pourrait être l'interruption d'un premier repas sanguin chez ces larves, qui auraient été infectées par leur premier hôte avant de se remettre en chasse à l'affût pour finir leur repas sanguin (Piesman, 1991).

b. *Borrelia miyamotoi*

La bactérie *Borrelia miyamotoi* appartient au groupe de *Borrelia* dît : « relapsing fever » (en opposition au groupe « Lyme Borreliosis », constitué du complexe *B. burgdorferi* s.l.). Ce groupe de bactéries, est responsable de fièvres récurrentes, dont les signes cliniques (peu spécifiques), vont être : une fièvre élevée, des frissons, des courbatures, des céphalées et de l'asthénie. En absence de traitement, des récurrences peuvent être observées jusqu'à 10 ou 15 fois (HAS, 2018). Les *Borrelia* appartenant à ce groupe sont majoritairement transmises par des tiques molles, mais certaines espèces peuvent être transmises par le pou de corps (*Pediculus humanus*) ou encore par des tiques dures, comme c'est le cas de *B. miyamotoi*. Cette espèce circule en Asie, en Europe et en Amérique du nord, chez les tiques du genre *Ixodes* (Fukunaga *et al.*, 1995; Scoles *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2003; Fomenko *et al.*, 2010). En Europe, sa prévalence chez la tique *I. ricinus* oscillerait de 0 à 3% (Krause *et al.*, 2015; Moutailler *et al.*, 2016; Raileanu *et al.*, 2017).

Isolée pour la première fois chez *Ixodes persulcatus* en 1995 (Fukunaga *et al.*, 1995), il faudra attendre une quinzaine d'années avant qu'elle soit considérée comme un agent pathogène, lors de sa détection chez plusieurs patients russes (Platonov *et al.*, 2011). Depuis,

elle a été associée à plusieurs cas cliniques, en Europe, en Asie et aux États-Unis (Hovius *et al.*, 2007; Chowdri *et al.*, 2013; Gugliotta *et al.*, 2013; Krause *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2014).

Plusieurs études menées aux États-Unis, en Europe et au Japon, ont permis de mettre en évidence la présence de ces bactéries chez plusieurs espèces de rongeurs qui pourraient leur servir de réservoirs (Barbour *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2012; Cosson *et al.*, 2014). En effet, la compétence de deux espèces, *Myodes glareolus* et *Apodemus flavicollis*, dans la transmission de *B. miyamotoi* à des tiques non infectées a été démontrée expérimentalement (Burri *et al.*, 2014). Par ailleurs, des tiques infectées ont également été prélevées sur des oiseaux circulant aux États-Unis et en Europe (Hamer *et al.*, 2012; Lommano *et al.*, 2014).

L'étude de cette bactérie chez le vecteur américain *Ixodes scapularis* a permis de mettre en évidence sa transmission de la tique infectée à l'hôte en moins de 24 heures de gorgement (Breuner *et al.*, 2017). Mais ce délai pourrait être plus court étant donnée sa détection, par cette même étude, dans les glandes salivaires de tiques non gorgées. Pour d'autres spirochètes du groupe des fièvres récurrentes circulant chez les tiques molles, telle que *Borrelia turicatae*, un délai de transmission de l'ordre de quelques secondes a même été rapporté (Boyle *et al.*, 2014). Il semble que *B. miyamotoi* puisse être également transmise de façon verticale à la descendance de la tique *I. scapularis* (Scoles *et al.*, 2001). Chez *I. ricinus*, un tel mécanisme n'a pas été mis en évidence, cependant, comme déjà discuté dans le paragraphe précédent, il se pourrait que les suspicions de transmission verticale concernant les bactéries du complexe *B. burgdorferi* s.l., soient dues à la détection non spécifique de *B. miyamotoi* (Rollend *et al.*, 2013).

c. *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum est une bactérie intracellulaire, qui peut être transmise par plusieurs tiques du genre *Ixodes*, dont *Ixodes ricinus* (Dugat *et al.*, 2015). Elle est responsable d'Anaplasmoses granulocytaires chez l'homme et plusieurs espèces d'animaux domestiques, tels que les chiens, les chats, les chevaux, et les ruminants (Woldehiwet, 2006; Bakken and Dumler, 2008; Little, 2010; Dzięciel *et al.*, 2013; Lagrée *et al.*, 2018). Chez l'Homme, bien que cette infection puisse, dans de rares cas, être fatale, elle va communément générer des symptômes modérés qui vont être variables et non spécifiques tels que de la fièvre, des frissons, des maux de tête, des myalgies et des malaises (Bakken and Dumler, 2008). Les cas humains de cette maladie ont été déclarés en Europe, en Asie ainsi qu'en

Amérique du nord, où ils sont plus fréquents et souvent plus sérieux (Dugat *et al.*, 2015). À l'inverse, les cas d'anaplasmose chez les ruminants n'ont été décrits qu'en Europe où cette maladie est responsable de fortes pertes économiques. En effet, chez ces derniers, l'infection va engendrer l'apparition de symptômes tels que fièvre, anorexie, apathie, diminution de la production de lait, avortements (Woldehiwet, 2006; Stuen *et al.*, 2013). Par ailleurs, cette infection va également engendrer une baisse des défenses du système immunitaire ouvrant ainsi la voie aux infections secondaires, communément observées en cas d'infection par *A. phagocytophilum* (Woldehiwet, 2006).

Le cycle de cette bactérie est complexe et encore mal compris. En effet, cette espèce est sous-divisée en plusieurs écotypes, qui semblent être engagés dans différents cycles épidémiologiques pouvant impliquer différents hôtes et vecteurs (Stuen *et al.*, 2013; Dugat *et al.*, 2015). En Europe, l'espèce *A. phagocytophilum* a été détectée chez une grande variété d'hôtes, notamment chez les ruminants sauvages et plus particulièrement le chevreuil et le cerf élaphe qui sont très fréquemment porteurs de cette bactérie (Stuen *et al.*, 2013). Cependant, d'après plusieurs études, ces animaux ne constituent pas les réservoirs des variants impliqués dans les cas d'anaplasmose chez l'homme (Chastagner *et al.*, 2014; Dugat *et al.*, 2014; Huhn *et al.*, 2014; Jahfari *et al.*, 2014; Jouglin *et al.*, 2017). Les variants humains semblent plutôt circuler chez le hérisson et le sanglier (Silaghi *et al.*, 2012; Huhn *et al.*, 2014), mais il semblerait que leur système immunitaire élimine rapidement l'infection (Galindo *et al.*, 2012; Silaghi *et al.*, 2012). Ainsi les hôtes réservoirs permettant la circulation des variants humains en Europe ne sont pas encore clairement identifiés.

En ce qui concerne son mécanisme d'acquisition/transmission, lors du repas sur hôte infecté, *A. phagocytophilum* va d'abord infecter les cellules du tube digestif des tiques, puis va pouvoir coloniser les glandes salivaires dans les 24 heures, grâce notamment à la protéine Salp16 (démonstré chez *I. scapularis*; Sukumaran *et al.*, 2006). De là, elle pourra être retransmise à un hôte sensible lors du prochain repas sanguin. Chez *I. scapularis*, la transmission de la tique infectée à l'hôte sensible peut se faire en moins de 24 heures (des Vignes *et al.*, 2001). Par ailleurs, la transmission de cette bactérie par transfusion sanguine pourrait être également possible (Jereb *et al.*, 2012).

d. *Neoehrlichia mikurensis*

Neoehrlichia mikurensis est une bactérie intracellulaire obligatoire appartenant à la famille des Anaplasmataceae. Considérée comme Candidatus depuis la description de cette espèce et sa dénomination en 2004 (Kawahara *et al.*, 2004), elle a récemment été mise en culture pour la première fois (Wass *et al.*, 2019).

Bien que détectée chez les tiques *I. ricinus* depuis 1999 (Schouls *et al.*, 1999) et décrite depuis 2004, il faudra attendre 2010 pour qu'elle soit associée, pour la première fois, à un cas clinique chez un patient immunodéprimé en Allemagne (Loewenich *et al.*, 2010). Depuis, plusieurs cas de neoehrlichiose ont été rapportés dans la littérature, à la fois en Europe et en Asie (Li *et al.*, 2012; Silaghi *et al.*, 2016). Principalement observée chez des patients immunodéficients en Europe, la responsabilité de cette bactérie dans l'apparition de signes cliniques chez des patients immunocompétents a également été décrite chez un patient en Allemagne (Loewenich *et al.*, 2010) et plusieurs en Chine (Li *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'ADN de cette bactérie a également été détectée, en Pologne, chez des individus immunocompétents ne présentant aucun symptôme (Welc-Falęciak *et al.*, 2014). D'un point de vue clinique, cette maladie cause un syndrome inflammatoire systémique chez les patients atteints. Les patients immunodéprimés présentent une fièvre élevée, accompagnée de frissons et sueurs nocturnes, des douleurs musculaires ou articulaires localisées, ainsi que des thromboembolies (Grankvist *et al.*, 2014). Parmi les cas de patients immunocompétents décrits par Li *et al.* (2012), tous manifestaient de la fièvre, des maux de tête, et malaise, et beaucoup présentaient des nausées, vomissements, myalgies et des raideurs à la nuque. Par ailleurs, il semble que cette bactérie puisse également être responsable de neoehrlichiose chez le chien, mais cette pathologie a été peu décrite jusqu'ici (Diniz *et al.*, 2011; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2016).

N. mikurensis a été fréquemment détectée chez plusieurs espèces de tiques appartenant au genre *Ixodes*, et plus particulièrement chez des individus de l'espèce *I. ricinus*, échantillonnés dans l'environnement dans une vingtaine de pays Européens (Silaghi *et al.*, 2016; Obiegala and Silaghi, 2018). Elle est également détectée chez les rongeurs, plus particulièrement *Myodes glareolus*, mais aussi chez plusieurs espèces d'*Apodemus* ou de *Microtus*, qui constituent ses réservoirs dans l'environnement. En effet, la compétence de plusieurs espèces de rongeurs (*Myodes glareolus*, *Apodemus sylvaticus* et *Apodemus flavicollis*) dans la transmission à des tiques non infectées a été démontrée

expérimentalement (Burri *et al.*, 2014). De plus, la transmission transplacentaire de cette bactérie a également été observée chez plusieurs espèces de rongeurs (*Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis* et *Microtus arvalis*) (Obiegala *et al.*, 2014).

Bien que le mode de transmission de cette bactérie semble se faire *via* la piqûre de tique, tous les patients affectés n'en n'avaient pas constaté. Ainsi l'éventualité d'une transmission par d'autres voies, y-compris la transfusion sanguine, comme déjà observée chez d'autres Anaplasmatocae (Jereb *et al.*, 2012; Regan *et al.*, 2013), ne doit pas être négligée.

e. *Rickettsia helvetica* et *Rickettsia monacensis*

Les bactéries du genre *Rickettsia* sont des bactéries intracellulaires obligatoires pouvant être vectorisées par des tiques, des puces, des poux ou encore des acariens selon les espèces. En Europe, la plupart des rickettsioses sont dues à des *Rickettsia* transmises par les tiques. Les espèces *Rickettsia helvetica* et *Rickettsia monacensis* ont été fréquemment détectées dans plusieurs pays d'Europe chez *I. ricinus* (Oteo and Portillo, 2012). Plusieurs cas cliniques associés à la présence de *R. monacensis*, et présentant des symptômes ressemblant à ceux de la fièvre boutonneuse, ont été rapportées en Espagne, en Italie et en Croatie (Oteo and Portillo, 2012). De plus cette bactérie a été récemment détectée en France, pour la première fois, chez des tiques *I. ricinus* à l'affût (Akl *et al.*, 2019). *R. helvetica*, quant à elle, est connue pour circuler chez les tiques *I. ricinus* (Parola *et al.*, 1998). Par ailleurs, elle a été incriminée dans plusieurs cas humains en France, mais aussi en Suisse, en Italie, et en Suède, présentant des tableaux cliniques variables d'un cas à l'autre : syndrome pseudogrippal accompagné ou non d'éruption cutanée, méningite ou même atteintes cardiaque entraînant le décès de 2 personnes (Oteo and Portillo, 2012).

L'ADN de ces bactéries a été détecté chez plusieurs vertébrés (Tomassone *et al.*, 2018). En effet, la présence de l'ADN de *R. helvetica* a déjà été rapportée chez le chevreuil, le sanglier, le hérisson, plusieurs espèces de passereaux, de lézards, de rongeurs, et chez le chien. Celle de *R. monacensis* a, quant à elle, été détectée chez une espèce de lézard et chez le chien. Cependant, la persistance de l'infection et leur capacité de transmission par la tique ont rarement été testées dans ces études, ne permettant pas l'identification de réservoirs vertébrés pour ces bactéries. En revanche, la transmission verticale de *R. helvetica* chez la tique *I. ricinus* (Burgdorfer *et al.*, 1979) ainsi que la stabilité des prévalences observées chez les tiques au cours des années et la similarité des taux d'infections entre larves, nymphes et

adultes (Sprong *et al.*, 2009), sont des arguments permettant d'identifier cette tique comme un hôte réservoir de *R. helvetica*.

f. *Bartonella henselae*

Les bactéries du genre *Bartonella* sont des bactéries intracellulaires facultatives, circulant chez de nombreux mammifères, pouvant générer des maladies chez l'Homme et l'animal de compagnie. L'implication d'arthropodes hématophages dans leur transmission est reconnue pour quelques espèces, notamment pour *Bartonella henselae*, agent responsable chez l'Homme de la maladie des griffes du chat. Cette bactérie circule chez le chat, son hôte réservoir, communément asymptomatique, dont la contamination s'effectue *via* les fèces de la puce *Ctenocephalides felis* (Chomel *et al.*, 1996). Chez l'Homme, la transmission de l'agent pathogène se fait plutôt par morsure ou griffure de chat infesté, et va communément engendrer, l'apparition d'une papule érythémateuse accompagnée d'une lymphadénopathie. Des atteintes oculaires, hépatiques, spléniques et neurologiques peuvent également se manifester (Anderson and Neuman, 1997).

La détection de cet agent chez des tiques à l'affût et les soupçons d'implication dans plusieurs cas cliniques de patients exposés à des tiques ont conduit la communauté scientifique à s'interroger sur le rôle des tiques en tant que potentiels vecteurs de cet agent (Angelakis *et al.*, 2010a; Telford and Wormser, 2010). Bien que la compétence vectorielle de la tique *I. ricinus* ait été démontrée *in vitro via* un système de gorgement artificiel (Cotté *et al.*, 2008), aucune démonstration n'a été faite *in vivo* jusqu'ici pour cet agent. En revanche, la transmission de *Bartonella birtlesii*, circulant chez les rongeurs, par la tique *I. ricinus* a été observée *in vivo*, permettant ainsi de démontrer sa compétence dans la transmission de *Bartonella* (Reis *et al.*, 2011). De plus, des cas de patients atteints de Bartonellose à *B. henselae*, et rapportant une piqûre de tique ont été décrits plusieurs fois dans la littérature (Angelakis *et al.*, 2010b; Maggi *et al.*, 2013; Vayssier-Taussat *et al.*, 2016). Cependant, d'autres sources d'infections étaient souvent possibles. Ainsi, l'importance des tiques en tant que vecteurs dans l'épidémiologie des bartonelloses n'est pas encore complètement établie.

g. *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii est une bactérie intracellulaire, capable de produire des pseudospores qui lui confèrent une résistance lui permettant de survivre dans l'environnement où elle est

largement répandue. Elle est d'ailleurs fréquemment retrouvée dans le sol (Kersh *et al.*, 2010), et sa présence a été détectée chez une grande variété d'espèces animales et plus particulièrement chez les ruminants qui l'excrètent en grande quantité lors de la mise bas (Roest *et al.*, 2013).

Chez l'Homme, la présence de cette bactérie est asymptomatique dans la plupart des cas (60%). Néanmoins, elle peut être responsable de Fièvre Q dites aiguës, dont les manifestations cliniques sont généralement modérées, mais des cas sérieux peuvent présenter fièvre, maux de tête, frissons, pneumonie et hépatite atypiques. Par ailleurs, des formes chroniques, plus sévères, engendrant : fatigue, fièvre, perte de poids, sueurs nocturnes, hépatosplénomégalie et endocardites, sont également possibles et peuvent même être fatales (Roest *et al.*, 2013).

La voie principale de contamination se fait *via* l'inhalation d'aérosols ou poussières infectées, mais il existe plusieurs autres voies de contamination possibles (Angelakis and Raoult, 2010). Les piqûres de tiques, dont la compétence pour *C. burnetii* a été démontrée chez plusieurs espèces en laboratoire, sont notamment suspectées (Duron *et al.*, 2015). De plus, *C. burnetii*, qui génère une infection systémique chez les tiques, a également été détectée dans leurs fèces. Ainsi, outre la piqûre, la contamination pourrait se faire *via* l'inhalation des excréments de tiques (Duron *et al.*, 2015). Cependant leur importance dans l'épidémiologie de cette maladie est controversée. En effet, bien que de rares cas de maladies humaines aient été rapportés chez des patients ayant été piqués par une tique, les autres voies d'infections, notamment orale, ne pouvaient être exclues (Duron *et al.*, 2015).

h. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis est une bactérie intracellulaire facultative, responsable de la tularémie. Elle est principalement rencontrée dans l'hémisphère nord et circule chez de nombreux mammifères terrestres et aquatiques (principalement lagomorphes et rongeurs) (Ellis *et al.*, 2002). Deux sous-espèces, *F. tularensis tularensis* et *F. tularensis holarctica*, sont responsables de la plupart des cas humains sur les continents américain et eurasien respectivement. Le taux de létalité associé à la tularémie est de 5% pour la sous-espèce *tularensis* et de 0.5% pour *holarctica*. Très répandue dans l'environnement, *F. tularensis* peut être transmise à l'Homme par contact direct avec un animal infecté, ingestion d'aliment ou d'eau contaminé(e), inhalation d'aérosols infectieux ou encore par piqûre d'arthropodes

(Maurin and Gyuranecz, 2016). Elle a d'ailleurs été détectée chez *I. ricinus* (Franke *et al.*, 2010; Gyuranecz *et al.*, 2010; Gehringer *et al.*, 2013) et une étude slovaque a permis de montrer sa transmission trans-stadiale chez cette tique (Výrosteková, 1994). En France, environ 20% des cas semblent être dus à une piqûre de tique (<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-transmissibles-de-l-animal-a-l-homme/tularemie/documents/rapport-synthese/bilan-de-10-annees-de-surveillance-de-la-tularemie-chez-l-homme-en-france>), mais en Suisse, ce chiffre grimpe à 33% (Wittwer *et al.*, 2018).

Chez l'Homme, cette maladie se caractérise d'abord par l'apparition d'une fièvre élevée, accompagnée de frissons, fatigue, myalgie et de maux de tête. Elle va ensuite évoluer en différentes formes qui dépendent en général du mode de contamination. Les plus fréquentes sont les formes ulcéro-ganglionnaire et ganglionnaire, mais on observe aussi des formes oculo-ganglionnaire, oropharyngée, pulmonaire et typhoïde (Tärnvik and Chu, 2007). En cas d'infection par piqûre de tique, la forme ulcéro-ganglionnaire, caractérisée par l'apparition d'un ulcère au niveau du site de piqûre, est la plus répandue (Petersen *et al.*, 2009).

i. *Babesia divergens*, *Babesia venatorum* et *Babesia microti*

Outre des bactéries, *I. ricinus* peut également transmettre, à l'Homme ainsi qu'aux animaux domestiques, des protozoaires du genre *Babesia*, infectant les érythrocytes de leurs hôtes. Chez l'Homme, selon l'espèce impliquée et le statut immunitaire de la personne infectée, les babésioses peuvent être asymptomatiques ou être responsables de cas de maladies légères à graves, pouvant conduire au décès du patient. Provoquant des symptômes similaires à ceux de la malaria (frissons, fièvre, myalgie, anémie, fatigue, sueurs nocturnes), ces maladies peuvent parfois être confondues, ce qui pourrait entraîner leur sous diagnostic. Principalement inoculées par les tiques du genre *Ixodes*, les protozoaires du genre *Babesia* peuvent également être transmis par transfusion sanguine (Yabsley and Shock, 2013).

Chez les tiques, après ingestion des érythrocytes infectés, ces protozoaires établissent rapidement une infection systémique, et vont notamment infecter les glandes salivaires et les ovaires des femelles. Les *Babesia* sont transmises verticalement, et par la suite, d'un stade à l'autre. Dans les glandes salivaires, l'initiation du repas sanguin est nécessaire pour permettre

la différenciation des protozoaires en sporozoïtes qui seront transmis à l'hôte (Chauvin *et al.*, 2009).

En Europe, *Babesia divergens* est l'espèce qui représente la cause principale de babesiose humaine. Les cas observés sont généralement sévères, surtout chez les individus ayant subi une splénectomie (Yabsley and Shock, 2013). Vectorisée par la tique *I. ricinus*, chez qui elle peut être transmise verticalement (transmission transovarienne) (Bonnet *et al.*, 2007a), ce protozoaire est également responsable de babésioses chez les bovins. Chez ces animaux, la babesiose peut entraîner une fièvre légère ainsi que de l'anorexie qui évolue souvent vers le rétablissement spontané de l'animal. Selon les individus, elle peut aussi avoir des conséquences plus sévères, engendrant : fièvre élevée, anémie, anorexie, dépression, arrêt de la rumination, augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire, et pouvant conduire à la mort de l'animal (Zintl *et al.*, 2003).

I. ricinus est également capable de vectoriser l'espèce *Babesia venatorum*, qu'elle peut acquérir par transmission verticale, ou bien en se nourrissant sur le chevreuil, qui semble constituer son hôte réservoir (Bonnet *et al.*, 2007b, 2009). En Europe, cinq cas humains de babesiose, dus à ce protozoaire, ont été répertoriés dans la littérature chez des individus immuno-déficients et présentant des symptômes légers à modérément sévères (Yabsley and Shock, 2013; Bläckberg *et al.*, 2018).

L'espèce *Babesia microti* (principale cause de Babésiose aux États-Unis), a été détectée dans plusieurs pays d'Europe chez des tiques *I. ricinus* à l'affût (Skotarczak *et al.*, 2002; Wielinga *et al.*, 2008; Lempereur *et al.*, 2010; Reye *et al.*, 2010, 2013; Sytykiewicz *et al.*, 2012; Coipan *et al.*, 2013b; Blaňarová *et al.*, 2016). Les capacités d'acquisition et de transmission de cet agent pathogène par *I. ricinus* ont été observées chez des rongeurs (hôtes réservoirs de cette espèce) en laboratoire (Gray *et al.*, 2002). Cela dit, l'implication de *B. microti* n'a été établie que dans un seul cas de babesiose chez un patient immunodéficient en Allemagne, qui semble avoir contracté l'infection par transfusion sanguine (Hildebrandt *et al.*, 2007). L'implication de *B. microti* est également fortement suspectée dans deux autres cas cliniques, chez des individus immunocompétents, dont un qui mentionnait une piqûre de tique (Meer-Scherrer *et al.*, 2004; Arsuaga *et al.*, 2016), mais la présence du protozoaire dans les érythrocytes des patients n'a pas été identifiée.

j. Le virus de l'encéphalite à tiques et le louping ill

Le virus de l'encéphalite à tiques (Tick-borne encephalitis virus, TBEV), est un *Flavivirus* de la famille des Flaviviridae. Il circule principalement chez les petits mammifères tels que les rongeurs et insectivores qui constituent des hôtes compétents permettant sa transmission aux tiques qui sont ses principaux vecteurs. Il existe trois sous-types de TBEV : les variants « Sibérien » et « Extrême oriental » retrouvés chez *I. persulcatus*, ainsi que le variant « Européen », qui circule communément chez *I. ricinus*. Entre 2012 et 2016, 12 500 cas d'encéphalite à tiques ont été déclarés au centre européen de prévention des maladies (ECDC) par 25 pays d'Europe, dont la majorité en République tchèque, Lituanie, Allemagne, Suède et Pologne (Beauté *et al.*, 2018).

Chez l'Homme, cette maladie est généralement divisée en deux phases. La première, qui correspond à la phase de virémie, se caractérise par l'apparition de fièvre et d'un état pseudo-grippal. Après quelques jours d'amélioration, une seconde phase peut apparaître, correspondant à l'atteinte du système nerveux central et provoquant une méningoencéphalite, qui peut être fatale. Selon les variants, le taux de létalité varie : 1% pour le variant Européen, 7 à 8% pour le variant Sibérien et 20 à 40% pour le variant extrême oriental (Hubálek and Rudolf, 2012). TBEV peut également se développer chez les animaux d'élevage, tels que les chèvres, moutons et vaches, généralement asymptomatiques, qui vont l'excréter dans le lait (Cisak *et al.*, 2010). Ainsi la consommation de produits laitiers non pasteurisés peut également constituer une voie de contamination par ce virus (Balogh *et al.*, 2010; Caini *et al.*, 2012; Hudopisk *et al.*, 2013).

Le virus du Louping ill peut également être responsable de cas d'encéphalites. *Flavivirus* très proche du variant TBEV Européen, ce virus circule principalement en Grande Bretagne et peut également être transmis par la tique *I. ricinus* ou bien *via* des produits laitiers contaminés (Hubálek and Rudolf, 2012).

C. Les co-infections

Comme illustré dans la partie ci-dessus, *I. ricinus* peut être responsable de la transmission d'un grand nombre d'agents pathogènes. Les caractéristiques du cycle de vie de cette tique, plus particulièrement : 1) La réalisation de multiples repas sanguins ; 2) sur une grande diversité d'hôtes, potentiellement porteurs de différents agents pathogènes (Nieto and Foley, 2008; Buffet *et al.*, 2012; Welc-Falęciak *et al.*, 2013) ; 3) souvent à proximité d'autres tiques, favorisant ainsi l'échange d'agents pathogènes par co-repas ; 4) ainsi que la transmission verticale de certains agents de la femelle aux larves, vont favoriser la survenue de co-infections chez ces tiques. En effet, la présence de co-infections chez *I. ricinus* a déjà été rapportée de nombreuses fois dans la littérature (Halos *et al.*, 2005; Schicht *et al.*, 2011; Andersson *et al.*, 2013; Coipan *et al.*, 2013a; Herrmann *et al.*, 2013a; Cosson *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2015; Moutailler *et al.*, 2016; Raileanu *et al.*, 2017). Le criblage d'un grand nombre d'agents pathogènes par Moutailler *et al.* (2016) a d'ailleurs permis de mettre en évidence chez cette espèce, la présence de co-infections chez environ 20% des tiques adultes échantillonnées dans les Ardennes, et impliquant jusqu'à cinq agents pathogènes différents. Une association fréquemment observée chez ces tiques dans la littérature est celle qui uni les bactéries *B. garinii* et *B. valaisiana* (Rauter and Hartung, 2005; Gassner *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2013a; Lommano *et al.*, 2014), qui partagent le même hôte réservoir (Hanincova *et al.*, 2003).

La présence de ces co-infections chez les tiques implique ainsi leur potentielle co-transmission lors de la piqûre. En effet, des cas de co-infections chez l'Homme (pouvant également être dus à de multiples événements de piqûre), ont été rapportés plusieurs fois dans la littérature (Krause *et al.*, 1996; Tijssse-Klasen *et al.*, 2013; Moniuszko *et al.*, 2014; Diuk-Wasser *et al.*, 2016; Jahfari *et al.*, 2016). En Europe, plusieurs cas de co-infections à *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp. et *Babesia* spp. ont été observés chez des patients qui présentaient une Encéphalite à tique (Moniuszko *et al.*, 2014). Aux Pays-Bas, une étude a permis de montrer, chez une cohorte d'environ 300 patients présentant un érythème migrant, une probabilité de co-infection à un autre agent pathogène circulant chez les tiques (*A. phagocytophilum*, *N. mikurensis*, *B. divergens* ou *B. miyamotoi*) de 2,7% (Jahfari *et al.*, 2016). Dans ces deux études, aucune différence significative dans le tableau clinique n'a été observée par rapport à des infections uniques. Néanmoins, les co-infections, et plus particulièrement celles concernant des cas de Borréliose de Lyme couplées à des cas de Babésiose ou d'Anaplasmosse

(principalement observées aux États-Unis), peuvent avoir un impact sur la durée et la sévérité des maladies (Krause *et al.*, 1996; Diuk-Wasser *et al.*, 2016).

En conclusion de cette partie, il apparaît évident qu'*I. ricinus* est un vecteur d'agent pathogènes qui revêt une importance capitale en termes de santé publique et animale. Du fait de cette importance, les agents pathogènes qu'elle héberge et la relation tique/agents pathogènes ont donc été vastement étudiés depuis des années. Jusqu'à il y a peu, seule cette interaction bipartite avait été considérée pour mieux appréhender les maladies à tiques. Or, les tiques sont également porteuses d'autres micro-organismes commensaux et symbiotiques, qui, avec les agents pathogènes, constituent leur microbiote. Ces micro-organismes vivent en interactions les uns avec les autres et peuvent donc être amenés à établir des relations qui peuvent être positives, négatives ou neutres, et *in fine*, influencer sur l'acquisition et la transmission des agents pathogènes. Ainsi la nécessité de considérer l'agent pathogène au sein de l'ensemble de son environnement biotique et abiotique, constitué, entre autre, des autres membres du microbiote des tiques, a récemment été mis en avant avec le concept de pathobiome (Vayssier-Taussat *et al.*, 2015).

III. Concept de Pathobiome et importance de l'étude du microbiote des tiques

1. Le pathobiome

Ryan *et al.* (2013), avait initialement proposé la définition de Pathobiome pour décrire le microbiote intestinal de patients constamment multi-infectés par plusieurs enteropathogènes, mais présentant un tableau clinique alternant entre des phases asymptomatiques et de maladie, l'amenant ainsi à s'interroger sur l'élément déclencheur intervenant dans le passage d'une phase à l'autre. Cette définition a ensuite été étendue par Vayssier-Taussat *et al.* (2014), comme un concept visant à considérer l'agent pathogène en tenant compte de l'ensemble des facteurs biotiques, et plus particulièrement des micro-organismes, en interaction avec ce dernier et pouvant ainsi influencer l'établissement de maladies ou leur dissémination.

L'exemple type, permettant de mettre en avant l'importance de ce concept dans le contexte des maladies vectorisées, est celui de la bactérie *Wolbachia* chez le moustique. Très

représentée chez les insectes (retrouvée chez au moins 1/3 des espèces d'arthropodes; Duron *et al.*, 2008; Zug and Hammerstein, 2012), il a été démontré que la présence de cette bactérie endosymbiotique, chez plusieurs espèces de moustiques, permettait de bloquer l'installation de plusieurs arbovirus (virus de la Dengue, du Zika, du Chikungunya) et même de protozoaires tels que *Plasmodium galinaceum* (Moreira *et al.*, 2009; Mousson *et al.*, 2012; Dutra *et al.*, 2016). Outre le blocage de l'installation de ces protozoaires, cette bactérie est capable de se répandre efficacement dans la population d'hôte vecteurs. En effet, non seulement elle est transmise verticalement par les femelles infectées à l'ensemble de leur descendance, que le mâle soit infecté ou non, mais en plus de cela, elle manipule la reproduction de ses hôtes par incompatibilité cytoplasmique, de sorte que les mâles infectés ne puissent se reproduire efficacement qu'avec des femelles infectées, assurant ainsi sa diffusion au sein de l'ensemble de la population de vecteurs (Sinkins, 2004). Cette découverte a permis la mise en place, depuis une dizaine d'année, de méthodes de lutttes innovantes contre plusieurs agents pathogènes transmis par les moustiques, basées sur la libération dans l'environnement de colonies de moustiques porteurs de cette bactérie (World mosquito program : <http://www.eliminatedengue.com/program>). Cet exemple souligne bien que l'agent pathogène n'est pas en interaction seul avec son vecteur, il se retrouve également en présence d'une multitude d'autres micro-organismes dont la présence pourrait influencer son installation et sa transmission, permettant ainsi de suggérer des méthodes de lutte innovantes contre les agents pathogènes vectorisés.

Dans le cas des agents pathogènes transmis par les tiques, plusieurs types de relations ont déjà été observées entre certains agents pathogènes et le reste des communautés microbiennes de tiques. Ces relations peuvent être de nature antagoniste comme il semble, en effet, que ce soit le cas en présence d'endosymbiotes du genre *Rickettsia*. Notamment dans le cas de la transmission transovarienne, plusieurs études en laboratoire ont permis de montrer que la présence initiale d'un endosymbiote du genre *Rickettsia* chez une tique, semblait empêcher la transmission transovarienne d'une autre espèce de *Rickettsia*, pathogène ou non (Burgdorfer *et al.*, 1981; Burgdorfer, 1988; Macaluso *et al.*, 2002; Telford, 2009). De plus, une co-occurrence négative entre un endosymbiote *Rickettsia* et *B. burgdorferi* a été observée chez les tiques mâles *Ixodes scapularis* échantillonnées dans l'environnement (Steiner *et al.*, 2008). Chez les tiques *Dermacentor andersoni*, Gall *et al.* (2016) ont mis en évidence, en laboratoire, une corrélation négative entre la présence de l'endosymbiote

R. bellii et l'acquisition de l'agent pathogène *A. marginale*. Ainsi il semble que la présence de symbiotes du genre *Rickettsia* puisse affecter négativement la colonisation des tiques par plusieurs agents pathogènes appartenant à différents genres bactériens et pourrait ainsi jouer un rôle dans la prévalence de plusieurs agents pathogènes chez les populations de tiques (Bonnet *et al.*, 2017).

À l'inverse, les relations positives entre symbiotes et agents pathogènes peuvent également avoir lieu. Récemment, Budachetri *et al.* (2018), ont démontré chez la tique *Amblyomma maculatum*, que la présence de l'agent pathogène *Rickettsia parkeri* était positivement corrélée à celle de l'endosymbiote Candidatus *Mitochondria mitochondrii*. Outre les endosymbiotes, la présence des autres membres du microbiote peut également influencer sur le devenir de l'agent pathogène au sein de la tique. Notamment dans le cas de l'agent responsable de la maladie de Lyme : *B. burgdorferi*. Chez la tique *I. scapularis*, Narasimhan *et al.* (2014) ont démontré que la dysbiose du microbiote (par éclosion en conditions stériles ou suite à un traitement antibiotique) entraînait une diminution de l'expression d'une glycoprotéine composant la matrice péritrophique qui protège les cellules épithéliales du tube digestif. Cette altération de l'intégrité de la barrière épithéliale bloque la colonisation par *B. burgdorferi*, qui s'y réfugie en temps normal pour se protéger des composant toxiques présents dans la lumière de l'intestin. À l'inverse, chez cette même espèce de tique, la colonisation par *A. phagocytophilum*, va induire la production d'une glycoprotéine (IAFGP : *I. scapularis* Anti-Freeze GlycoProtein) qui va altérer le microbiote, et notamment la formation de biofilm, qui influence l'intégrité de la matrice péritrophique, ce qui va faciliter le passage de cette barrière par *A. phagocytophilum* (Abraham *et al.*, 2017).

Ainsi, dans le contexte des maladies à tiques, l'agent pathogène n'est pas uniquement en interaction avec son vecteur, il est associé/confronté à la présence d'une multitude de micro-organismes qui composent le microbiote des tiques et qui vont potentiellement pouvoir impacter son installation et sa transmission par le vecteur. Il est donc, de ce fait, capital d'étudier l'ensemble des membres de la communauté microbienne des tiques, comprenant les agents pathogènes ainsi que le reste du microbiote.

2. Les communautés microbiennes des tiques

L'avènement des technologies de séquençage haut débit il y a une quinzaine d'années a permis la mise en évidence de l'existence d'une grande variété de micro-organismes dans divers écosystèmes. Chez les tiques, l'utilisation de cette approche holistique, a été appliquée à l'étude du microbiote chez plusieurs genres de tiques, *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, et *Haemaphysalis* (Cabezas-Cruz *et al.*, 2018; Greay *et al.*, 2018), permettant ainsi d'identifier, en plus des agents pathogènes et des communautés symbiotiques, l'existence d'une multitude de micro-organismes commensaux.

Bien que plusieurs études rapportent l'existence de différences significatives dans la composition et la diversité de ce microbiote en fonction des genres, voire des espèces de tiques (Hawlana *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2014; Rynkiewicz *et al.*, 2015; Van Treuren *et al.*, 2015; Portillo *et al.*, 2019), plusieurs genres bactériens ont néanmoins été identifiés comme communs chez l'ensemble des genres de tiques testés jusqu'à présent, suggérant ainsi une importance particulière de ces genres bactériens dans la biologie de leurs hôtes. Parmi les plus répandus, on compte notamment *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* qui semblent correspondre à des bactéries de l'environnement dont le sol, ainsi que les genres *Rickettsia* et *Coxiella* (Cabezas-Cruz *et al.*, 2018), dont les espèces peuvent correspondre à la fois, à des symbiotes d'arthropodes ou des agents pathogènes transmis par ces derniers (Perlman Steve J *et al.*, 2006; Duron *et al.*, 2015).

Dans le cas des symbiotes, il n'est pas surprenant que leur présence soit répandue au sein de plusieurs genres de tiques. En effet, la symbiose est un phénomène répandu au sein des arthropodes, et qui va influencer sur l'évolution des deux protagonistes (Moran *et al.*, 2008). Ces symbioses peuvent être obligatoires : le symbiote est communément localisé dans un organe en particulier et impliqué dans un processus indispensable à la survie de son hôte (souvent nutritionnel), chez qui il sera transmis verticalement à tous les individus de la population (Moran *et al.*, 2008). Mais elles peuvent aussi être facultatives : dans ce cas, bien que le symbiote puisse être transmis verticalement, il n'est pas retrouvé chez l'ensemble des individus de la population. Il peut être impliqué dans divers processus tels que la manipulation de la reproduction de l'hôte, la protection contre les ennemis naturels ou autres facteurs de mortalité, la tolérance à la chaleur et peut faciliter l'adaptation de l'hôte aux environnements changeants (Moran *et al.*, 2008; Duron *et al.*, 2017).

Chez les tiques, la présence de symbiotes est très répandue au sein des différents genres appartenant aux familles des Argasidae et des Ixodidae (Duron *et al.*, 2017). Une dizaine de genres bactériens, hébergeant des bactéries symbiotiques d'arthropodes, a déjà été identifiée : *Coxiella*, *Rickettsiella*, *Arsenophonus*, *Francisella*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Candidatus Midichloria*, *Lariksella*, *Spiroplasma* et *Cardinium* (Bonnet *et al.*, 2017; Duron *et al.*, 2017). Bien que la plupart semble correspondre à des symbiotes facultatifs dont le rôle n'a pas été encore clairement identifié chez les tiques, ce n'est pas le cas d'un endosymbiote appartenant au genre *Coxiella* (= *Coxiella*-like endosymbiont, *Coxiella*-LE). Cet endosymbiote a effectivement été identifié comme un endosymbiote obligatoire, dont l'absence affecte respectivement la reproduction et le développement chez les tiques *Amblyomma americanum* et *Rhipicephalus microplus* (Zhong *et al.*, 2007; Guizzo *et al.*, 2017). Principalement localisé au niveau des ovaires et des tubes de Malpighi, il est transmis verticalement et semble exercer un rôle nutritionnel chez les tiques (Klyachko *et al.*, 2007; Machado-Ferreira *et al.*, 2011; Lalar *et al.*, 2014; Guizzo *et al.*, 2017). En effet, plusieurs gènes nécessaires à la synthèse de vitamines B et de leur cofacteurs, déficitaires dans le régime nutritionnel de la tique, ont été détectées chez différents *Coxiella*-LE (Gottlieb *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015). Détecté chez plus de 60% des espèces testées (Argasidae et Ixodidae) par Duron *et al.* (2017), et montrant une parfaite correspondance dans sa phylogénie avec plusieurs des espèces du genre *Rhipicephalus* (co-diversification), ces auteurs suggèrent qu'il s'agit probablement d'une symbiose ancienne qui serait apparue tôt dans l'évolution des tiques. Mis à part *Coxiella*, l'étude du génome de plusieurs autres espèces de symbiotes (*Francisella*, *Ca. Midichloria* and *Rickettsia*) a également permis l'identification de gènes impliqués dans la synthèse de vitamines B (Hunter *et al.*, 2015; Gerhart *et al.*, 2016; Olivieri *et al.*, 2019). C'est notamment le cas de *Francisella* F-Om, dont le rôle dans la synthèse des vitamines B, chez la tique molle *Ornithodoros moubata*, a été clairement démontré par rétablissement du phénotype sauvage chez des tiques traitées sous antibiotiques et complémentées en vitamines B (Duron *et al.*, 2018). Chez la tique *A. maculatum*, il semble que son endosymbiote *Francisella* (= *Francisella*-Like Endosymbiont : *Francisella*-LE), récemment acquis, aurait pu remplacer un endosymbiote ancestral (*Coxiella*-LE ?) présentant des capacités métaboliques réduites pour la production d'éléments nutritifs par rapport au premier (Gerhart *et al.*, 2016). Ainsi l'établissement de relations symbiotiques semble être un

processus important dans l'acquisition de nutriments chez les tiques, que le régime alimentaire strictement hématophage ne peut pas entièrement satisfaire.

Étant donné leur importance dans la physiologie des tiques, ces micro-organismes vont donc être communément maintenus de façon verticale chez ces dernières, comme c'est aussi le cas de certains agents pathogènes (appartenant souvent aux mêmes genres bactériens que les espèces symbiotiques). La transmission verticale a d'ailleurs été suggérée comme la principale source d'acquisition de diversité microbienne des tiques *I. scapularis* (Zolnik *et al.*, 2016). Cependant, pour les autres membres du microbiote, il semble que d'autres voies de transmission soient également possibles.

En effet, Narasimhan *et al.* (2014) ont observé une diminution de la charge bactérienne et une altération de la composition du microbiote, associé notamment à un phénotype de gorgement accru, chez les larves d'*I. scapularis* écloses en conditions stériles par rapport à celles écloses en conditions « normales », émettant ainsi l'hypothèse d'une acquisition d'une part du microbiote par l'environnement, qui pourrait se faire *via* la bouche, les stigmates ou encore l'orifice anal (Narasimhan and Fikrig, 2015). L'observation, par plusieurs études chez différentes espèces de tiques, de différences de composition et/ou de diversité du microbiote en fonction de leur environnement ou localisation, pourrait soutenir cette hypothèse (Carpi *et al.*, 2011; Van Treuren *et al.*, 2015; Trout Fryxell and DeBruyn, 2016; Gurfield *et al.*, 2017; René-Martellet *et al.*, 2017; Estrada-Peña *et al.*, 2018b). Cela étant, dans les études de René-Martellet (2017) et de van Treuren (2015), il semble que les différences observées étaient principalement dues à des différences d'abondance de *Rickettsia* et *Coxiella* pour la première et de *Rickettsia* et Enterobacteriaceae pour la seconde, ce qui suggère, du moins pour les *Rickettsia* et *Coxiella*, une acquisition du microbiote *via* la voie verticale. Dans leur étude, Trout Fryxell et DeBruyn (2016), avaient quant à eux observé des différences de structure du microbiote de tiques *A. americanum*, qui étaient expliquées de façon significative, notamment par le type de sol se trouvant à l'endroit où ils avaient échantillonnées les tiques. Néanmoins, il convient de préciser, que la méthode de nettoyage utilisée dans cette étude ne permet pas d'exclure l'hypothèse que ces différences puissent correspondre à de la contamination cuticulaire (Binetruy *et al.*, 2019a). Outre l'environnement, la prise de repas sanguin est évidemment impliquée dans l'acquisition de micro-organismes, comme c'est le cas pour l'acquisition des agents pathogènes notamment. De plus, l'observation d'une augmentation de la diversité microbienne chez les tiques *A. americanum* et *I. scapularis* suite au repas

sanguin suggère que ce dernier pourrait également influencer la composition du reste du microbiote (Heise *et al.*, 2010; Narasimhan *et al.*, 2014). Cependant, il semble que de manière générale, le repas sanguin ait tout de même un rôle limité dans la transmission des membres du microbiote des hôtes à celui des tiques, dont l'étude des compositions, chez des tiques appartenant aux genres *Dermacentor* et *Ixodes*, a montré qu'elles étaient différentes de celui de leurs hôtes (Hawlana *et al.*, 2013; Rynkiewicz *et al.*, 2015). Pour autant, il semble tout de même que l'identité de l'hôte puisse influencer la composition de ce microbiote. Comme récemment démontré par Swei et Kwan (2017) ainsi que Landesman *et al.* (2019), des différences significatives en termes de diversité du microbiote de tiques du genre *Ixodes* peuvent être observées selon l'hôte sur lequel les tiques effectuent leur repas sanguin, variations qui pourraient notamment être dues aux protéines du complément présentes dans le sang de l'hôte (Swei and Kwan, 2017; Landesman *et al.*, 2019).

Outre le mode d'acquisition, d'autres variables biotiques et abiotiques peuvent également influencer sur le microbiote. En effet, des différences de composition et diversité microbienne en fonction de la stase ou bien du sexe de la tique, ont été observées dans plusieurs études (Lalzar *et al.*, 2012; Menchaca *et al.*, 2013; Van Treuren *et al.*, 2015; Zolnik *et al.*, 2016; Gurfield *et al.*, 2017; René-Martellet *et al.*, 2017; Swei and Kwan, 2017; Thapa *et al.*, 2019). Les femelles présentent généralement un microbiote moins diversifié que celui des mâles et des nymphes (Lalzar *et al.*, 2012; Van Treuren *et al.*, 2015; Zolnik *et al.*, 2016; Thapa *et al.*, 2019). Cette différence pourrait être due à la présence d'un symbiote en quantité abondante chez les premières (Van Treuren *et al.*, 2015; Thapa *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'étude du microbiote à l'échelle des organes a également permis de montrer des différences de composition et de diversité selon l'organe étudié, qui pourraient être due une spécialisation fonctionnelle des communautés microbiennes (Andreotti *et al.*, 2011; Budachetri *et al.*, 2014; Clayton *et al.*, 2015; Zolnik *et al.*, 2016). Enfin, il semble que ces communautés microbiennes puissent se structurer selon les saisons (Lalzar *et al.*, 2012). Une étude récente a d'ailleurs rapporté des différences de diversité du microbiote selon la température à laquelle les tiques, *I. scapularis*, étaient maintenues en laboratoire (Thapa *et al.*, 2019).

Notons toutefois que pour une majorité des études précédemment évoquées, des biais méthodologiques pourraient être à l'origine d'une surestimation de la diversité des

communautés microbiennes des tiques. En effet, Binetruy *et al.* (2019a) ont très récemment montré que les méthodes de stérilisation et de rinçage des tiques pouvaient potentiellement impacter l'identification du microbiote interne des tiques. Par ailleurs, alors que de plus en plus d'études suggèrent une influence importante des contaminants de kits dans l'identification du microbiote, notamment dans les échantillons de faible biomasse (Salter *et al.*, 2014; Glassing *et al.*, 2016), peu d'études mentionnent la réalisation de témoins négatifs et leur analyse qui permettraient d'identifier et d'éliminer ces potentiels contaminants.

3. Le microbiote d'*Ixodes ricinus*

Malgré sa large répartition géographique et son importance en santé publique et animale, peu d'études ont finalement tenté d'identifier l'ensemble du microbiote d'*I. ricinus* via des méthodes de séquençage haut débit (Carpi *et al.*, 2011; Nakao *et al.*, 2013; Vayssier-Taussat *et al.*, 2013; Gofton, Oskam, *et al.*, 2015; Estrada-Peña *et al.*, 2018b; Hernández-Jarguín *et al.*, 2018; Portillo *et al.*, 2019). Néanmoins, ces quelques études ont permis de détecter la présence de genres bactériens, associées à des bactéries symbiotiques et pathogènes connues pour circuler chez *I. ricinus*, mais également de détecter des bactéries commensales ou des bactéries associées au sol et à l'environnement (**Table 1**).

Outre l'identité des membres composant ce microbiote, leur diversité a également été étudiée. Portillo *et al.* (2019), alors qu'ils comparaient le microbiote de plusieurs espèces de tiques (*Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata* et *Ixodes ricinus*), ont d'ailleurs constaté que les tiques *I. ricinus* étaient celles qui présentaient la plus grande diversité microbienne. Par ailleurs, il semble que cette diversité soit plus variable entre des individus échantillonnés dans différentes régions qu'entre des individus appartenant à différentes stases (Carpi *et al.*, 2011). De plus, une analyse de réseau réalisée sur les communautés microbiennes de tiques *I. ricinus* à l'affût et de leurs principaux hôtes (campagnols), échantillonnés dans deux biotopes différents (forêt et bordures de forêt), suggérait que le microbiote des tiques ne serait que très peu lié à celui de son hôte et dépendrait plutôt du biotope des tiques (Estrada-Peña *et al.*, 2018b), soutenant ainsi les observations de Carpi *et al.* (2011).

L'étude des symbiotes chez *I. ricinus*, a permis de mettre en évidence la présence de sept genres bactériens symbiotiques : *Coxiella*, *Rickettsiella*, *Wolbachia*, *Rickettsia*,

Ca. *Midichloria*, *Spiroplasma* et *Arsenophonus* (Mediannikov *et al.*, 2012; Duron *et al.*, 2017). Néanmoins, il semble que la détection de deux d'entre eux, *Wolbachia* et *Arsenophonus*, soit due à la présence d'un hyménoptère parasite de tiques, *Ixodiphagus hookerii* (Plantard *et al.*, 2012; Bohacsova *et al.*, 2016). Parmi les cinq autres genres restants, l'un d'eux est très fréquemment détecté et à des prévalences élevées au sein des populations d'*I. ricinus*. Il s'agit du genre Ca. *Midichloria*, et plus particulièrement de l'espèce Ca. *Midichloria mitochondrii*, nommée et caractérisée en 2006 (Sassera *et al.*, 2006). Endosymbiote colonisant le cytoplasme des cellules et l'espace intermembranaire des mitochondries (Sacchi *et al.*, 2004), il est principalement détecté en quantité abondante chez les femelles ($\approx 100\%$ de la population), et est présent en plus faible quantité et à de plus faibles prévalences chez les mâles (moins de 50% de la population) (Lo *et al.*, 2006). Majoritairement détectée au niveau des ovaires chez les femelles, il est transmis verticalement et est retrouvé chez 100% des larves (Beninati *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 2006; Sassera *et al.*, 2006; Olivieri *et al.*, 2019). On observe cependant une diminution drastique de ce taux de transmission chez les colonies d'*I. ricinus* maintenues en laboratoire depuis plusieurs années (Lo *et al.*, 2006), suggérant un potentiel rôle de cet endosymbiote dans la résistance aux stress environnementaux. L'augmentation de sa détection lors du repas sanguin, ainsi que sa présence dans les tubes de Malpighi chez les tiques semi-gorgées, suggèrent un rôle nutritif (Sassera *et al.*, 2006; Olivieri *et al.*, 2019). De plus, l'étude du génome de Ca. *Midichloria mitochondrii*, a permis de mettre en évidence la présence de gènes impliqués dans : la synthèse de vitamines B, le métabolisme énergétique, la réponse au stress oxydant et la régulation de l'homéostasie ; soutenant ainsi l'hypothèse d'un rôle nutritif, mais suggérant aussi une implication de cet endosymbiote dans d'autres mécanismes qui sont : la détoxification et la régulation osmotique (Olivieri *et al.*, 2019).

Étude	Origines des tiques	Échantillon	Méthode de détection	Principaux genres et familles bactérien(ne)s détecté(e)s
Carpi <i>et al.</i> , 2011	Environnement, Italy	Adultes (individuels)	Métagénomique	Borrelia , Rickettsia , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Sorangium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Frankia</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Streptomyces</i> , Bartonella , <i>Brucella</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i>
		Adultes (individuels)	Métagénomique	Borrelia , <i>Pseudomonas</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> ,
		Adultes (groupés) - Nymphes (groupées)	Séquençage du gène de l'ARN 16s (V6)	Borrelia , Rickettsia , Wolbachia , Neoehrlichia , Rickettsiella , <i>Methylobacterium</i> , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Sorangium</i> , <i>Bdellovibrio</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i>
Nakao <i>et al.</i> , 2013	Environnement, Pays-Bas	Adultes femelles (groupées)	Métagénomique	Borrelia , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>U Gammaproteobacteria</i> , <i>Grimontia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Luteimonas</i> , <i>Vibrio</i> , Rickettsia , <i>Thiothrix</i> , <i>Actinobacillus</i> , Coxiella , <i>Enterococcus</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Colwellia</i> , Francisella , <i>Salmonella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Clostridium</i>
Vayssier-Taussat <i>et al.</i> , 2013	Environnement, France	Nymphes (groupées)	Méatranscriptomique	Anaplasma , Borrelia , Coxiella , Ehrlichia , Francisella , Rickettsia , Bartonella , Neoehrlichia (sélection des genres pathogènes par cette étude)
Gofton <i>et al.</i> , 2015	Environnement, Allemagne	Adultes femelles (individuelles) - Nymphes (individuelles)	Séquençage du gène de l'ARN 16s (V1-2)	Ca. Midichloria , Rickettsiella , Borrelia , <i>Paenibacillus</i> , Rickettsia , <i>Burkholderia</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Tsukamurella</i>
Hernández-Jargín <i>et al.</i> , 2018	Élevage, République Tchèque	Larves (tissus internes, groupés) - Adultes femelles (Glandes salivaires, groupés)	Méatranscriptomique	Borrelia , Ca. Midichloria , Ehrlichia , Anaplasma , Spiroplasma , Neoehrlichia , <i>Bradyrhizobium</i> , Rickettsiella , <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i>
			Métaprotéomique	<i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Escherishia</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Klebsiella</i>
Estrada-Peña <i>et al.</i> , 2018	Environnement, France	Adultes (individuels)	Séquençage du gène de l'ARN 16s (V4)	Ca. Midichloria , Rickettsia , Rickettsiella , <i>Stenotrophomonas</i> , Spiroplasma , Borrelia , <i>Williamsia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Curtobacterium</i>
Portillo <i>et al.</i> , 2019	Environnement, Espagne	Adultes (individuels) et Nymphes (groupées)	Séquençage du gène de l'ARN 16s (V3-V4)	Ca. Midicloriaceae (Ca. Midichloria), Rickettsiaceae (Rickettsia , Wolbachia), Sphingomonadaceae, Pseudomonadaceae, Oxalobacteriaceae (<u>Détail des genres principaux non disponible</u>)

Table 1: Microbiote d'*Ixodes ricinus*, identifié par technologie de séquençage haut débit.
Les genres symbiotiques et/ou pathogènes sont en caractères gras.

RAPPEL DES OBJECTIFS DE LA THÈSE

Lorsqu'ils se trouvent au sein de leurs hôtes vecteurs, les agents pathogènes transmis par les tiques se retrouvent intégrés à l'ensemble du microbiote des tiques, qui constitue un système dynamique dans l'espace et dans le temps, composé de communautés qui peuvent être pathogènes, symbiotiques et/ou commensales en interactions les unes avec les autres (pathobiome). Ces interactions peuvent avoir une influence sur le devenir de l'agent pathogène au sein des tiques et donc avoir un impact sur sa transmission. Toutefois, comme évoqué dans la partie précédente, peu d'informations existent actuellement sur le pathobiome d'*Ixodes ricinus* et sa dynamique.

Ainsi, l'objectif de ma thèse était de caractériser la dynamique du pathobiome d'*Ixodes ricinus* ; d'une part, en déterminant la dynamique des agents pathogènes ainsi que celle du microbiote à différentes échelles (temporelle et organes des tiques) et d'autre part, en identifiant les potentielles interactions entre les différents micro-organismes qui composent le microbiote de ces tiques.

Pour répondre à ces objectifs, des tiques *Ixodes ricinus* ont été échantillonnées dans une forêt suburbaine au sud de Paris, la forêt de Sénart. Dans le cadre des recherches menées sur les tiques à l'UMR BIPAR, cette forêt est un observatoire pour le suivi des tiques. Grâce à des collectes mensuelles réalisées pendant trois années consécutives (projet CCEID financé par le métaprogramme ACCAF, 2014-2018 et co-porté par Karine Chalvet-Monfray et Jean-François Cosson), plus de 1000 tiques y ont été échantillonnées mensuellement pendant trois ans et ont été utilisées pour réaliser l'étude temporelle du pathobiome d'*Ixodes ricinus*. Par ailleurs, 60 tiques adultes y ont également été échantillonnées lors d'une collecte ponctuelle pour réaliser l'étude du pathobiome à l'échelle des organes. La présence d'une trentaine d'agents pathogènes a été étudiée à ces deux échelles par la technique de PCR microfluidique et le microbiote a été étudié, uniquement à l'échelle temporelle, par séquençage du gène de l'ARN 16s (**Figure 12**). Des analyses de réseaux ont ensuite été réalisées afin d'identifier les potentielles interactions entre les différents micro-organismes composant le pathobiome d'*Ixodes ricinus*.

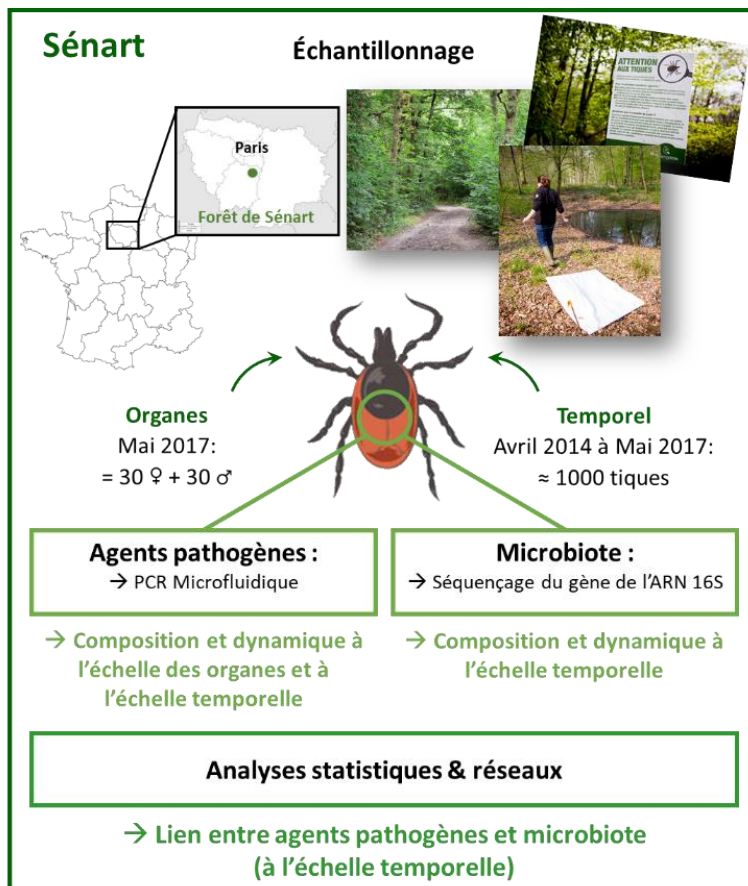


Figure 12: Plan d'étude.

Source photographies : *Philippe Garot, Agence Phanie.*

CHAPITRE I : Dynamique des agents pathogènes à différentes échelles

La plupart des études qui ont permis, et permettent toujours, la détection des agents pathogènes dans des tiques prélevées dans l'environnement sont réalisées sur des tiques échantillonnées à un moment t . Or, plusieurs études ont déjà permis de montrer que les prévalences de ces agents pathogènes étaient susceptibles de varier dans le temps (Gassner *et al.*, 2010; Coipan *et al.*, 2013a; Takken *et al.*, 2016; Chvostáč *et al.*, 2018; Little *et al.*, 2019). De plus, la plupart des études portant sur les tiques échantillonnées dans l'environnement analysent des tiques entières ou poolées, ne permettant pas d'avoir accès à l'information quant à la localisation des agents pathogènes dans les organes de tiques à l'affût. Ceci représente pourtant une information pertinente lorsque l'on s'intéresse à l'acquisition et à la transmission de ces agents.

Ainsi, les objectifs de cette première étude étaient d'identifier la dynamique des agents pathogènes circulant chez les tiques *Ixodes ricinus*, d'une part à l'échelle temporelle, et d'autre part à l'échelle de deux types d'organes de tiques.

Afin de tester simultanément une grande diversité d'agents pathogènes dans un nombre significatif d'échantillons, j'ai utilisé la méthode de PCR microfluidique, qui sera décrite en détail dans la première partie de ce chapitre.

Ce chapitre est donc divisé en trois parties. Une première partie exposera l'outil de détection utilisé, la PCR microfluidique, et son application au criblage des agents pathogènes chez les tiques. Les deux parties suivantes présenteront et discuteront les résultats des études réalisées d'une part à l'échelle temporelle et d'autre part à l'échelle des organes. Ces résultats font l'objet de deux articles, accepté dans le cas de l'étude temporelle des agents pathogènes (Lejal *et al.*, 2019a) et publié pour celui qui concerne l'étude des agents pathogènes à l'échelle des organes (Lejal *et al.*, 2019b).

I. Méthode de détection des agents pathogènes : La PCR microfluidique

1. Principe

La PCR microfluidique en temps réel (BiomarkTM dynamic array, Fluidigm) est une technique permettant l'analyse simultanée par PCR en temps réel de 48 à 96 échantillons pour 48 à 96 cibles différentes selon le modèle de puce utilisé, soit un total de 2304 (48.48) à 9216 (96.96) réactions de RT-PCR (Real Time PCR) en un seul essai. Outre, son avantage en termes de rendement, cette technique, n'utilisant qu'une faible quantité (volume de chargement = 5µL) de réactif et d'échantillon d'ADN, dont les quantités disponibles sont parfois limitées, présente également un avantage budgétaire et logistique.

Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'une puce microfluidique (**Figure 13**) divisée en trois parties principales : la zone de chargement des échantillons, la zone de chargement des réactifs (dont les couples d'amorces et sondes spécifiques de chaque espèce ou genre de micro-organismes testés) et la *flow cell*, composée de 2304 à 9216 chambres réactionnelles. L'utilisation d'un système de pression va permettre l'acheminement des échantillons et réactifs *via* un réseau de micro-canaux jusqu'aux chambres réactionnelles où chaque échantillon rencontrera indépendamment chaque réactif. La présence de valves, dont l'ouverture et la fermeture sont également commandées *via* un système de pression, permet d'éviter tout risque de reflux et de contamination entre les chambres réactionnelles. Une fois le chargement terminé, la PCR en temps réel a lieu au niveau de la *flow cell*, et l'apparition de la fluorescence associée est lue individuellement pour chaque chambre réactionnelle.

Figure 13: Présentation d'une puce microfluidique (Biomark™ dynamic array, Fluidigm).

S : Sample/Échantillon ; A : Assay/Réactifs. *Source illustration :*

https://www.msscience.com.au/upload/pages/flduadlmay2013/sa_ge_training-slides_standard-gene-expression_pl_170413.pdf

2. Le criblage haut débit des agents pathogènes circulant chez les tiques

Comme précédemment évoqué dans la partie synthèse bibliographique, les tiques sont porteuses d'une grande variété d'agents pathogènes, dont il est impératif de connaître les prévalences chez les populations de tiques, afin d'améliorer, entre autres, nos connaissances sur leur épidémiologie et ainsi progresser dans le contrôle des maladies à tiques. Cependant, la communauté scientifique qui travaille sur ces arthropodes se heurte à différentes contraintes. En effet, étant donnée la taille de ces arthropodes, et malgré l'optimisation des techniques d'extraction utilisées (Halos *et al.*, 2004; Crowder *et al.*, 2010; Ammazalorso *et al.*, 2015), la quantité d'ADN à disposition est souvent limitée. Cette contrainte va donc restreindre le nombre d'agents pathogènes qu'il est possible de tester par des techniques classiques de détection, qui nécessitent l'utilisation d'une grande quantité d'ADN. Ainsi, beaucoup d'études vont donc se focaliser sur l'étude de certains agents pathogènes, généralement les plus connus ou prévalents dans la zone d'étude, et vont négliger les autres agents potentiellement présents. Par ailleurs, l'étude des prévalences des agents pathogènes chez les tiques nécessite généralement l'analyse d'un grand nombre d'individus, ce qui est très chronophage et onéreux.

Il y a maintenant cinq ans, afin de pallier à toutes ces contraintes, notre équipe a adapté l'utilisation de la PCR microfluidique en temps réel, comme un outil de criblage à haut débit des agents pathogènes chez les tiques (Michelet *et al.*, 2014). Pour cela, les auteurs ont conçu des amorces et sondes spécifiques de différents genres et espèces d'agents pathogènes (bactérie, virus et protozoaires) circulant chez les tiques dans le monde entier (Michelet *et al.*, 2014; Gondard *et al.*, 2019). Après une étape de pré-amplification, la présence de ces agents peut alors être mise en évidence par l'amplification spécifique de leur ADN, détectée par la PCR microfluidique en temps réel. Bien qu'il s'agisse toujours d'une méthode avec *a priori*, cette technique permet d'élargir significativement l'éventail des agents pathogènes testés. Ainsi, outre les avantages qu'elle présente en termes de budget, de quantité d'ADN nécessaire et de temps gagné dans la réalisation des expériences, elle facilite également la mise en évidence des co-infections et permet la détection à la fois d'agents pathogènes attendus, rares ou inattendus chez les tiques testées (Cabezas-Cruz *et al.*, 2018). Dans le cadre des études que j'ai réalisées (temporelle et organes), une trentaine d'agents pathogènes (bactéries et protozoaires) a été testée.

II. Dynamique temporelle des agents pathogènes chez *Ixodes ricinus*

Cette étude a fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue *Parasites and Vectors* :

Lejal, E., Marsot, M., Chalvet-Monfray, K., Cosson, J. F., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M., & Pollet, T. A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest. *Parasites & Vectors* 12, 551 (2019) doi:10.1186/s13071-019-3799-7.

1. Présentation générale de l'étude et principaux résultats

A. Contexte de l'étude

Peu d'études établissant la dynamique des prévalences des agents pathogènes chez les tiques par échantillonnage régulier et sur une longue durée sont actuellement disponibles, laissant ainsi peu d'informations sur la potentielle variabilité saisonnière et interannuelle de ces prévalences. Plusieurs grandes questions se posaient donc : Un échantillonnage ponctuel est-il suffisant pour identifier les agents pathogènes chez les tiques ? La dynamique des agents pathogènes chez les tiques suit elle des schémas saisonniers ? Sont-ils redondants d'une année à l'autre ? L'objectif de cette première étude était d'apporter des réponses à ces questions en décrivant la dynamique temporelle des agents pathogènes chez des tiques *I. ricinus*.

B. Méthodes

Dans ce contexte, 998 nymphes *I. ricinus*, à l'affût, ont été collectées mensuellement pendant trois années consécutives (avril 2014 à mai 2017) en forêt de Sénart. Chacune d'entre elles a été analysée individuellement pour la présence d'une trentaine d'espèces pathogènes (bactéries et parasites) par PCR microfluidique en temps réel. Les variations saisonnières et annuelles des prévalences des agents pathogènes ont été étudiées à l'aide de modèles linéaires généralisés.

C. Résultats principaux et discussion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence d'agents pathogènes chez 15,9% des tiques, la plupart ayant déjà été détectée chez *I. ricinus* en forêt de Sénart lors d'études précédentes. L'espèce la plus prévalente était *Anaplasma phagocytophilum* (5,3%), suivie par *Rickettsia helvetica* (4,5%), les bactéries du groupe *Borrelia burgdorferi* s.l. (3,7%), *Borrelia miyamotoi* (1,2%) mais aussi des parasites tels que *Babesia venatorum* (1,5%). Outre ces agents, bien connus pour être transmis par *I. ricinus*, cette analyse a également permis de détecter chez une tique l'ADN d'un micro-organisme peu commun chez les tiques à l'affût, *Rickettsia felis*, communément vectorisée par la puce du chat, son principal vecteur (Angelakis *et al.*, 2016). Un échantillonnage ponctuel aurait probablement diminué la possibilité de détecter l'ensemble de ces pathogènes et notamment les plus rares comme *R. felis*.

La réalisation d'un modèle linéaire généralisé, a permis de mettre en évidence des variations significatives des prévalences de plusieurs agents pathogènes, selon les saisons (*R. helvetica*, *B. burgdorferi* s.l. and *B. miyamotoi*) et selon les années (*R. helvetica*, *B. burgdorferi* s.l., and *A. phagocytophilum*). Ces différences peuvent potentiellement être attribuées au spectre d'hôtes présent lors du gorgement des tiques, mais également aux capacités de résistance à certains stress abiotiques, dont le stress hydrique, qui semblent être conférées par certains agents pathogènes aux tiques. En tout état de cause, ces résultats permettent de montrer la nécessité de considérer la variabilité autour des prévalences établies chez des tiques échantillonnées à un temps *t*.

Notons enfin que 1,3% des tiques testées lors de cette étude présentaient des co-infections. L'analyse statistique de ces dernières a permis de montrer deux co-occurrences positives dans notre jeu de données (c.à.d. présentant un nombre de co-occurrence supérieur à ce qui aurait été observé par association aléatoire). Ces co-occurrences impliquaient les espèces *B. afzeli/B. garinii* et *B. garinii/B. spielmanii*. Déjà observées dans de précédentes études (Moutailler *et al.*, 2016; Raileanu *et al.*, 2017), ces co-infections détectées chez la stase nymphale n'ayant *a priori* effectué qu'un seul repas sanguin, peuvent paraître à première vue surprenantes, lorsque l'on sait que ces bactéries ont des hôtes majoritaires différents. Plusieurs hypothèses pourraient potentiellement expliquer ces résultats : 1) En cas de phénomène de co-repas, deux tiques adjacentes peuvent être amenées à échanger des agents pathogènes au niveau de la poche de sang, sans pour autant que l'hôte ne soit compétent pour l'agent pathogène concerné ; 2) Le toilettage de l'hôte, sa réponse immunitaire ou

encore son décès, pourrait interrompre le repas de la tique et l'amener à se nourrir sur plusieurs hôtes différents pour terminer son repas sanguin ; 3) Certains hôtes tels que le hérisson ou encore le *Tamias* de Sibérie, présents dans la zone d'échantillonnage, peuvent héberger plusieurs de ces bactéries ; 4) Notre étude ne permet pas de distinguer *B. garinii* de *B. bavariensis* (anciennement *B. garinii* sérotype 4 qui circule chez les rongeurs).

RESEARCH

Open Access



A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest

Emilie Lejal¹, Maud Marsot², Karine Chalvet-Monfray³, Jean-François Cosson¹, Sara Moutailler¹, Muriel Vayssier-Taussat⁴ and Thomas Pollet^{1*}

Abstract

Background: *Ixodes ricinus* is the predominant tick species in Europe and the primary pathogen vector for both humans and animals. These ticks are frequently involved in the transmission of *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*), the causative agents of Lyme borreliosis. While much more is known about *I. ricinus* tick-borne pathogen composition, information about temporal tick-borne pathogen patterns remain scarce. These data are crucial for predicting seasonal/annual patterns which could improve understanding and prevent tick-borne diseases.

Methods: We examined tick-borne pathogen (TBP) dynamics in *I. ricinus* collected monthly in a peri-urban forest over three consecutive years. In total, 998 nymphs were screened for 31 pathogenic species using high-throughput microfluidic real-time PCR.

Results: We detected DNA from *Anaplasma phagocytophilum* (5.3%), *Rickettsia helvetica* (4.5%), *Borrelia burgdorferi* (*s.l.*) (3.7%), *Borrelia miyamotoi* (1.2%), *Babesia venatorum* (1.5%) and *Rickettsia felis* (0.1%). Among all analysed ticks, 15.9% were infected by at least one of these microorganisms, and 1.3% were co-infected. Co-infections with *B. afzeli/B. garinii* and *B. garinii/B. spielmanii* were significantly over-represented. Moreover, significant variations in seasonal and/or inter-annual prevalence were observed for several pathogens (*R. helvetica*, *B. burgdorferi* (*s.l.*), *B. miyamotoi* and *A. phagocytophilum*).

Conclusions: Analysing TBP prevalence in monthly sampled tick over three years allowed us to assess seasonal and inter-annual fluctuations of the prevalence of TBPs known to circulate in the sampled area, but also to detect less common species. All these data emphasize that sporadic tick samplings are not sufficient to determine TBP prevalence and that regular monitoring is necessary.

Keywords: Tick-borne pathogens, Dynamics, Temporal patterns, Pathogen co-occurrences

Background

Ticks are obligatory hematophagous arthropods and consequently, are one of the most important pathogen vectors [1–3]. Lyme borreliosis (LB) is the most commonly reported tick-borne disease (TBD) in the northern hemisphere and is caused by bacteria belonging to the *Borrelia burgdorferi* (*s.l.*) complex. In western Europe, *Ixodes*

ricinus is known to be involved in the transmission of these bacteria to both humans and animals. This tick species has also been reported to be a vector for many other tick-borne pathogens (TBPs) with potentially significant consequences for human and animal health (*Anaplasma*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Babesia*, etc.) [4–9].

While multiple different pathogens have been identified and confirmed in *I. ricinus* ticks, very little is known about their seasonal and inter-annual variations. Time-series studies are thus crucial to understanding natural variability in microbial communities over time. Over the last decade, only a handful of surveys have assessed

*Correspondence: thomas.pollet@vet-alfort.fr

¹ UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, INRA, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France
Full list of author information is available at the end of the article



seasonal and monthly TBP variation patterns [10–14]. Although these results have heightened our general understanding of TBP dynamics, several of these studies were performed over short periods of less than two years, rendering it impossible to infer inter-annual discrepancies or to detect bias due to a particularly exceptional year. Only Coipan et al. [12] analysed several pathogenic genera in ticks sampled over more than two years. This study did demonstrate relationships between seasons and TBP prevalence (*Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Neohrlichia* and *Babesia*) in questing tick populations. These variations were mainly attributed to the varying availability of reservoir hosts.

Tick density is also heavily influenced by the presence of suitable hosts, most notably wild ungulates that sustain adults, thus enabling tick population renewal [15, 16]. However, it is important to emphasise that immediate tick survival and questing activities are highly dependent on suitable and specific environmental conditions (temperatures between 8–24 °C and humidity of up to 80%). Simultaneously, several studies have investigated whether pathogen presence influences tick behaviour. Herrmann & Gern [17, 18] suggested that *I. ricinus* infected with *B. burgdorferi* (*s.l.*) can tolerate increased levels of desiccation, and Neelakanta et al. [19] demonstrated that *I. scapularis* infected with *Anaplasma phagocytophilum* are more resistant to cold. The presence of these TBPs could therefore enhance survival or questing activities of the infected ticks under challenging abiotic conditions, suggesting the existence of a potential link between pathogen prevalence in questing ticks and seasons.

Tick density and TBP prevalence can thus be influenced by several variables, and can therefore potentially fluctuate both seasonally and annually. Studying these dynamics is essential to better understanding and anticipating TBP risk.

Peri-urban forests containing both TBP-reservoir hosts and ticks, and which are highly frequented by people and their pets, represent a particularly interesting area to study tick and TBP dynamics. The Sénart forest, located to the south of Paris, harbours many large ungulates and abundant and diverse populations of other TBP reservoir hosts (bank voles, wood mice, Siberian chipmunks, roe deer, hedgehogs, etc.), and accommodates more than three million visitors every year. This forest is therefore particularly adapted to studying ticks and tick-borne pathogen dynamics.

In this study, we assessed the seasonal and inter-annual variability of *I. ricinus*-borne pathogens in the Sénart forest over three consecutive years (from April 2014 to May 2017), and determined whether any significant associations existed between these pathogens. We investigated a total of 31 pathogenic species (bacteria and parasites),

belonging to 11 genera: *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neohrlichia* (only *N. mikurensis*), *Rickettsia*, *Bartonella*, *Francisella*, *Coxiella*, *Theileria*, *Babesia* and *Hepatozoon*.

Methods

Tick collection

Ixodes ricinus, nymphs and adults, were monthly collected during three years, from April 2014 to May 2017, in the Sénart forest in the south of Paris. Ticks were collected between 10:00 h and 12:00 h. Samplings were performed by dragging [20] on 10 transects of 10 square meters, localized on the parcel 96 (48°39'34.6"N, 2°29'13.0"E, Fig. 1). Dragging was always performed 3 consecutive times on each transect by the same persons to limit sampling bias. The presence of *Dermacentor* spp. was occasionally reported but no investigation has been led further. The presence of *I. ricinus* larvae was also sometimes noticed. Due to their small size making individual DNA extraction and analysis difficult, we chose to not collect them. After morphological identification, ticks were stored at –80 °C. In total 1167 ticks were collected.

Tick washing, crushing and DNA extraction

Ticks were first washed once in ethanol 70% for 5 min and rinsed twice in sterile MilliQ water for 5 min. Ticks were then individually crushed in 375 µl of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with decomplexed Foetal Calf Serum (10%) and six steel beads using the homogenizer Precellys®24 Dual (Bertin, Paris, France) at 5500× rpm for 20 s.

DNA extractions were then performed on 100 µl of tick crushing, using the DNA extraction kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Hoerd, Germany), and following the standard protocol for human or animal tissue and cultured cells, from the step 2. DNA extracts were eluted in 50 µl of elution buffer and stored at –20 °C until further use.

Two controls were performed: (i) the crushing control, corresponding to a DMEM tube in which crushing and DNA extraction were performed in the same conditions as on samples; and (ii) the extraction control, corresponding to the DNA extraction step without tick samples.

Tick-borne pathogens detection

A high-throughput screening of the most common bacterial and parasite species known to circulate in ticks in Europe was performed. This allowed us to target simultaneously 31 pathogenic species, 7 genera and 1 phylum: the genus *Borrelia* and 8 *Borrelia* spp. (*B. burgdorferi* (*s.s.*), *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii* and *B. miyamotoi*); the genus

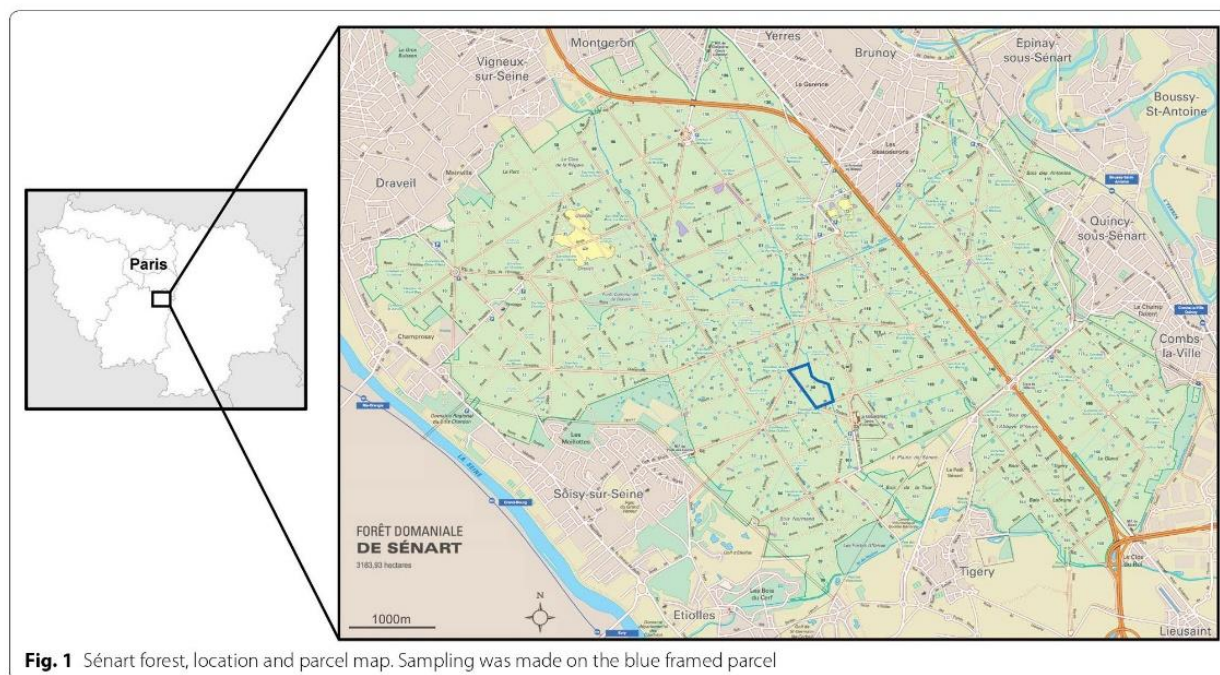


Fig. 1 Sénart forest, location and parcel map. Sampling was made on the blue framed parcel

Rickettsia and 6 *Rickettsia* spp. (*R. conorii*, *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. helvetica*, *R. aeschlimanii* and *R. felis*); the genus *Anaplasma* and 5 *Anaplasma* spp. (*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale* and *A. bovis*); the genus *Ehrlichia* and *E. canis*; *Neoehrlichia mikurensis*; the genus *Bartonella* and *B. henselae*; *Francisella tularensis*; *Coxiella burnettii*; the phylum Apicomplexa and 7 *Babesia* spp. (*B. divergens*, *B. microti*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. venatorum*, *B. bovis* and *B. ovis*), but also the two parasitic genera *Theileria* and *Hepatozoon*.

TBP DNA was detected using the BioMark™ real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, USA), a microfluidic system allowing to perform 48 or 96 real-time PCR reactions on 48 or 96 different samples as described in Michelet et al. [21] and Moutailler et al. [22]. Briefly, each sample and primers/probe set were included in individual wells. A pressure system allowed to load them on the chip *via* microchannels, in individual reaction chambers of 10 nl, where each sample will be individually mixed with each primer/probe set.

Primers and probes

Primers and probes used for this analysis have been developed and validated by Michelet et al. [21] and Gondard et al. [23]. They have been designed to specifically amplify DNA from pathogens (bacteria and parasites) which are usually found in ticks in Europe. Their sequences, amplicon size, as well as targeted genes and pathogens are presented in Additional file 1: Table S1.

Please note that, due to potential cross-reactions between primer/probe combinations (i.e. design) targeting *B. burgdorferi* (*s.s.*) and *B. spielmanii* with respectively *B. garinii*/*B. valaisiana* and *B. afzelii* DNA (described in [21]), positive samples for the two former species were considered as negative when associated to the latter. Therefore, potential associations between *B. burgdorferi* (*s.s.*)/*B. garinii*, *B. burgdorferi* (*s.s.*)/*B. valaisiana* and *B. spielmanii*/*B. afzelii* cannot be detected and the co-infection percentage may be under-estimated.

DNA pre-amplification

DNA pre-amplifications were performed using the TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Illkirch, France). Basically, the different primer pairs, used for the real time PCR, were pooled combining equal volume of primers with a final concentration of 0.2 μM. For each sample, 1.25 μl of DNA extract was pre-amplified using the Perfecta PreAmp SuperMix reagent (1×) and the 0.2× pool (0.05 μM), in a final reaction volume of 5 μl. PCR cycle comprised a first cycle at 98 °C for 2 min, followed by 14 cycles with 2 steps, the first one at 95 °C for 10 s and the second one at 60 °C for 3 min. Pre-amplified DNA were then diluted (1:10) by addition of 45 μl of sterile deionised water before use.

High throughput real time PCR

For each pre-amplified sample, the BioMark™ real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, USA) was used

for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using the 48.48 microfluidic dynamic array (Fluidigm, San Francisco, USA). Amplifications were performed using FAM- and black hole quencher (BHQ1)-labeled TaqMan probes with TaqMan Gene Expression Master Mix in accordance with manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Illkirch, France). Thermal cycling conditions were used as follows: 95 °C for 5 min, 45 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s, and 40 °C for 10 s. Data were acquired on the BioMark Real-Time PCR system and analysed using the Fluidigm Real-Time PCR Analysis software to obtain crossing point (CP) values. Three tick species controls (*I. ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*), one negative water control and one positive *Escherichia coli* control were included in each chip.

Nested PCR and sequencing

Samples that were positive either only for species design but not for the genus design or only for the genus design and not for the species design were all re-analysed by nested PCR. We used primer pairs allowing to target another gene than the one tested into the real-time PCR experiment. Their sequences, amplicon size, as well as targeted genes and pathogen genus are presented in Additional file 2: Table S2. Amplicons were sequenced by the Eurofins company and sequences analysed using the Bioedit software and compared to the database NCBI (National Center for Biotechnology Information) by sequence alignment using nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Statistical analysis

TBP prevalences at the seasonal and multi-annual scale

Differences in TBP prevalences were tested within and between years by using a multivariable logistic regression model. We considered the calendar season level for the within-year variability. Seasons were considered as following: Winter (December to February); Spring (March to May); Summer (June to August); and Autumn (September to November). Logistic regression models were developed using the TBP status of each nymph as the outcome measure and season and year as explanatory variables. We performed four specific models for the following group/species of TBPs: (i) *B. burgdorferi* (*s.l.*) (considering *B. burgdorferi* (*s.s.*), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* and *B. spielmanii*); (ii) *B. miyamotoi*; (iii) *A. phagocytophilum*; and (iv) *R. helvetica*. The models were constructed from a generalized linear model option (GLM) [24] using a binomial distribution (logit link). Model assessment was based on Akaike's information criterion (AIC). Results were expressed as odds ratios

(OR) and 95% confidence intervals. Statistical computations were performed in R 3.5.1. [25].

Statistical modelling of tick-borne pathogen associations

We tested the associations between the TBP species that belonged to the co-infection profiles of nymphs found in this study. We used the association screening approach [26]. For a given number of pathogen species tested (NP), the number of possible combination (NC) was calculated as $NC = 2^{NP}$. Assuming similar pathogen prevalence as those observed, a simulated dataset was built as a presence/absence matrix with hosts in lines and pathogen combinations in columns. With 5000 simulations, we obtained the NC statistic distributions. We estimated a 95% confidence interval to obtain a profile that includes simultaneously all the combinations. From this profile, we inferred for each combination two quantiles, Q_{inf} and Q_{sup} . A global test was based on the 95% confidence envelope. When H_0 was rejected, the local tests were based on the NC confidence intervals ($Q_{inf} - Q_{sup}$) [26].

Results

Tick temporal dynamics

From April 2014 to May 2017, a total of 1167 *I. ricinus* ticks were collected in the Sénart forest in the south of Paris (Fig. 1). Please note that May and June 2016 were unfortunately not sampled due to logistic issues. Collected ticks were composed of 1098 nymphs, 35 females and 34 males. Adults were sporadically detected all over the three years; due to their low total abundance (more than 10-fold less compared with nymphs), we decided to focus our temporal analysis on nymphs. The temporal dynamics of nymph densities over the three years is shown in Fig. 2. Nymph densities followed similar patterns from one year to another, with a main peak of activity observed every year in spring, a strong decrease

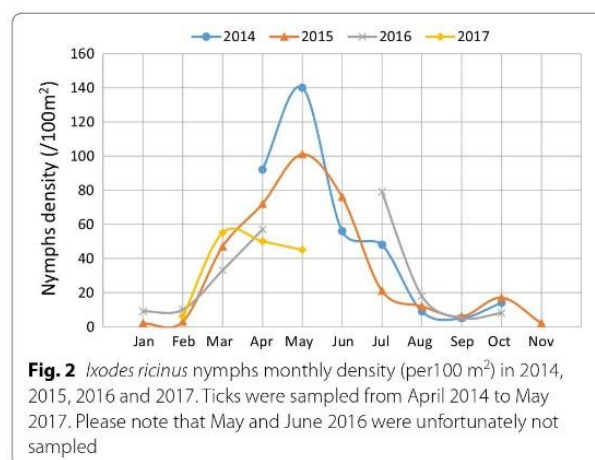


Fig. 2 *Ixodes ricinus* nymphs monthly density (per 100 m²) in 2014, 2015, 2016 and 2017. Ticks were sampled from April 2014 to May 2017. Please note that May and June 2016 were unfortunately not sampled

during summer and a second peak, smaller, observed in Autumn (Fig. 2). In January and February, the average densities were less than 10 questing nymphs/100 m². A clear rise was observed from March to May reaching an average peak of 95 nymphs/100 m² in May. We then observed a decrease in summer up to a minimum average of 5 nymphs/100 m² in September. The nymph densities increased slightly in October to reach an average of 13 nymphs/100 m², before finally decreasing in November (2 nymphs/100 m², sampled in 2015).

Detected pathogens and their prevalence in tick population

Due to technical problems, DNA was extracted and analysed only from 1044 nymphs among the 1098 previously mentioned. A total of 46 were negative for at least one positive control and thus have been removed from the analysis. From the 998 remaining DNA samples, 15.9% (95% CI: 13.7–18.3%) were positive for at least one tested pathogen, which belong to three bacterial and one protozoan genera: *Anaplasma*, *Borrelia*, *Rickettsia* and *Babesia* (Table 1).

Table 1 Summary table of the TBP detection study results

Y	M	NN	<i>B. bu</i> (s.s.)	<i>B. ga</i>	<i>B. af</i>	<i>B. va</i>	<i>B. spi</i>	<i>B. bu</i> (s.l.)	<i>B. mi</i>	<i>Bo. spp.</i>	<i>A. ph</i>	<i>A. spp.</i>	<i>R. he</i>	<i>R. fe</i>	<i>R. spp.</i>	<i>B. ve</i>	<i>Ba. spp.</i>	2	3	TM
2014	Apr	89	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	7	0	7	0	1	0	0	18
	May	127	1	0	0	0	0	1	1	2	12	12	2	0	2	4	4	2	0	18
	Jun	54	0	1	1	1	0	1	0	1	4	4	9	1	10	2	2	1	1	16
	Jul	38	0	1	0	0	1	1	0	1	6	6	1	0	1	0	0	1	0	8
	Aug	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
	Sep	5	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
	Oct	13	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
2015	Jan	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Feb	3	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Mar	43	0	3	1	1	1	3	3	6	1	1	5	0	5	0	0	1	1	12
	Apr	69	2	0	0	0	0	2	0	2	3	4	4	0	4	0	0	0	0	10
	May	88	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	0	3	2	2	0	0	7
	Jun	78	1	0	0	0	1	2	2	4	2	2	1	0	1	2	2	1	0	8
	Jul	21	0	2	2	0	0	3	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4
	Aug	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sep	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Oct	17	4	0	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	Nov	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2016	Jan	9	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
	Feb	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
	Mar	26	2	1	2	0	0	4	0	4	1	1	0	0	0	0	0	1	0	5
	Apr	33	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0	3
	Jul	78	2	2	2	0	1	5	0	5	2	2	4	0	4	1	1	1	1	11
	Aug	11	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	2	0	2	0	0	1	0	3
	Sep	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
	Oct	6	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Feb	6	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2017	Mar	53	0	1	0	1	0	2	0	2	3	3	0	0	0	2	2	0	0
Apr		50	0	0	1	1	0	2	0	2	3	3	0	0	0	1	1	0	0	6
May		41	0	0	0	0	0	0	1	1	4	4	1	0	1	0	0	0	0	6
T		998	15	11	11	6	4	37	12	49	53	54	45	1	46	15	16	10	3	159
NM		30	8	7	8	6	4	18	9	23	14	14	16	1	16	8	9	9	3	27

Abbreviations: Y, year; M, month; NN, number of analysed nymphs; TM, total number of positive samples per month; *B. bu* (s.s.), *B. burgdorferi* (s.s.); *B. ga*, *B. garinii*; *B. af*, *B. afzelii*; *B. va*, *B. valaisiana*; *B. spi*, *B. spielmanii*; *B. bu* (s.l.), *B. burgdorferi* (s.l.); *B. mi*, *B. miyamotoi*; *Bo. spp.*, *Borrelia* spp.; *A. ph*, *A. phagocytophilum*; *A. spp.*, *Anaplasma* spp.; *R. he*, *R. helvetica*; *R. fe*, *Rickettsia felis*; *R. spp.*, *Rickettsia* spp.; *B. ve*, *B. venatorum*; *Ba. spp.*, *Babesia* spp.; 2, co-infections with 2 pathogens; 3, co-infections with 3 pathogens; T, total number of positive samples; NM, number of positive months

Pathogens belonging to the genus *Anaplasma* were detected in 5.4% (95% CI: 4.1–7.0%) of collected ticks. Most of them were positive for *A. phagocytophilum* (5.3% of all the samples) and one DNA sample was only positive for the primers/probe combination specific to *Anaplasma* spp. This sample was confirmed by nested PCR and the amplicon was then sequenced. The BLAST analysis on NCBI showed that this sequence matched at 99% of identity with four different *Anaplasma* species (*A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. ovis* and *A. centrale*). Therefore, this sample was only considered as positive for *Anaplasma* spp.

Two species of *Rickettsia* were detected in questing *I. ricinus* nymphs. *Rickettsia helvetica* was the most prevalent and was detected in 4.5% (95% CI: 3.3–6.0%) of nymphs. *Rickettsia felis* was detected in only one nymph (0.1%, 95% CI: 0.003–0.6%). The presence of *R. felis* DNA was confirmed by nested PCR and sequencing of the *ompB* gene. The obtained sequence (GenBank: MN267050) matched with the corresponding gene sequence of *R. felis* (GenBank: GU182892.1) with an identity of 100% and query cover of 100%.

The genus *Borrelia* was represented by six different species detected in 4.9% (95% CI: 3.7–6.4%) of the surveyed nymphs. Five belonged to the LB group (3.7%, 95% CI: 3.7–6.4%), including *B. burgdorferi* (*s.s.*) (1.5%, 95% CI: 0.8–2.5%), *B. garinii* (1.1%, 95% CI: 0.6–2.0%), *B. afzelii* (1.1%, 95% CI: 0.6–2.0%), *B. valaisiana* (0.6%, 95% CI: 0.2–1.3%) and *B. spielmanii* (0.4%, 95% CI: 0.1–1.0%). DNA of *Borrelia miyamotoi*, belonging to the relapsing fever group, was detected in 1.2% (95% CI: 0.6–2.1%) of the collected nymphs.

DNA from two species of *Babesia* were detected in questing nymph with the microfluidic PCR: *Babesia venatorum* (1.5%, 95% CI: 0.8–2.5%) of ticks and *Babesia*

divergens (0.1%, 95% CI: 0.003–0.6%), detected in one tick. A deeper investigation of the *B. divergens*-positive sample, by nested PCR on the *18S* rRNA gene and amplicon sequencing (GenBank: MN296295), allowed us to finally identify the DNA of *B. capreoli*, a species closely related to *B. divergens*, circulating in wild ruminants and unable to infect human and cattle erythrocytes [27].

Temporal patterns of TBPs in *I. ricinus* nymphs
TBP prevalence at the monthly scale

In the following paragraph and corresponding figures, prevalences are those obtained for months with at least nine collected ticks.

Global infection rates fluctuated from 8% (95% CI: 3.3–15.7%) in May 2015 to 29.6% (95% CI: 18.0–43.6%) in June 2014 (Fig. 3). At the genus level, variations in TBP prevalences and the number of months for which at least one tick was positive for each tested TBPs are presented in Fig. 4 and Table 1.

DNA from pathogens belonging to both genera *Rickettsia* and *Anaplasma* were detected in 16 and 14 of the 30 sampled months, respectively. When detected, prevalences fluctuated from 1.3% (95% CI: 0.03–6.9%) (June 2015) to 18.5% (95% CI: 9.3–31.4%) (June 2014) for *Rickettsia* and from 1.1% (95% CI: 0.03–6.2%) (May 2015) to 15.8% (95% CI: 6.0–31.3%) (July 2014) for *Anaplasma*. Both genera are mainly represented by one species: *R. helvetica* and *A. phagocytophilum* that are the most frequently detected species (16 and 14 of the 30 sampled months, respectively). These two species were found each year.

DNA from members of the genus *Borrelia* was detected in 23 of the 30 sampled months. This bacterial genus displayed the highest variability with prevalences fluctuating from 1.1% (95% CI: 0.03–6.2%) (May 2015) to 23.5%

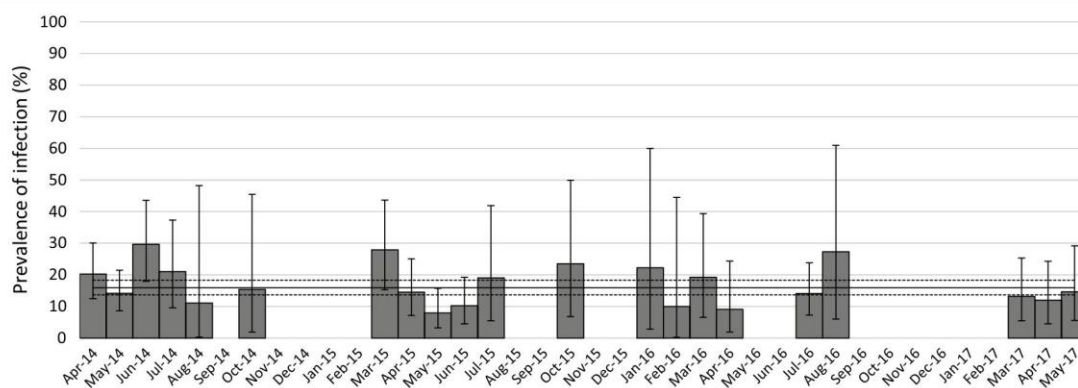


Fig. 3 Nymph infection rate per month for at least one tested pathogen. Months with less than nine nymphs sampled have not been considered for percentage calculation. Error bars represent confidence intervals

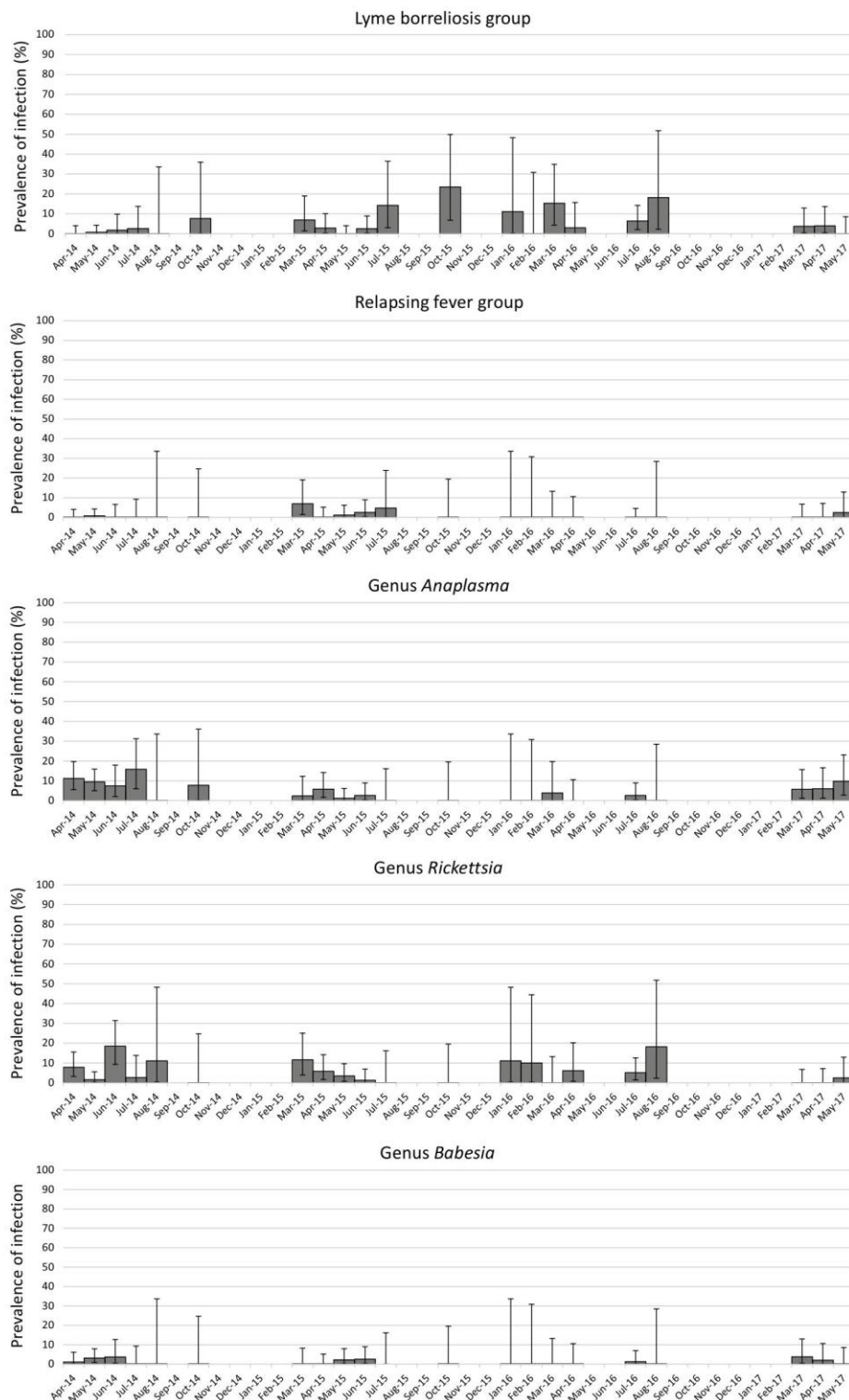


Fig. 4 Nymph infection rate and confidence intervals per month for the different TBPs. Months with less than nine nymphs sampled have not been considered. Error bars represent confidence intervals

(95% CI: 6.8–49.9%) (October 2015). DNA from members of the LB group was detected in 18 of the 30 sampled months with prevalences ranging from 0.8% (95% CI: 0.03–6.2%) in May 2014 to 23.5% (95% CI: 6.8–49.9%) in October 2015. The most frequently identified species were *B. burgdorferi* (*s.s.*) (8/30 sampled months), *B. afzelii* (8/30) and *B. garinii* (7/30). DNA from these species was regularly detected over the three studied years. Conversely, *B. valaisiana* (6/30) and *B. spielmanii* (4/30) DNA was not detected during 11 (from April 2015 to March 2016) and 9 (from July 2015 to April 2016) consecutive months, respectively. *Borrelia miyamotoi* (relapsing fever group) DNA was detected 9 times over the 30 sampled months with prevalences ranging from 0.8% (95% CI: 0.02–4.3%) in May 2014 to 7% (95% CI: 1.5–19.1%) in March 2015.

For parasites, DNA from the genus *Babesia* was detected in 9 months out of 30 sampled months. Prevalences presented the lowest variability ranging from 1.1% (95% CI: 0.03–6.1%) in April 2014 to 3.8% (95% CI:

0.5–13.0%) in March 2017 (Fig. 4). The main detected species was *B. venatorum* that was detected 9 times over 30 samplings and not detected during 9 consecutive sampled months, from June 2015 to April 2016.

TBP prevalences at the seasonal and multi-annual scale

In order to determine if the prevalence of TBPs was different within and between years, a multivariable logistic regression model was performed. The spring season and the year 2014 have been considered as references for the seasonal and yearly effect, respectively. Because some TBPs had too low prevalences in the nymph population (producing unreliable statistics), analyses were only performed on the most prevalent TBPs: *A. phagocytophilum*, *R. helvetica*, *B. burgdorferi* (*s.l.*), *B. miyamotoi* and *B. venatorum*.

Significant differences, in terms of prevalence, were observed at the seasonal scale (Table 2, Fig. 5) for *R. helvetica* (higher in summer compared to spring), *B. burgdorferi* (*s.l.*) (higher in autumn compared to spring) and

Table 2 Multivariable logistic regression models assessing the seasonal and yearly TBP prevalence variations in nymphs. Odds ratios and their associated 95% confidence intervals obtained from the best model of TBP seasonal and yearly prevalence in questing nymphs

Model	TBP	Variable	Odds ratio	95% CI		Significant difference
				Low	High	
1	<i>B. burgdorferi</i> (<i>s.l.</i>)	Spring	Ref			
		Autumn	4.53	1.50	12.49	Yes
		Summer	1.69	0.75	3.89	No
		Winter	1.73	0.25	7.01	No
		2014	Ref			
		2015	2.93	1.12	9.14	Yes
		2016	4.48	1.60	14.53	Yes
2	<i>B. miyamotoi</i>	2017	2.45	0.57	9.95	No
		Spring	Ref			
		Autumn	0	na	8.3275E+218	No
		Summer	0	na	2.26397E+88	No
3	<i>A. phagocytophilum</i>	Winter	28.60	1.03	800.00	Yes
		2014	Ref			
		2015	0.20	0.08	0.42	Yes
		2016	0.16	0.04	0.45	Yes
4	<i>R. helvetica</i>	2017	0.65	0.30	1.32	No
		Spring	Ref			
		Autumn	0	0	6.7759E+11	No
		Summer	3.10	1.27	7.85	Yes
		Winter	0	na	1.1447E+145	No
		2014	Ref			
		2015	1.34	0.54	3.39	No
2016	0.81	0.12	3.24	No		
2017	0.16	0.01	0.87	Yes		

Abbreviations: CI, confidence interval; ref, reference; na, not applicable

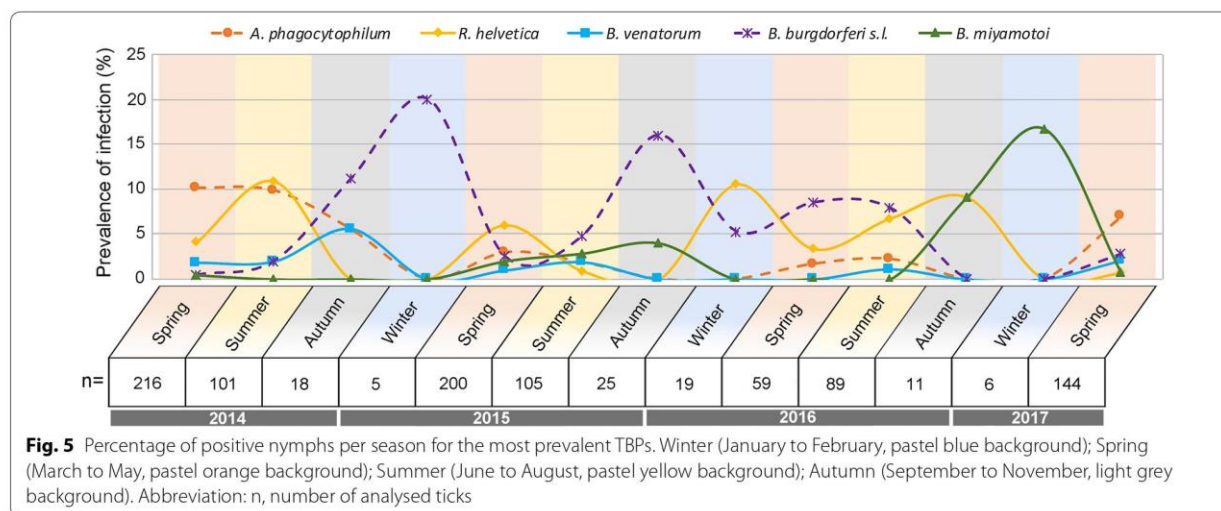


Fig. 5 Percentage of positive nymphs per season for the most prevalent TBPs. Winter (January to February, pastel blue background); Spring (March to May, pastel orange background); Summer (June to August, pastel yellow background); Autumn (September to November, light grey background). Abbreviation: n, number of analysed ticks

B. miyamotoi (higher in winter than in spring). Please note that the smallest number of sampled ticks (30 in total) was found in winter, and that the difference observed for *B. miyamotoi* in winter corresponded to only one infected tick collected in February 2017.

Significant differences were also observed between years for bacteria belonging to the complex *B. burgdorferi* (*s.l.*) with higher prevalence in 2015 and 2016 compared to 2014; for *A. phagocytophilum*, with lower prevalence in 2015 and in 2016 compared to 2014 and for *R. helvetica*, with lower prevalence in 2017 than in 2014. However, please note that samplings were only performed from January to May in 2017. No significant differences were observed in relation to season or year for *B. venatorum*.

Pathogen associations

Among all the sampled ticks, 1% (95% CI: 0.5–1.8%) were co-infected with two pathogens and 0.3% (95% CI: 0.006–0.8%) were co-infected with three pathogens.

Eight different co-infection profiles were found (Table 3). In most of cases (7/13), these co-infections concerned species belonging to the genus *Borrelia*: *B. garinii* + *B. afzelii*; *B. garinii* + *B. spielmanii*; *B. garinii* + *B. afzelii* + *B. valaisiana* and *B. garinii* + *B. valaisiana* + *B. spielmanii*. Co-infection profiles with species belonging to different genera were also observed: *A. phagocytophilum* + *B. venatorum*; *A. phagocytophilum* + *R. helvetica*; *B. burgdorferi* (*s.s.*) + *R. helvetica* and *B. garinii* + *B. afzelii* + *R. helvetica*. All these associations between pathogens were tested using the association screening approach of Vaumourin et al. [26]. Compared to a random analysis, no associations were found to be underrepresented while two were overrepresented: the first one between *B. garinii* and *B. afzelii* (observation = 3; minimum expected = 0; maximum expected = 2), and the second one between *B. garinii* and *B. spielmanii* (observation = 2; minimum expected = 0; maximum expected = 1).

Table 3 Summary table of the reported co-infection profiles

<i>B. bu</i> (<i>s.s.</i>)	<i>B. ga</i>	<i>B. af</i>	<i>B. va</i>	<i>B. spi</i>	<i>A. ph</i>	<i>R. he</i>	<i>B. ve</i>	Co-occurrence number
	x	x						3
	x			x				2
	x	x	x					1
	x		x	x				1
					x		x	3
					x			1
x						x		1
	x	x				x		1

Abbreviations: *B. bu* (*s.s.*); *B. burgdorferi* (*s.s.*); *B. ga*, *B. garinii*; *B. af*, *B. afzelii*; *B. va*, *B. valaisiana*; *B. spi*, *B. spielmanii*; *A. ph*, *A. phagocytophilum*; *R. he*, *R. helvetica*; *B. ve*, *B. venatorum*

Discussion

Ixodes ricinus density and seasonal dynamics

This three-year survey demonstrated a clear seasonal pattern in *I. ricinus* density, with a marked peak of questing nymphs in spring and a smaller peak in autumn. Low, but present activity was detected in winter, as has been observed in Germany [28]. In addition to these general patterns, some unexpected data were observed, the most striking being no peak activity in spring 2017 (April and May) with tick densities very similar to those recorded in March. Abiotic factors such as temperature, relative humidity and rainfall, or fluctuating host numbers in the sampling area are known to influence questing tick abundance and activity patterns [29–34] and could explain these unusual observations. It is important to note that 2017 was distinguished by an abnormally wet March, with total rainfall much higher than that recorded in previous years in the same area (71.3, compared to 11.2, 33.6 and 61.7 mm rain/month in 2014, 2015 and 2016, respectively). Interestingly, the increased March rainfall was followed by an April drought (7.9 mm of rain/month in 2017, compared to 48.4, 27.2 and 66.2 mm rain/month in 2014, 2015 and 2016, respectively) (rainfall data estimated from the Orly station, Météo-France data; https://donneespubliques.meteofrance.fr/?fond=produit&id_produit=90&id_rubrique=32). These unusual meteorological characteristics could explain the stable tick density from March to May 2017. Thereby, this finding clearly shows that the bimodal tick activity pattern usually observed during this study can exceptionally change with unusual environmental conditions, reinforcing the importance of regular monitoring.

Ixodes ricinus-borne pathogen composition and prevalence over the three years

Most of the detected pathogen species corresponded to microorganisms known to circulate in the Western Palaearctic [35–42]. However, several species belonging to the genera *Bartonella* and *Francisella* previously reported in the studied area [40, 43], were not detected. The most prevalent pathogen species were *A. phagocytophilum* (5.4% of the examined nymphs), *R. helvetica* (4.5%), and *B. burgdorferi* (*s.l.*) (3.7%). Both high- and low-prevalence TBPs were consistently detected in the sampling area for the duration of the study. Although prevalences varied between different TBPs, and some were not detected for long periods, they were all detected recurrently. Continued detection is consistent with the year-round presence of reservoir hosts in the sampling area (wood mice, bank voles, Siberian chipmunks, roe deer, common blackbird, European robin, song thrush, etc.) [34, 44, 45]. The continued presence of reservoir hosts could facilitate the

circulation of dominant species, and maintain, even at low rates, less prevalent pathogen species that may not be detected by a single sampling. This does support to regularly studying TBP temporal dynamics, to improve the assessment of their prevalence.

We also detected in a single tick, the DNA of the emergent human pathogen *R. felis*. Its detection is particularly unexpected as this bacterium is known to be mainly transmitted from cat to cat *via* fleas, with human contamination arising from cat or flea bites. As we only detected DNA from *R. felis*, we cannot exclude that this detection could correspond to remnant DNA from the previous blood meal. Nevertheless, several studies have already detected the presence of *R. felis* or *R. felis*-like organisms in hematophagous arthropods (reviewed in [46, 47]), including in ticks collected from natural environments [48], and notably in two studies performed on questing *I. ricinus*, including one based on RNA detection [49, 50]. Rarely investigated in studies dealing with TBPs, the repeated detection of *R. felis* should encourage increased surveillance for this spotted fever-causing pathogen in humans. Finally, all these findings suggest that a unique sampling would certainly not facilitate the detection of this pathogen, again highlighting the importance of collecting and analysing ticks at a large temporal scale.

Babesia divergens and *B. capreoli* are two closely related species. During this study, we found out that the design initially used to detect *B. divergens* actually also enabled detection of DNA of *B. capreoli*. While *B. divergens* is responsible of babesiosis in humans and cattle, *B. capreoli* is only able to colonize erythrocytes from deer, therefore presenting no threat for humans or livestock [27]. These results emphasise the importance of confirmation and careful interpretations of microfluidic real time PCR [51].

Seasonal and inter-annual dynamics of *I. ricinus*-borne pathogens

Improving the prevention of TBDs requires a better understanding of their temporal, and in particular, their seasonal dynamics. However, only a few studies have addressed these issues during a minimum three-year period [12, 13]. As ticks were collected monthly for over three years in this study, we detected significant seasonal or annual infection rate fluctuations for four TBPs: *R. helvetica*, *B. burgdorferi* (*s.l.*), *B. miyamotoi* and *A. phagocytophilum*. Note that the statistically significant highest prevalence of *B. miyamotoi* in winter is only due to the detection of one positive tick sampled during winter in 2017. In our opinion, this result alone is insufficient to presume that *B. miyamotoi* have an increased winter prevalence. However, we can observe

that even if very few ticks are questing during these periods, they may carry TBPs.

While significant seasonal and annual differences were observed for *B. miyamotoi* and *A. phagocytophilum*, respectively, the presence of *R. helvetica* and *B. burgdorferi* (*s.l.*) varied significantly according to both seasons and years. None of these microorganisms followed a similar pattern. Comparing our results to the multi-annual studies previously mentioned, we observed that only *R. helvetica* presented similar seasonal patterns [12]. This finding again emphasises how the season, the year or the sampling area can influence TBP presence and prevalence in questing tick populations.

The most common explanation for temporal variations in TBP prevalences is the variable availability of reservoir hosts during tick previous feeding stage. This hypothesis was already suggested by Coipan et al. [12] who observed that several micro-organisms, assumed to share the same reservoir host, also presented similar seasonal patterns. Because the tick life-cycle is fundamentally linked to its host, any changes to the available host spectrum will undoubtedly influence TBP prevalence in the tick community [52]. However, because the entire tick life-cycle is multi-annual, it is difficult anyway to know if nymphs questing at the same time did perform their previous blood meal at the same period. The same generation of questing nymphs could come from larvae that would have fed at a different moment and thus potentially upon different host species. An alternative hypothesis, based on both the presence of pathogens and tick physiology, could also explain these patterns. Carrying certain TBPs was shown to improve tick resistance to challenging abiotic conditions. Herrmann & Gern [17, 18] demonstrated that ticks carrying *Borrelia* species exhibited higher survival rates in desiccating conditions and a lower tendency to move to favourable conditions for maintaining water balance than non-infected ticks. This was associated to a higher reserve of energy in *Borrelia*-infected ticks [53] which would therefore exhibit higher resistance capacities to hydric stress notably. This hypothesis would explain the higher prevalence of *Borrelia*-infected questing ticks observed during or after the summer period in the present study and in those of Coipan & Takken [12, 13]. Similarly, Neelakanta et al. [19] demonstrated a higher expression of the *iafgp* gene, coding for an anti-freeze glycoprotein, in *A. phagocytophilum*-infected ticks. This thus conferred to ticks a stronger resistance to cold that could lead to higher prevalence of *A. phagocytophilum*-infected questing ticks during or just after the winter. This hypothesis was not consistent with our data as *A. phagocytophilum* was not observed in greater prevalence during the cold seasons of our study.

Our results, in combination with those from the literature, support the hypothesis that TBP prevalence is influenced by both biotic and abiotic factors, and reiterate that sporadic samplings are insufficient to assess it.

Pathogen co-occurrence

Tick co-infections are being identified more and more frequently [22, 42, 50, 54–58]. Clinical co-infections with several TBPs are commonly reported [59–61] and are known to affect both disease symptoms and severity [62, 63]. It is thus essential to investigate TBP associations in ticks, to better identify potential clinical co-infections and to improve epidemiological knowledge of TBDs.

In this longitudinal three-year study, two TBP associations were significantly overrepresented compared to a random distribution: the first one was between *B. garinii* and *B. afzelii*, as has been previously observed in studies using similar detection tools [22, 42], or different methods (16S rRNA gene sequencing [64]); the second one was between *B. garinii* and *B. spielmanii*. Interestingly, these findings contrast with published results on *I. ricinus* TBPs. While performing a meta-analysis on data published from 2010 to 2016, Strnad et al. [65] observed a negative correlation between *B. garinii* and *B. afzelii*. Similarly, Herrmann et al. [66] also detected a negative co-occurrence between these two species following an analysis of 7400 nymphs collected over three years. These results are coherent considering the host specificity of these *Borrelia* species. Indeed, *B. garinii* does not share the same reservoir host (birds) than *B. afzelii* or *B. spielmanii* (wood mice and bank voles, or hazel and garden dormice) [67–72], and none of these species are known to be transmitted transovarially.

Although the associations we identified were statistically “overrepresented”, in fact we only observed one additional association than the fixed overrepresentation threshold (i.e. observed associations = 3 and 2; minimum expected = 0 and 0; maximum expected = 2 and 1; for *B. garinii* + *B. afzelii* and *B. garinii* + *B. spielmanii* associations, respectively). This indicates that caution should be applied when drawing conclusions about permanent associations between these different bacteria in ticks. Several different hypotheses could potentially explain these associations in the same nymph. First, hosts are likely to carry several adjacent feeding ticks. This phenomenon, known as co-feeding, could promote pathogen exchange between ticks even in the absence of systemic host infection [73]. Secondly, as discussed by van Duijvendijk et al. [74], when bloodmeals are disrupted due to host grooming, immune response or death, ticks may feed on more than one host to completely engorge, and consequently be exposed to several pathogens. Thirdly, despite these TBP species segregating between bird and

rodent hosts, all of them have been detected in hedgehogs [75, 76], and *B. afzelii* and *B. garinii* have been simultaneously detected in one Siberian chipmunk [45]. Both of these mammals were found to host a large number of tick larvae [45, 77], and Siberian chipmunks have been reported to induce higher *B. burgdorferi* (*s.l.*) infection rates in nymphs, compared to bank voles and wood mice [45] in the Sénart forest. A last hypothesis might be that our analytical methods do not enable distinguishing the rodent-circulating *B. garinii* OspA serotype 4 (corresponding to *B. bavariensis*) [78] from other *B. garinii* serotypes.

Associations between *B. garinii* and *B. valaisiana* are frequently reported, which is not surprising as these species share the same reservoir host [79]. This association was the most common TBP association in a meta-analysis of literature published between 1984 and 2003 [80], and has been reported several times recently [11, 66, 81]. While we observed this association twice, both times in association with a third *Borrelia* species, either *B. afzelii* or *B. spielmanii*, it was not significantly overrepresented compared to a random distribution. Among the three previously mentioned studies, only Herrmann et al. [66] demonstrated that this association was overrepresented when compared to a randomly sampled analysis. However, our study was performed on a much smaller dataset (998 vs 7400 analysed nymphs), with a halved co-infection percentage (1.3 vs 3%), indicating that our statistical analysis may be less powerful, which could explain why this association was not detected.

These contrasting tick pathogen association results highlight the complexity in clearly identifying pathogen associations in field-collected ticks. Several other parameters can also potentially influence pathogen association (host spectrum within the studied area, sample size influencing analytical statistical power, identification bias, etc.). In this context, performing investigations under controlled conditions (suitable TBP growing and tick breeding systems, etc.) will be a crucial future step to experimentally test these different associations and improve our knowledge of TBP co-occurrences.

Conclusions

This three-year study of *I. ricinus*-borne pathogens (i) identified several TBPs previously reported in the area, consistent with reservoir host availability; (ii) allowed the surprising detection of *R. felis* DNA, a microorganism rarely reported in questing ticks; (iii) highlighted significant variations in seasonal and inter-annual pathogen prevalence; and (iv) identified several unexpected co-occurrences between pathogens belonging to the *B. burgdorferi* (*s.l.*) complex. All these results represent another step towards understanding the TBP ecology

and emphasise the need to perform longitudinal studies, particularly because the main factors that are supposed to influence tick and TBP ecology could change in the next few years with climate changes. Associated to other factors such as host information or meteorological measures, this kind of data is crucial to allow a better understanding of TBP ecology and TBD epidemiology.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3799-7>.

Additional file 1: Table S1. Targeted genes, amplicon size, primers and probe sequences used for TBP and tick species detection.

Additional file 2: Table S2. Targeted genes and primer sequences used for results confirmation.

Abbreviations

TBP: tick-borne pathogen; TBD: tick-borne disease; LB: Lyme borreliosis; *s.l.*: *sensu lato*; *s.s.*: *sensu stricto*; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; NCBI: National Center for Biotechnology Information; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool; GLM: generalized linear model; AIC: Akaike's Information Criterion; OR: odds ratio; NP: number of pathogen species tested; NC: number of possible combinations; ia1fgp: *Ixodes scapularis* antifreeze glycoprotein.

Acknowledgments

The authors would like to thank the financers of this project, that are the French National Institute of Agronomic Research (INRA) (1): the métaprogramme "Metaomics and microbial ecosystems" (MEM) and the métaprogramme "Adaptation of Agriculture and Forests to Climate Change" (ACCAF) that funded the tick collection from the CC-EID project. We also would like to thank the Ile-de-France region that funded the salary of EL, the PhD student working on this project. We are very grateful to all the persons that brought their help to the support of the technical part of this project: Julie Cat, Valérie Poux and members of the VECTOTIQ team for their involvement in tick samplings and identification; Elodie Devillers, for her precious help to learn the Microfluidic PCR approach and also Sabine Delannoy and the IdentityPath genomic platform that allowed us to perform the tick-borne pathogens screening. Thank you as well to Ladislav Šimo for his precious help in figure improvement.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: TP, MVT, JFC, KCM and EL. Performed the experiments: EL. Analysed the data: EL, TP, SM, MM and KCM. Wrote the paper: EL, MM, KCM, JFC, SM, MVT and TP. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The present study was funded by the métaprogramme "Metaomics and microbial ecosystems" (MEM) and the métaprogramme "Adaptation of Agriculture and Forests to Climate Change" (ACCAF) granted by the French National Institute for Agricultural Research (France).

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are provided within the article. Sequences for *Babesia capreoli* and *Rickettsia felis* were submitted to the GenBank database under the accession numbers MN296295 and MN267050, respectively. The datasets used and/or analysed during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, INRA, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France. ² Laboratory for Animal Health, Epidemiology Unit, ANSES, University Paris Est, Maisons-Alfort, France. ³ UMR EPIA, VetAgro Sup, INRA, Université de Lyon, Université Clermont Auvergne, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France. ⁴ Animal Health Department, INRA, Nouzilly, France.

Received: 12 June 2019 Accepted: 10 November 2019

Published online: 21 November 2019

References

- Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129:53–14.
- de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci*. 2008;13:6938–46.
- Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol*. 2012;28:437–46.
- Strle F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J Med Microbiol Suppl*. 2004;293:27–35.
- Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1208–10.
- Bonnet S, Jouglin M, Malandrin L, Becker C, Agoulon A, L'Hostis M, et al. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology*. 2007;134:197–207.
- Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis H-J, et al. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1074–80.
- Bonnet S, Brisseau N, Hermouet A, Jouglin M, Chauvin A. Experimental *in vitro* transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. *Vet Res*. 2009;40:1–8.
- Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, et al. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors*. 2009;2:41.
- Gassner F, van Vliet AJH, Burgers SLGE, Jacobs F, Verbaarschot P, Hovius EKE, et al. Geographic and temporal variations in population dynamics of *Ixodes ricinus* and associated *Borrelia* infections in the Netherlands. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2010;11:523–32.
- Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Müller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:2923–31.
- Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, Maassen C, van der Giessen J, Takken W, et al. Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:36.
- Takken W, van Vliet AJH, Verhulst NO, Jacobs FHH, Gassner F, Hartemink N, et al. Acarological risk of *Borrelia burgdorferi sensu lato* infections across space and time in the Netherlands. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2016;17:99–107.
- Chvostáč M, Špitalská E, Václav R, Vaculová T, Minichová L, Derdákova M. Seasonal patterns in the prevalence and diversity of tick-borne *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in an urban temperate forest in southwestern Slovakia. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15:994.
- Gilbert L, Maffey GL, Ramsay SL, Hester AJ. The effect of deer management on the abundance of *Ixodes ricinus* in Scotland. *Ecol Appl*. 2012;22:658–67.
- van Wieren SE, Hofmeester TR. The role of large herbivores in *Ixodes ricinus* and *Borrelia burgdorferi* s.l. dynamics. In: Braks MAH, van Wieren SE, Takken W, Sprong H, editors. *Ecology and prevention of Lyme borreliosis*. Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2016. p. 75–89.
- Herrmann C, Gern L. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi sensu lato* infection. *J Med Entomol*. 2010;47:1196–204.
- Herrmann C, Gern L. Do the level of energy reserves, hydration status and *Borrelia* infection influence walking by *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks? *Parasitology*. 2012;139:330–7.
- Neelakanta G, Sultana H, Fish D, Anderson JF, Fikrig E. *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J Clin Invest*. 2010;120:3179–90.
- Vassallo M, Pichon B, Cabaret J, Figureau C, Pérez-Eid C. Methodology for Sampling Questing Nymphs of *Ixodes Ricinus* (Acari: Ixodidae), the Principal Vector of Lyme Disease in Europe. *J Med Entomol*. 2000;37:335–9.
- Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M, et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:103.
- Moutailler S, Moro CV, Vaumourin E, Michelet L, Tran FH, Devillers E, et al. Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004539.
- Gondard M, Delannoy S, Pinarello V, Aprelon R, Devillers E, Galon C, et al. Upscaling surveillance of tick-borne pathogens in the French Caribbean islands. *bioRxiv*. 2019. <https://doi.org/10.1101/532457>.
- McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. London: Chapman et Hall; 1989.
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2018.
- Vaumourin E, Vourch G, Telfer S, Lambin X, Salih D, Seitzer U, et al. To be or not to be associated: power study of four statistical modeling approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:62.
- Malandrin L, Jouglin M, Sun Y, Brisseau N, Chauvin A. Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. *Int J Parasitol*. 2010;40:277–84.
- Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol*. 2008;298:50–4.
- Perret J-L, Guigoz E, Rais O, Gern L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res*. 2000;86:554–7.
- Gilbert L. Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia*. 2010;162:217–25.
- Tagliapietra V, Rosà R, Arnoldi D, Cagnacci F, Capelli G, Montarsi F, et al. Saturation deficit and deer density affect questing activity and local abundance of *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) in Italy. *Vet Parasitol*. 2011;183:114–24.
- Schulz M, Mahling M, Pfister K. Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *J Vector Ecol*. 2014;39:56–65.
- Vourc'h G, Abrial D, Bord S, Jacquot M, Masségli S, Poux V, et al. Mapping human risk of infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the agent of Lyme borreliosis, in a periurban forest in France. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2016;7:644–52.
- Marchant A, Coupance AL, Joly C, Perthame E, Sertour N, Garnier M, et al. Infection of *Ixodes ricinus* by *Borrelia burgdorferi sensu lato* in peri-urban forests of France. *PLoS ONE*. 2017;12:e0183543.
- Capelli G, Ravagnan S, Montarsi F, Ciochetta S, Cazzin S, Porcellato E, et al. Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasit Vectors*. 2012;5:61.
- Overzier E, Pfister K, Herb I, Mahling M, Böck G, Silaghi C. 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 Tick-Borne Dis*. 2013;4:320–8.
- Pangráčová L, Derdákova M, Pekárik L, Hviščová I, Vichová B, Stanko M, et al. *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of eastern Slovakia. *Parasit Vectors*. 2013;6:238.
- Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, Velhin S, Hübschen JM, Ignatyev G, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS ONE*. 2013;8:e54476.

39. Hansford KM, Fonville M, Jahfari S, Sprong H, Medlock JM. *Borrelia miyamotoi* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in England. *Epidemiol Infect.* 2015;143:1079–87.
40. Paul REL, Cote M, Le Naour E, Bonnet SI. Environmental factors influencing tick densities over seven years in a French suburban forest. *Parasit Vectors.* 2016;9:309.
41. Sormunen JJ, Penttinen R, Klemola T, Hänninen J, Vuorinen I, Laaksonen M, et al. Tick-borne bacterial pathogens in southwestern Finland. *Parasit Vectors.* 2016;9:168.
42. Raileanu C, Moutailler S, Pavel I, Porea D, Mihalca AD, Savuta G, et al. *Borrelia* diversity and co-infection with other tick-borne pathogens in ticks. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:36.
43. Reis C, Cote M, Paul REL, Bonnet S. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2010;11:907–16.
44. Marsot M, Henry P-Y, Yourc'h G, Gasqui P, Ferquel E, Laignel J, et al. Which forest bird species are the main hosts of the tick, *Ixodes ricinus*, the vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, during the breeding season? *Int J Parasitol.* 2012;42:781–8.
45. Marsot M, Chapuis J-L, Gasqui P, Dozières A, Masséglija S, Pisanu B, et al. Introduced Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus barberi*) contribute more to Lyme borreliosis risk than native reservoir rodents. *PLoS ONE.* 2013;8:e55377.
46. Reif KE, Macaluso KR. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J Med Entomol.* 2009;46:723–36.
47. Brown LD, Macaluso KR. *Rickettsia felis*, an emerging flea-borne rickettsiosis. *Curr Trop Med Rep.* 2016;3:27–39.
48. Oliveira K, Oliveira SL, Dias C, Silva A, Almeida RM, Almada G, et al. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian spotted fever. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2008;103:191–4.
49. Vayssier-Taussat M, Moutailler S, Michelet L, Devillers E, Bonnet S, Cheval J, et al. Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe. *PLoS ONE.* 2013;8:e81439.
50. Lejal E, Moutailler S, Šimo L, Vayssier-Taussat M, Pollet T. Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors.* 2019;12:152.
51. Sprong H, Fonville M, van Leeuwen A, Devillers E, Ibañez-Justicia A, Stroo A, et al. Detection of pathogens in *Dermacentor reticulatus* in northwestern Europe: evaluation of a high-throughput array. *Heliyon.* 2019;5:e01270.
52. Pfäffle M, Littwin N, Muders SV, Petney TN. The ecology of tick-borne diseases. *Int J Parasitol.* 2013;43:1059–77.
53. Herrmann C, Voordouw MJ, Gern L. *Ixodes ricinus* ticks infected with the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, have higher energy reserves. *Int J Parasitol.* 2013;43:477–83.
54. Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Menach AL, Boulouis H-J, et al. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia* sp. *Vet Res.* 2005;36:79–87.
55. Schicht S, Junge S, Schnieder T, Strube C. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and coinfection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the hard tick *Ixodes ricinus* in the City of Hanover (Germany). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:1595–7.
56. Andersson M, Bartkova S, Lindestad O, Råberg L. Co-infection with 'Candidatus Neohelminthospora mikurensis' and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in southern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:438–42.
57. Cosson J-F, Michelet L, Chotte J, Le Naour E, Cote M, Devillers E, et al. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit Vectors.* 2014;7:233.
58. Castro LR, Gabrielli S, Iori A, Cancrini G. Molecular detection of *Rickettsia*, *Borrelia*, and *Babesia* species in *Ixodes ricinus* sampled in northeastern, central, and insular areas of Italy. *Exp Appl Acarol.* 2015;66:443–52.
59. Tijssse-Klasen E, Sprong H, Pandak N. Co-infection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Rickettsia* species in ticks and in an erythema migrans patient. *Parasit Vectors.* 2013;6:347.
60. Moniuszko A, Dunaj J, Świącicka I, Zambrowski G, Chmielewska-Badora J, Żukiewicz-Sobczak W, et al. Co-infections with *Borrelia* species, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in patients with tick-borne encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:1835–41.
61. Hoversten K, Bartlett MA. Diagnosis of a tick-borne coinfection in a patient with persistent symptoms following treatment for Lyme disease. *Case Rep.* 2018. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225342>.
62. Krause PJ, Telford SR, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA.* 1996;275:1657–60.
63. Diuk-Wasser MA, Vannier E, Krause PJ. Coinfection by *Ixodes* tick-borne pathogens: ecological, epidemiological, and clinical consequences. *Trends Parasitol.* 2016;32:30–42.
64. Aivelo T, Norberg A, Tschirren B. Bacterial microbiota composition of *Ixodes ricinus* ticks: the role of environmental variation, tick characteristics and microbial interactions. *bioRxiv.* 2019. <https://doi.org/10.1101/559245>.
65. Strnad M, Hönig V, Růžek D, Grubhoffer L, Rego ROM. Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83:e00609–17.
66. Herrmann C, Gern L, Voordouw MJ. Species co-occurrence patterns among Lyme borreliosis pathogens in the tick vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:7273–80.
67. Humair P-F, Postic D, Wallich R, Gern L. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralblatt Für Bakteriologie.* 1998;287:521–38.
68. Kurtenbach K, Carey D, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol.* 1998;35:77–81.
69. Huegli D, Hu CM, Humair P-F, Wilske B, Gern L. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA Serotype 4 in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4735–7.
70. Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka F-R. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmanii* sp. nov., with its hosts in central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:6414–9.
71. Richter D, Schlee DB, Matuschka F-R. Reservoir competence of various rodents for the Lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:3565–70.
72. Taragel'ova V, Koci J, Hanincova K, Kurtenbach K, Derdakova M, Ogden NH, et al. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:1289–93.
73. Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today.* 1996;12:472–9.
74. van Duijvendijk G, Coipan C, Wagemakers A, Fonville M, Ersöz J, Oei A, et al. Larvae of *Ixodes ricinus* transmit *Borrelia afzelii* and *B. miyamotoi* to vertebrate hosts. *Parasit Vectors.* 2016;9:97.
75. Skuballa J, Oehme R, Hartelt K, Petney T, Bücher T, Kimmig P, et al. European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp., Germany. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:952–3.
76. Skuballa J, Petney T, Pfäffle M, Oehme R, Hartelt K, Fingerle V, et al. Occurrence of different *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis*, and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus* spp.) in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3:8–13.
77. Gern L, Rouvinez E, Toutoungi LN, Godfroid E. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi sensu lato* involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol (Praha).* 1997;44:309–14.
78. Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, et al. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of house-keeping genes. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:5410–6.
79. Hanincova K, Taragel'ova V, Koci J, Schafer SM, Hails R, Ullmann AJ, et al. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:2825–30.
80. Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7203–16.
81. Lommano E, Bertaiola L, Dupasquier C, Gern L. Infections and co-infections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in western Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:4606–12.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

III. Identification des agents pathogènes à l'échelle des organes chez *Ixodes ricinus*

Cette étude a fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue *Parasites and Vectors* :

Lejal E, Moutailler S, Simo L, Vayssier-Taussat M, Pollet T. (2019). Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*.12: 152. (bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/489328>)

1. Présentation générale de l'étude et principaux résultats

A. Contexte de l'étude

La plupart des études s'intéressant aux agents pathogènes transmis par les tiques sont réalisées sur des tiques entières. Cependant, ces informations ne permettent pas de savoir si l'agent pathogène est rapidement transmissible, ni si les co-occurrences observées (positives ou négatives), outre le spectre d'hôtes, pourraient refléter des relations particulières, à un niveau localisé, entre certains micro-organismes. Dans ce contexte, je me suis donc intéressée à l'étude des agents pathogènes et à leur prévalence dans deux organes clés de tiques adultes *I. ricinus*, le tube digestif et les glandes salivaires, qui jouent un rôle déterminant dans l'acquisition et la transmission de ces agents pathogènes.

B. Méthodes

Pour cela, une soixantaine de tiques *I. ricinus* adultes (30 femelles et 30 mâles), à l'affût, a été échantillonnée en forêt de Sénart. Après une dissection minutieuse des organes, l'ADN de ces derniers a été extrait avant d'être analysé pour la présence d'une trentaine d'agents pathogènes, par la technique de PCR microfluidique en temps réel.

C. Résultats principaux et discussion

Cette étude a permis de détecter la présence d'agents pathogènes chez respectivement 73% et 59% des tiques mâles et femelles testées. Parmi les agents pathogènes

défectés on compte, des espèces bactériennes appartenant aux genres *Borrelia*, *Rickettsia* et *Anaplasma*, mais aussi des parasites du genre *Babesia*.

L'un des résultats principaux de cette étude concerne les bactéries du groupe *Borrelia burgdorferi* s.l., dont plusieurs espèces (*B. lusitaniae*, *B. garinii* et *B. spielmanii*) ont été détectées à la fois dans les glandes salivaires et le tube digestif de femelles échantillonnées à l'affût. Or, il est communément reconnu dans la communauté scientifique, que les membres du complexe *Borrelia burgdorferi* s.l., sont stockés dans le tube digestif et que leur migration dans les glandes salivaires ne s'effectue que lors de la prise d'un nouveau repas sanguin, notamment par l'induction d'un changement d'expression de leurs protéines de surface (Piesman and Schneider, 2002). Ce résultat, en cohérence avec les observations récentes de Sertour *et al.* (2018), nous a permis de remettre en perspectives certains postulats établis sur les mécanismes de transmission de ces agents pathogènes et de soulever de nouvelles hypothèses concernant la dynamique des *Borrelia* à l'échelle des organes de la tique : 1) Il se pourrait que les *Borrelia* détectées puissent correspondre à des bactéries résiduelles qui auraient atteint les glandes salivaires lors du dernier repas sanguin mais n'auraient pas été toutes transmises à ce moment-là, faisant de cet organe un potentiel réservoir ; 2) La prise d'un nouveau repas sanguin pour stimuler leur migration, du tube digestif aux glandes salivaires, pourrait n'être nécessaire que pour certaines espèces de ce complexe, hypothèse déjà soulevée par Sertour *et al.* (2018).

Cette étude a également permis de mettre en évidence des co-infections à l'échelle des organes différentes de celles communément observées à l'échelle de l'individu entier dans la littérature (Rauter and Hartung, 2005; Lommano *et al.*, 2012; Herrmann *et al.*, 2013a; Moutailler *et al.*, 2016; Raileanu *et al.*, 2017; Strnad *et al.*, 2017) ou dans notre analyse de la dynamique temporelle. Quel que soit l'organe, ces co-infections majoritaires, étaient représentées par *R. helvetica*/*A. phagocytophilum* chez les mâles et *R. helvetica*/*B. lusitaniae* chez les femelles. L'ensemble de ces résultats souligne une fois de plus qu'il est crucial de considérer les différentes échelles d'études, ici les tiques entières *versus* les organes, pour mieux comprendre l'écologie des agents pathogènes transmis par les tiques.

SHORT REPORT

Open Access



Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*

Emilie Lejal¹, Sara Moutailler¹, Ladislav Šimo¹, Muriel Vayssier-Taussat² and Thomas Pollet^{1*}**Abstract**

Background: The tick midgut and salivary glands represent the primary organs for pathogen acquisition and transmission, respectively. Specifically, the midgut is the first organ to have contact with pathogens during the blood meal uptake, while salivary glands along with their secretions play a crucial role in pathogen transmission to the host. Currently there is little data about pathogen composition and prevalence in *Ixodes ricinus* midgut and salivary glands. The present study investigated the presence of 32 pathogen species in the midgut and salivary glands of unfed *I. ricinus* males and females using high-throughput microfluidic real-time PCR. Such an approach is important for enriching the knowledge about pathogen distribution in distinct tick organs which should lead to a better understanding *I. ricinus*-borne disease epidemiology.

Results: *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia spielmanii* and *Borrelia garinii*, were detected in both midgut and salivary glands suggesting that the migration of these pathogens between these two organs might not be triggered by the blood meal. In contrast, *Borrelia afzelii* was detected only in the tick midgut. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* were the most frequently detected in ticks and were found in both males and females in the midgut and salivary glands. In contrast, *Rickettsia felis* was only detected in salivary glands. Finally, *Borrelia miyamotoi* and *Babesia venatorum* were detected only in males in both midguts and salivary glands. Among all collected ticks, between 10–21% of organs were co-infected. The most common bacterial co-infections in male and female midgut and salivary glands were *Rickettsia helvetica* + *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* + *Borrelia lusitaniae*, respectively.

Conclusions: Analysing tick-borne pathogen (TBP) presence in specific tick organs enabled us to (i) highlight contrasting results with well-established transmission mechanism postulates; (ii) venture new hypotheses concerning pathogen location and migration from midgut to salivary glands; and (iii) suggest other potential associations between pathogens not previously detected at the scale of the whole tick. This work highlights the importance of considering all tick scales (i.e. whole ticks vs organs) to study TBP ecology and represents another step towards improved understanding of TBP transmission.

Keywords: Tick-borne pathogens, Pathobiome, Salivary glands, Midgut, *Ixodes ricinus*, Co-infections

Background

Ticks are vectors of a large number of pathogenic microorganisms including bacteria, protozoa and viruses, which cause serious diseases in both humans and animals. *Ixodes ricinus* is the predominant tick species in Europe and is recognised as the primary vector of

infectious diseases in humans, including Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*). Over the past decade, the number of studies characterizing pathogens carried by *I. ricinus* has considerably increased, enriching the wealth of information on *I. ricinus* pathogen composition [1–11]. It is also important to note that *I. ricinus* is regularly found to be co-infected by several pathogenic agents [6, 8, 12–14]. This information is crucial considering that different co-infection combinations in humans and animals are highly likely to alter disease symptoms and severity [15–18]. The vast majority of reports

*Correspondence: thomas.pollet@vet-alfort.fr

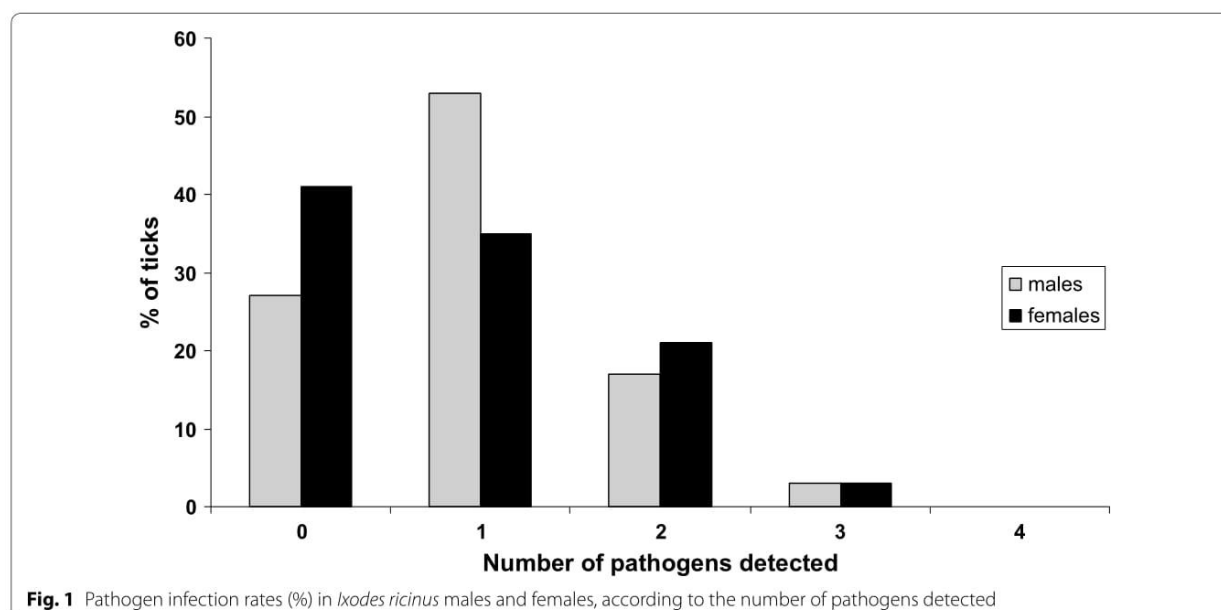
¹ UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, INRA, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France
Full list of author information is available at the end of the article

focusing on pathogen detection in *I. ricinus* have investigated intact bodies of adult ticks or pools of nymphs; however, such methods cannot take into account organ-specific pathogen distribution. This information becomes significant as tick midgut and salivary glands act as specific and distinct barriers to efficient pathogen transmission, and are thus the main determinants influencing the acquisition, maintenance, and transmission of pathogens by ticks. Salivary glands may be co-infected by several different pathogens which can then be transmitted to the vertebrate host during blood-feeding along with salivary secretions [19–21]. Moreover, the tick midgut presents a pivotal microbial entry point and determines pathogen colonization and survival in the tick [22]. The common pathogenic life-cycle within the tick vector starts with ingestion of the infected host blood, pathogen migration through the gut to the haemocoel, transport into and infection of the salivary glands, then transmission to another host during the next blood meal. This pathway can vary depending on the pathogenic agent. For example, *Borrelia* and *Bartonella* species are known to be “stored” in the gut and migrate to the salivary glands during the next blood meal [23], thus suggesting that blood meals trigger this migration from the midgut. In contrast, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species are able to replicate in the midgut and migrate to the salivary glands in unfed ticks [24]. The infection/transmission cycle of *Babesia* species is similar to that of this second group, except that tick tissues are infected by different parasitic developmental stages [25]. While multiple different pathogens are now known to co-infect whole *I. ricinus* ticks, it is

critical to identify pathogen presence at a finer scale in tick organs, to deepen our knowledge on pathogen associations and transmission and offer new insights into TBP and tick-borne diseases. By testing for the presence of 32 TBP species in both midgut and salivary glands of *I. ricinus* males and females using the microfluidic real-time PCR approach, we aimed to detect pathogens in both of these key tick organs intimately involved in pathogen acquisition and transmission. Our study has consequently generated new hypotheses to understand TBP transmission.

Results

Of the collected ticks, 73% of males and 59% of females were infected by at least one pathogen (Fig. 1), and of all *Anaplasma* and *Rickettsia* species tested in the study, only *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia felis* were detected (Fig. 2, Table 1). *Anaplasma phagocytophilum* and *R. helvetica* were detected in both salivary glands and midguts in males and females. *Anaplasma phagocytophilum* was detected in 23% of male organs, and 17% of female midgut and salivary glands (Fig. 2). *Rickettsia helvetica* infection rates reached 27 and 20% in male midgut and salivary glands, respectively, whereas in females, infection rates were 14% in both midgut and salivary glands. Both *A. phagocytophilum* and *R. helvetica* were mostly simultaneously detected in both organs, and were occasionally found in either only the midgut or salivary glands (Table 1). *Rickettsia felis* was detected only in salivary glands in males and females with an infection rate reaching 7% in



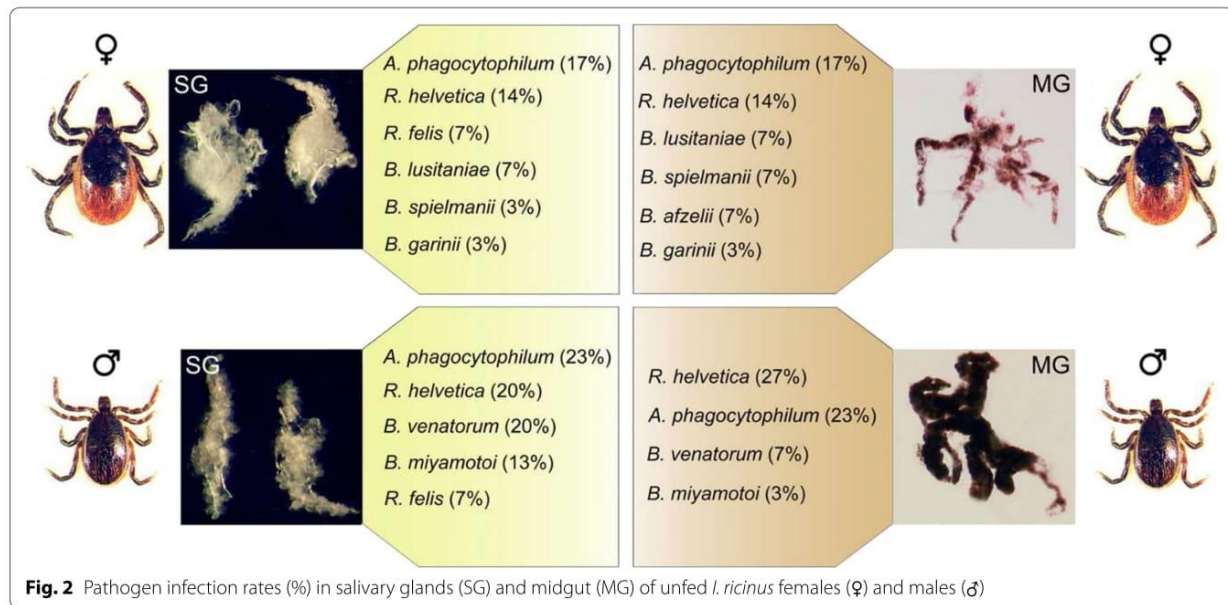


Table 1 Pathogen infection rates (%) in females (F) and males (M) either in salivary glands alone (SG), in midgut alone (MG), or in both organs (SG/MG)

Species	Females			Males		
	SG	MG	SG/MG	SG	MG	SG/MG
<i>A. phagocytophilum</i>	7	7	10	3	3	20
<i>R. helvetica</i>	3	3	10	7	13	13
<i>R. felis</i>	7	nd	nd	7	nd	nd
<i>B. lusitaniae</i>	nd	nd	7	nd	nd	nd
<i>B. spielmanii</i>	nd	3	3	nd	nd	nd
<i>B. afzelii</i>	nd	7	nd	nd	nd	nd
<i>B. garinii</i>	nd	nd	3	nd	nd	nd
<i>B. miyamotoi</i>	nd	nd	nd	10	nd	3
<i>B. venatorum</i>	nd	nd	nd	13	nd	7

Abbreviations: SG, salivary glands; MG, midgut; nd, not detected

this organ. Members of the complex *Borrelia burgdorferi* (s.l.) (*Borrelia lusitaniae*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*) were detected only in females. *Borrelia lusitaniae*, *B. spielmanii* and *B. garinii* were detected in both midgut (7%, 7% and 3%, respectively) and salivary glands (7%, 3% and 3%, respectively) (Fig. 2, Table 1). *Borrelia afzelii* was only detected in 7% of female midguts. It is worth noting that the other members of the complex tested in this study, *B. burgdorferi* (sensu stricto), *Borrelia valaisiana* and *Borrelia bissettii* were not detected in either males or females. *Borrelia miyamotoi* was detected only in males, and mostly in salivary glands (13%), rarely in both organs (3%) and never

in the midgut alone (Fig. 2, Table 1). The other bacterial species tested in this study, *Ehrlichia canis*, “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”, *Bartonella henselae*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* and *Mycoplasma* spp. were not detected in our samples. Apicomplexa were detected in both males and females in both midguts and salivary glands. Among all tested parasites, only *Babesia venatorum* was only detected in males (Fig. 2, Table 1) with 7% infected in both organs, while 13% were infected only in salivary glands.

It is also important to note that 20% of males and 24% of females were co-infected. In males, 10% of midgut and 17% of salivary gland samples were co-infected (Fig. 3). In

females, 17% of midgut and 21% of salivary gland samples were co-infected (Fig. 3). The most common co-infection in both salivary glands and midgut of males and females was *R. helvetica*+*A. phagocytophilum* and *R. helvetica*+*B. lusitaniae*, respectively.

Discussion

Results contrasting with well-established postulates

Several *Borrelia burgdorferi* (*s.l.*) genospecies (*B. lusitaniae*, *B. spielmanii* and *B. garinii*) were detected in ticks which was not surprising as they have already been identified in many European countries and particularly in the Senart Forest [7]. Interestingly, these species were only detected in questing females. This result supports previous findings showing that female ticks in woodland sites were more likely to be infected by *B. burgdorferi* (*s.l.*) than males and nymphs [26] suggesting potential interactions between female ticks and these bacteria. However, the most unexpected results was that we detected these species in both salivary glands and midgut which contrasts with the well-established postulate that *B. burgdorferi* (*s.l.*) genospecies are not found in salivary glands during the initial tick attachment, as they only move rapidly from the gut to the salivary glands at the beginning of the next blood meal [27–29]. Our findings would suggest that some *B. burgdorferi* (*s.l.*) genospecies do not

need a blood meal to start their multiplication and migration from the gut to salivary glands. This hitherto unseen observation on field-collected ticks is completely consistent with the recent experimental results of Sertour et al. [30]. These authors detected *B. burgdorferi* (*s.l.*) strains in female salivary glands prior to blood meals, and also showed that these bacteria could infect mice within 24 h of a tick bite. We also note that in our study, the presence of these different *B. burgdorferi* (*s.l.*) genospecies in salivary glands could also be explained if not all bacteria were transmitted to the host, and that residual bacteria thus remained in salivary glands after moulting. In this case, their persistence in the salivary glands of unfed ticks would suggest that this organ could also be, as for the midgut, a potential reservoir for these spirochetes. Whichever the hypothesis, this result contributes important information to the understanding of tick-borne pathogen transmission as it suggests that several species of the *B. burgdorferi* (*s.l.*) complex could be rapidly transmitted after a tick bite.

Pathogen location and migration in ticks

Interestingly, and as has been previously observed for the other *B. burgdorferi* (*s.l.*) genospecies, *B. afzelii* were only detected in females, and exclusively in the midgut. These results are highly consistent with the study by

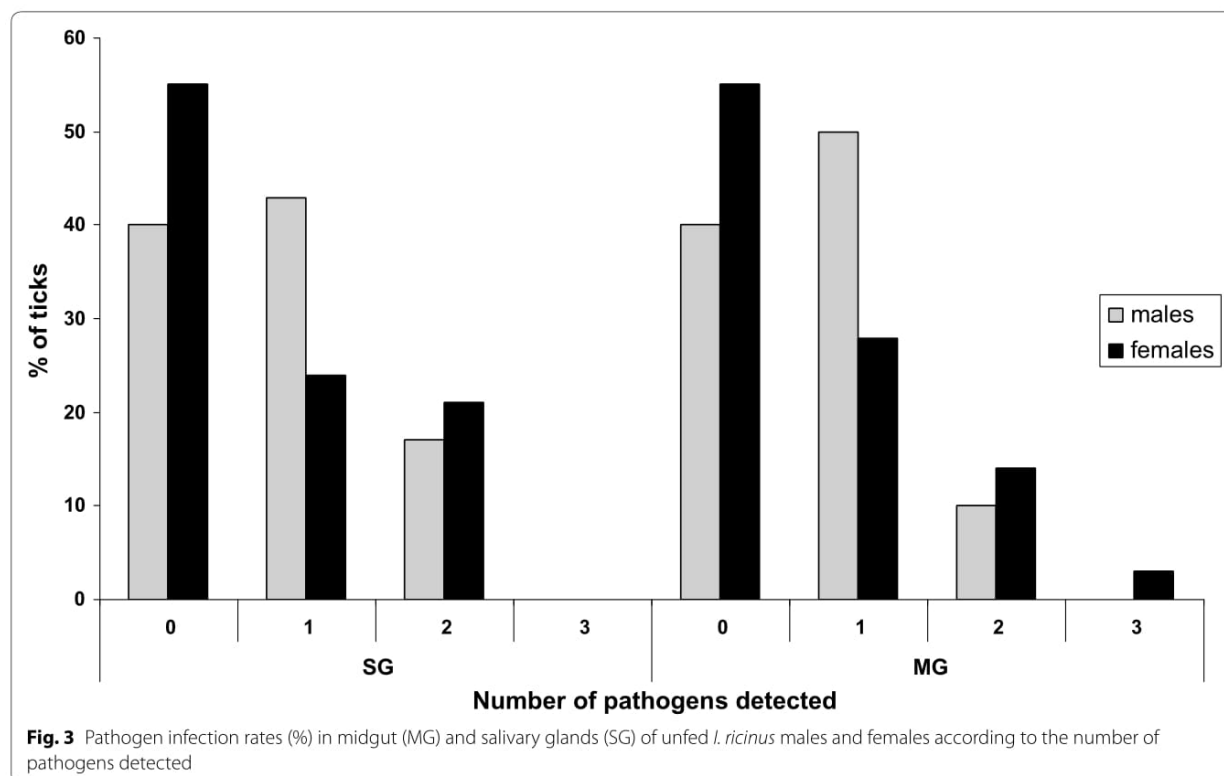


Fig. 3 Pathogen infection rates (%) in midgut (MG) and salivary glands (SG) of unfed *I. ricinus* males and females according to the number of pathogens detected

Pospisilova et al. [31] in which *B. afzelii* were abundant in the guts of unfed *I. ricinus* nymphs, whereas the spirochetes were not present in salivary glands. This result better corresponds to the previously-cited postulate and thus contrasts with the findings discussed for the other *B. burgdorferi* (*s.l.*) genospecies. This result advocates greater caution when generalising transmission mechanisms, which may differ according to *B. burgdorferi* (*s.l.*) genospecies.

We detected *R. helvetica* and *A. phagocytophilum* in males and females in both salivary glands and midgut, and both of these pathogenic agents were the most frequently detected in the collected ticks. Their ubiquity and high proportions in tick organs suggest that they could be well adapted to the different environmental conditions characterising both salivary glands and midgut, and thus may be stronger competitors than other pathogen species. Several studies have shown low *A. phagocytophilum* prevalence or titer in the salivary glands of unfed ticks [32] suggesting that pre-feeding ticks may induce bacterial replication. As “pre-feeding” is probably a rare event in the field, and that it is unlikely that all the questing ticks infected by *A. phagocytophilum* (c.20% of infected ticks) were pre-fed, our results suggest that this bacterium could already be present in the salivary glands of unfed ticks at high infection rates. On the other hand, detecting *R. helvetica* in questing *I. ricinus* is not surprising as their potential presence in this tick species is well established. However, no clear evidence of their transmission by ticks is currently available. Detecting this pathogen in salivary glands is an important epidemiological result as it represents an additional indirect argument that this pathogen could be transmitted by tick bites. For each tick infected by *A. phagocytophilum* and *R. helvetica*, these bacteria were most often simultaneously detected in both midgut and salivary glands and only sometimes in either the midgut or salivary glands alone. These results are important in terms of pathogen transmission as they suggest that not all bacterial cells migrate together from the midgut to salivary glands, and that some infected females (with pathogens only in the midgut) would not necessarily be infectious. In contrast to *R. helvetica*, we only detected *R. felis* in the salivary glands of both males and females. *Rickettsia felis* is known to be mainly transmitted from cat to cat via fleas, with human contamination arising from cat or flea bites. Already detected in engorged *Rhipicephalus sanguineus* [33, 34], two studies have also identified this pathogen in questing *I. ricinus* nymphs ([35], Lejal et al., unpublished data). Detecting this pathogen only in salivary glands could suggest that it does not remain in the midgut and rapidly migrates to the salivary glands. This result also implies that *R. felis* would already be present in salivary glands

at the time of the next blood-feeding and thus might be rapidly transmitted after the tick bite. While the presence and prevalence of this pathogenic agent are rarely investigated in studies dealing with tick-borne pathogens, this new detection in *I. ricinus*, and specifically in the salivary glands, should encourage us to increase our surveillance for this pathogen causing spotted fever in humans. Future investigations should be carried out to clarify the potential vector competence of *I. ricinus* for this pathogen and its role in transmission.

Borrelia miyamotoi of the *Borrelia* recurrent fever group and the parasite *Babesia venatorum* were only detected in males. That they were detected in general was not surprising as they have already been identified in many European countries [4, 6, 10, 36–43]. Interestingly, these pathogenic agents were found in both salivary glands and midgut, suggesting, particularly for *B. miyamotoi*, that migration from midgut to salivary glands is not triggered by a blood meal. Detecting these pathogens in salivary glands is particularly significant in terms of public and animal health. Indeed, in the event that females are infected with these pathogens [6, 44], it seems that both organs could be potential reservoirs for these pathogenic agents, thus potentially facilitating rapid transmission after a tick bite. It will of course be necessary to verify whether the *B. venatorum* parasites residing in salivary glands are actually infectious.

Potential associations between pathogens

We note finally that among all infected ticks, co-infections were observed in 20% of males and 24% of females. At a finer scale, between 10 and 21% of organs were co-infected. With detection tools becoming more sensitive and efficient, tick co-infections are observed with greater frequency [6, 8, 12, 13, 39, 45, 46], suggesting that tick co-infection is the rule rather than the exception [6]. In this study, this hypothesis could also be extended to the level of individual tick organs. These observations, particularly co-infection in salivary glands, are particularly relevant to public health, as the tick disease community is starting to accept that pathogen co-transmission might significantly modify disease symptoms and severity [17, 18, 47]. The most common bacterial co-infection in male salivary glands and midgut was *R. helvetica* + *A. phagocytophilum*, whereas in females, the most frequent association in salivary glands and midgut was *R. helvetica* + *B. lusitaniae*. Our data contrast with previous findings performed in whole ticks demonstrating that the most common *I. ricinus* co-infection was *B. garinii* and *B. afzelii* [6, 8]. Analysing TBP co-infections at a finer scale clearly enables us to highlight other potential associations not detected at the level of the whole tick.

Conclusions

Analysing tick-borne pathogen composition and infection rates at the scale of individual tick organs highlighted (i) some pathogen location results which contrasted with well-established transmission mechanism postulates; (ii) novel findings in terms of pathogen location and migration time from midgut to salivary glands; and (iii) other potential associations between pathogens not detected at the scale of whole ticks. All findings should be confirmed using RNA extracts in order to verify if pathogens are indeed viable and actively replicating, to validate our hypotheses. This study represents another step towards generating improved control methods for tick-borne diseases and highlights the importance of investigating TBP infection at all scales (i.e. whole ticks vs organs) to better understand the ecology and epidemiology of tick-borne diseases. To identify the microbiota influence on pathogens, it would be interesting to characterise the microbiota in both *I. ricinus* male and female salivary glands and midgut to detect potential co-occurrences between pathogens and other microbes.

Methods

Tick collection and organ dissection

A total of 30 female and 30 male questing *I. ricinus* ticks were collected in May 2017 by flagging in the Senart forest (48°40'N, 2°29'E), south of Paris, France. Females and males were placed in separate sampling tubes. Before dissection, all ticks were washed once in 70% ethanol for 5 min and twice in distilled water for 5 min [48]. Tick organs, midgut and salivary glands, were then dissected in ice-cold PBS (pH=7.2). The 120 samples were then conserved at -80 °C until the DNA extraction.

DNA extraction

Tissue samples were individually crushed with glass beads using a Precellys®24 Dual homogeniser (Bertin technologies, Paris, France) at 5500× rpm for 20 s. Genomic DNA was then extracted using a Nucleospin tissue DNA extraction Kit (Macherey-Nagel, Hoerdtt, France). For each sample, total DNA was eluted in 50 µl of rehydration solution and stored at -20 °C until further analysis.

High-throughput screening of bacterial and parasitic tick-borne pathogens

A BioMark™ real-time PCR system (Fluidigm, USA) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR for the most common bacterial and parasitic TBP species known to circulate or emerge in Europe. For bacteria, seven species belonging to the Lyme spirochete group *Borrelia burgdorferi* (*s.l.*) were tested: *Borrelia burgdorferi*

(*s.s.*), *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia spielmannii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* and *Borrelia bissettii*. We also tested one species belonging to the *Borrelia* recurrent fever group, *Borrelia miyamotoi*; six species of *Anaplasma* (*Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma centrale* and *Anaplasma bovis*); six species of *Rickettsia* from the spotted fever group (*Rickettsia felis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia massiliae* and *Rickettsia aeschlimannii*); *Ehrlichia canis*, “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis”, *Bartonella henselae*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* and *Mycoplasma* spp. For apicomplexan parasites, seven species of *Babesia*: *Babesia canis*, *Babesia ovis*, *Babesia microti*, *Babesia bovis*, *Babesia caballi*, *Babesia venatorum* and *Babesia divergens*, *Theileria* spp. and *Hepatozoon* spp. were tested. Extraction and amplification controls were included using DNA extracts from *I. ricinus* and *E. coli* respectively.

As previously described in Moutailler et al. [6], a DNA pre-amplification step was performed for each sample in a final volume of 5 µl containing 2.5 µl of TaqMan PreAmp Master Mix (2×), 1.2 µl of the pooled primer mix (0.2×) and 1.3 µl of tick DNA, with one cycle at 95 °C for 10 min, 14 cycles at 95 °C for 15 s, followed by 4 min at 60 °C. Following pre-amplification, qPCRs were performed using FAM- and black hole quencher (BHQ1)-labelled TaqMan probes [48] with TaqMan Gene Expression Master Mix in accordance with manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Illkirch, France). Thermal cycling conditions were as follows: 95 °C for 5 min, 45 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s and 40 °C for 10 s. Data were acquired on the BioMark™ Real-Time PCR system and analysed using the Fluidigm Real-Time PCR Analysis software to obtain crossing point (CP) values.

Abbreviation

TBP: tick-borne pathogens.

Acknowledgements

We thank the VECTOTIQ team members in the BIPAR unit for stimulating discussion and support.

Funding

The present study was funded by the Animal Health Department of the French National Institute for Agricultural Research (France).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: TP and MVT. Performed the experiments: EJ, LS and TP. Analysed the data: EJ, TP and SM. Wrote the paper: EJ, SM, LS, MVT and TP. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹ UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, INRA, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France. ² INRA, Animal Health Department, Nouzilly, France.

Received: 7 January 2019 Accepted: 27 March 2019

Published online: 02 April 2019

References

- Reis C, Cote M, Paul REL, Bonnet S. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:907–16.
- Estrada-Peña A, Ortega C, Sanchez N, DeSimone L, Sudre B, Suk JE, et al. Correlation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks with specific abiotic traits in the western Palearctic. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:3838–45.
- Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, Maassen CB, Giessen JVD, Takken W, et al. Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:36.
- Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, Velhin S, Hubschen JM, Ignatyev G, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS ONE.* 2013;8:e54476.
- Jahfari S, Hofhuis A, Fonville M, van der Giessen J, van Pelt W, Sprong H. Molecular detection of tick-borne pathogens in humans with tick bites and erythema migrans, in the Netherlands. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0005042.
- Moutailler S, Valiente Moro C, Vaumourin E, Michelet L, Tran FH, et al. Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004539.
- Marchant A, Le Coupanec A, Joly C, Perthame E, Sertour N, Garnier M, et al. Infection of *Ixodes ricinus* by *Borrelia burgdorferi sensu lato* in peri-urban forests of France. *PLoS One.* 2017;12:e0183543.
- Raileanu C, Moutailler S, Pavel I, Porea D, Mihalca AD, Savuta G, et al. *Borrelia* diversity and co-infection with other tick-borne pathogens in ticks. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:36.
- Schotta AM, Wijnveld M, Stockinger H, Stanek G. Approaches for reverse line blot based detection of microbial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria and impact on chosen method. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83:e00489–17.
- Szekeres S, Lügner J, Fingerle V, Margos G, Földvari G. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in questing ticks from a recreational coniferous forest of East Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8:922–7.
- Chvostac M, Spitalska E, Vavlar R, Vaculova T, Minichova L, Derdakova M. Seasonal patterns in the prevalence and diversity of tick-borne *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in an urban temperate forest in south-western Slovakia. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15:994.
- Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis HJ, et al. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia* sp. *Vet Res.* 2005;36:79–87.
- Andersson M, Bartkova S, Lindestad O, Raberg L. Co-infection with "*Candidatus* Neohrlichia mikurensis" and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in southern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:438–42.
- Berggoetz M, Schmid M, Ston D, Wyss V, Chevillon C, Pretorius AM, et al. Protozoan and bacterial pathogens in tick salivary glands in wild and domestic animal environments in South Africa. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:176–85.
- Grunwaldt E, Barbour AG, Benach JL. Simultaneous occurrence of babesiosis and Lyme disease. *N Engl J Med.* 1983;308:1166.
- Golightly LM, Hirschhorn LR, Weller PF. Fever and headache in a splenectomized woman. *Rev Infect Dis.* 1989;11:629–37.
- Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. Co-infections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:708–27.
- Diuk-Wasser MA, Vannier E, Krause PJ. Coinfection by *Ixodes* tick-borne pathogens: ecological, epidemiological, and clinical consequences. *Trends Parasitol.* 2016;32:30–42.
- Santos AS, Bacellar F, Santos-Silva M, Formosinho P, Gracio AJ, Franca S. Ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002;2:165–77.
- Futse JE, Ueti MW, Knowles DP, Palmer GH. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector–pathogen interaction. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3829–34.
- Popov VL, Korenberg EI, Nefedova VV, Han VC, Wen JW, Kovaleskii YV, et al. Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with *Rickettsia*, *Borrelia*, and a flavivirus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:699–716.
- Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J, Pan J, et al. Gut microbiota of the tick *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochetes. *Cell Host Microbe.* 2014;15:58–71.
- Piesman J, Schneider BS. Dynamic changes in Lyme disease spirochetes during transmission by nymphal ticks. *Exp Appl Acarol.* 2002;28:141–5.
- Ueti MW, Reagan JO, Knowles DP, Scoles GA, Shkap V, Palmer GH. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun.* 2007;75:2959–64.
- Hajdusek O, Sima R, Ayllon N, Jalovecka M, Perner J, de la Fuente J, et al. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:26.
- Halos L, Bord S, Cotte V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, et al. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:4413–20.
- Des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford KC, Fish D. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis.* 2001;183:773–8.
- Piesman J, Schneider BS, Zeidner NS. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4145–8.
- Kung F, Anguita J, Pal U. *Borrelia burgdorferi* and tick proteins supporting pathogen persistence in the vector. *Future Microbiol.* 2013;8:41–56.
- Sertour N, Cotté V, Garnier M, Malandrin L, Ferquel E, Choumet V. Infection kinetics and tropism of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in mouse after natural (via ticks) or artificial (needle) infection depends on the bacterial strain. *Front Microbiol.* 2018;9:1722.
- Pospisilova T, Urbanova V, Hes O, Kopacek P, Hajdusek O, Sima R. Tracking *Borrelia afzelii* from *Ixodes ricinus* nymphs to mice suggests a direct gut to mouth route of Lyme disease transmission. *BioRxiv.* 2018;67:78. <https://doi.org/10.1101/316927>.
- Alberdi MP, Walker AR, Paxton EA, Sumption KJ. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. *Vet Parasitol.* 1998;78:203–13.
- Oliveira KA, Oliveira LS, Dias CC, Silva A, Almeida MR, Almeda G, et al. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian spotted fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:191–4.
- Abarca K, Lopez J, Acosta-Jamett G, Martinez-Valdebenito C. *Rickettsia felis* in *Rhipicephalus sanguineus* from two distant Chilean cities. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:607–9.

35. Vayssier-Taussat M, Moutailler S, Michelet L, Devillers E, Bonnet S, Cheval J, et al. Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe. *PLoS One*. 2013;8:e81439.
36. Fraenkel CJ, Garpmo U, Berglund J. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3308–12.
37. Richter D, Schlee DB, Matuschka FR. Relapsing fever like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:697–701.
38. Geller J, Nazarova L, Katargina O, Jarvekulg L, Fomenko N, Golovljova I. Detection and genetic characterization of relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Estonian ticks. *PLoS One*. 2012;7:e51914.
39. Cosson JF, Michelet L, Chotte J, Le Naour E, Cote M, Devillers E, et al. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit Vectors*. 2014;7:233.
40. Sakakibara K, Sen E, Sato K, Kawabata H, Ohashi N, Masuzawa T. Detection and characterization of the emerging relapsing fever pathogen, *Borrelia miyamotoi*, from the *Ixodes ricinus* tick in the rural Trakya region of north-western Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016;16:797–9.
41. Paul REL, Cote M, Le Naour E, Bonnet S. Environmental factors influencing tick densities over seven years in a French suburban forest. *Parasit Vectors*. 2016;9:309.
42. Oechslin CP, Heutschi D, Lenz N, Tischhauser W, Peter O, Rais O, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks in urban and suburban areas of Switzerland. *Parasit Vectors*. 2017;10:558.
43. Wagemaker A, Jahfari S, de Wever B, Spanjaard L, Starink MV, de Vries HJC, et al. *Borrelia miyamotoi* in vectors and hosts in the Netherlands. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;8:370–4.
44. Diaz P, Arnal JL, Remesar S, Perez-Creo A, Venzal JM, Vasquez-Lopez ME, et al. Molecular identification of *Borrelia* spirochetes in questing *Ixodes ricinus* from north-western Spain. *Parasit Vectors*. 2017;10:615.
45. Schicht S, Junge S, Schnieder T, Strube C. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and coinfection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the hard tick *Ixodes ricinus* in the city of Hanover (Germany). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11:1595–7.
46. Castro LR, Gabrielli S, Iori A, Cancrini G. Molecular detection of *Rickettsia*, *Borrelia*, and *Babesia* species in *Ixodes ricinus* sampled in northeastern, central, and insular areas of Italy. *Exp Appl Acarol*. 2015;66:443–52.
47. Krause PJ, Telford SR 3rd, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA*. 1996;275:1657–60.
48. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M, et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:103.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



CHAPITRE II : Dynamique du microbiote et interactions microbiennes

Comme exposé dans la revue bibliographique, outre les agents pathogènes, les tiques sont également porteuses d'une grande diversité de micro-organismes symbiotiques ou commensaux, l'ensemble constituant leur microbiote au sein duquel peuvent s'établir des interactions positives, négatives ou neutres. Au cours des dix dernières années, plusieurs études ont identifié ce microbiote et ont permis de montrer des différences de composition ou diversité de ce dernier, en fonction de l'espèce de tique considérée, sa stase, sa localisation, la prise de repas sanguin mais aussi en fonction de la présence d'agents pathogènes (Carpi *et al.*, 2011; Hawlena *et al.*, 2013; Narasimhan *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2014; Williams-Newkirk *et al.*, 2014; Rynkiewicz *et al.*, 2015; Van Treuren *et al.*, 2015; Estrada-Peña *et al.*, 2016; Gall *et al.*, 2016; Trout Fryxell and DeBruyn, 2016; Abraham *et al.*, 2017; Gurfield *et al.*, 2017; René-Martellet *et al.*, 2017; Portillo *et al.*, 2019). L'étude de ce microbiote chez certaines espèces de tiques a également permis de mettre en évidence l'importance de certains de ses membres dans la physiologie et l'activité des tiques (Zhong *et al.*, 2007; Herrmann and Gern, 2010; Guizzo *et al.*, 2017; Duron *et al.*, 2018). Toutefois, peu d'informations rendent compte aujourd'hui des schémas temporels du microbiote des tiques et des facteurs susceptibles d'influencer ces schémas. La diversité et la composition de ce microbiote varient-elles au cours de l'année ? Si oui, ces schémas sont-ils redondants d'une année à l'autre ? Dans ce chapitre, j'avais pour principaux objectifs de caractériser la dynamique temporelle du microbiote d'*I. ricinus* et de mettre en évidence des potentielles interactions entre les différents membres de cette communauté microbienne, et plus particulièrement entre certains de ces membres et les agents pathogènes. Toutefois, parmi toutes les études citées précédemment, rares sont celles qui mentionnent la réalisation de témoins négatifs lors du processus permettant de distinguer les membres de la communauté microbienne appartenant « réellement » au microbiote de tiques, des contaminants. Or, le taux important de contamination, plus particulièrement dans les échantillons de faible biomasse, comme c'est le cas des tiques, a récemment été mis en évidence par Salter *et al.* (2014). Dans ce contexte, j'ai donc, avant tout, mis au point un processus de nettoyage de notre jeu de données, basé sur l'étude de la composition de la communauté microbienne d'un

grand nombre de témoins négatifs effectués tout au long du processus de traitement des échantillons (broyat, extraction, amplification).

Ce second chapitre est donc divisé en trois parties. Dans la première, je présenterai la méthode de séquençage haut débit utilisée pour étudier le microbiote (séquençage du gène de l'ARN 16S) ainsi que les raisons qui m'ont poussé à choisir cette méthode. Puis dans une seconde partie, je vous présenterai une des étapes nécessaires de mise au point méthodologique, à savoir l'identification des séquences contaminantes, permise grâce à la réalisation de multiple témoins négatifs, et le nettoyage du jeu de données en conséquence. Enfin, je vous présenterai les résultats obtenus, à partir de ce jeu de données « nettoyé », quant à la composition et la dynamique du microbiote *d'I. ricinus*, ainsi que les liens observés entre les différents membres de ce microbiote.

I. Méthode d'étude : Amplification et séquençage du gène de l'ARN 16s par la technique Illumina

Le principe de cette méthode repose sur l'amplification par PCR d'un gène cible conservé dans le règne du vivant et dont la séquence comprend des zones suffisamment variables pour permettre la distinction et l'identification des différents micro-organismes présents, comme c'est le cas du gène de l'ARN 16s (**Figure 14**). En effet, ce gène est composé de neuf régions hypervariables, séparées par des régions conservées, qu'il sera donc possible de cibler avec des amorces spécifiques pour réaliser l'étape de PCR et ainsi amplifier la région d'intérêt chez de multiple micro-organismes.

Figure 14: Régions variables de l'ARN 16s d'*Escherichia coli*.
Figure adaptée de : http://themicrobiome.com/media/16S_viewer.cfm.

Après amplification de la région d'intérêt, les amplicons obtenus sont ensuite séquencés. Il existe différentes technologies de séquençage (Illumina, Pyroséquençage 454, Ion torrent, SOLiD, PacBio...). Dans notre cas, nous avons utilisé la technologie Illumina (2x250pb) dont le principe repose sur l'incorporation séquentielle de nucléotides liés à une étiquette fluorescente (différente selon la base incorporée), permettant ainsi, au fur et à mesure de chaque incorporation, de déterminer la composition de la séquence (**Figure 15**). Ce choix a été fait car cette approche permet d'obtenir un très grand nombre de séquences et ainsi une profondeur de séquençage suffisante pour caractériser le plus précisément possible la diversité et la composition du microbiote. Cette méthode est peu coûteuse, a une plus grande facilité de mise en œuvre, et permet surtout de s'affranchir de l'ADN de l'hôte eucaryote pour n'amplifier que l'ADN procaryote d'intérêt, qualité cruciale dans l'étude du microbiote des tiques. Notons toutefois que l'utilisation de la chimie Illumina 2x250pb ne permet malheureusement pas d'attribuer une affiliation taxonomique jusqu'à l'espèce, la taille des amplicons n'étant pas suffisamment grande et discriminante.

Le multiplexage des échantillons, c'est-à-dire, l'utilisation d'amorces présentant différents tags (courte séquence nucléotidique de composition connue) lors de la PCR précédent l'étape de séquençage, va permettre l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons par cette technique. Les séquences appartenant à ces échantillons leurs sont attribuées, après l'étape de séquençage, grâce à la reconnaissance des tags spécifiques à chaque échantillon. Pour chacun des séquençages réalisés au cours de ma thèse, j'ai moi-même préparé mes bibliothèques (amplification avec amorces taguées, purifications, dosages et pool des échantillons).

Après l'étape de séquençage, les séquences obtenues (forward et reverse) sont assemblées et filtrées (taille attendue, présence des amorces, absence de N nucléotides) permettant ainsi d'obtenir une multitude de séquences. Ces séquences sont ensuite groupées en fonction de leurs similitudes pour générer ce que l'on appelle des unités taxonomiques opérationnelles ou OTUs (Operational Taxonomique Units). Enfin, après l'élimination des séquences chimériques (erreur lors de la PCR conduisant à l'assemblage de deux séquences distinctes) et rares, les différentes OTUs sont affiliées taxonomiquement.

Figure 15: Les étapes du séquençage Illumina.

Source illustrations :

https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf

1) Des adaptateurs, nécessaires aux étapes du séquençage sont fixés à chaque extrémités des amplicons. 2) Les amplicons sont fixés à la *flow cell*. 3) La formation de ponts d'amplification est permise grâce à la présence des adaptateurs sur la *flow cell*. La réalisation de multiples amplifications va permettre la formation de cluster de séquences sur la *flow cell*, chacun étant composé d'une séquence unique correspondant à la séquence d'origine initialement fixée. 4) Le séquençage est permis par l'addition de nucléotides terminateurs marqués par différent fluorochromes. À chaque incorporation, la fluorescence est enregistrée, puis une réaction enzymatique va permettre le clivage du dernier nucléotide incorporé, permettant ainsi l'incorporation d'un nouveau nucléotide etc.

II. Contrôles négatifs et élimination des séquences contaminantes

Cette étude a fait l'objet d'un article scientifique soumis dans la revue *Frontiers in Microbiology* :

Lejal E, Estrada-Peña A, Cosson JF, Marsot M, Rué O, Midoux C, Mariadassou M, Vayssier-Taussat M, Pollet T (2019). Taxon appearance from extraction and amplification steps demonstrates the value of multiple controls in tick microbiome analysis. *bioRxiv* doi:<https://doi.org/10.1101/714030>. Submitted to *Frontiers in Microbiology*.

1. Présentation générale de l'étude et principaux résultats

A. Contexte de l'étude

L'avènement des technologies de séquençage à haut débit il y a une quinzaine d'années, a permis de mettre en évidence l'existence d'une diversité microbienne jusqu'alors non soupçonnée, car principalement constituées de micro-organismes non cultivables. Devenues de plus en plus sensibles et efficaces, et de moins en moins chères, leur utilisation a gagné un grand nombre de domaines, y compris ceux traitant avec des échantillons de faible biomasse, comme c'est le cas du microbiote des tiques. Cependant, de plus en plus d'études rapportent la présence de séquences contaminantes, qui pourraient impacter significativement les résultats obtenus, et ce, plus particulièrement dans le cas des études réalisées sur des échantillons de faible biomasse (Salter *et al.*, 2014; Galan *et al.*, 2016; Glassing *et al.*, 2016).

Qu'en est-il du microbiote des tiques ? Rares sont les études qui mentionnent la réalisation de témoins négatifs lors des étapes de broyat, d'extraction ou d'amplification de l'ADN lors de l'étude du microbiote. Par ailleurs, peu prennent la peine d'envoyer ces témoins au séquençage avec leur échantillons, pour ensuite en soustraire les potentiels contaminants (Hawlena *et al.*, 2013; Rynkiewicz *et al.*, 2015; René-Martellet *et al.*, 2017; Sperling *et al.*, 2017; Estrada-Peña *et al.*, 2018b). L'objectif de cette étude était donc de réaliser un panel de contrôles négatifs lors des différentes étapes du procédé suivi par les échantillons afin d': 1) Évaluer l'étendue de cette contamination ; 2) Identifier les séquences contaminantes

caractéristiques de chaque étape du processus suivi par les échantillons (broyat, extraction, amplification) ; 3) Éliminer ces séquences du jeu de données.

B. Méthodes

Nous avons réalisé plus d'une quarantaine de témoins négatifs tout au long du processus suivi par nos échantillons, aux étapes de broyat des tiques, d'extraction et d'amplification de l'ADN. Ces témoins ont ensuite été analysés par séquençage en même temps que nos échantillons (32 mâles, 35 femelles et 557 nymphes) issus des collectes effectuées mensuellement pendant les trois ans (avril 2014 à mai 2017) et pour la plupart identiques à ceux utilisés pour l'étude de la dynamique des agents pathogènes (chapitre I) ; quoique leur nombre ait été quelque peu réduit (ce choix sera décrit dans la partie III, qui décrira la dynamique du microbiote).

C. Résultats principaux et discussion

À l'issue du séquençage, un nombre significatif de séquences a été détecté dans ces témoins négatifs, allant d'environ 1 100 à 13 200 en moyenne selon la catégorie de contrôle. Les principales OTUs détectées dans ces contrôles appartenaient aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Halomonas*, *Shewanella*, *Tepidimonas*, *Esherichia-Shigella*, *Photobacterium*, *Polaromonas*, *Deinococcus* and *Reyranella*, ainsi que deux OTUs appartenant à la famille des Enterobacteriaceae mais multi-affiliées à l'échelle du genre, et une OTU multi-affiliée appartenant à la classe des Gammaproteobacteria. 50,9% des séquences détectées dans l'ensemble des échantillons correspondaient à des séquences caractéristiques des témoins négatifs, plus particulièrement les témoins de broyat et d'extraction, et ont été identifiés comme des contaminants. Il semble que l'étape d'extraction soit celle à laquelle le plus de contamination soit générée, comme déjà observé par Salter *et al.* (2014).

L'impact de cette contamination était particulièrement conséquent chez les échantillons de nymphes et mâles. En effet, plus de 75% d'entre eux présentaient des taux de contamination supérieurs à 50%, tandis que chez la plupart des femelles (65.7%), ces taux de contamination n'excédaient pas 20%. Notons que plusieurs études dans la littérature ont observé une plus faible diversité microbienne chez les femelles en comparaison des mâles ou des nymphes. Or, ces études ne mentionnaient pas la réalisation de témoins négatifs ni le

nettoyage des données. Ainsi, des différences de taux de contamination entre les catégories d'échantillons pourraient générer des biais dans la comparaison de la diversité microbienne entre ces derniers. En effet, l'estimation de plusieurs indices de diversité microbienne (observée, Shannon, Simpson et phylogénique) dans les échantillons avant et après nettoyage nous a permis de montrer des différences significatives pour plusieurs de ces indices selon la catégorie d'échantillon testée. De plus, la comparaison de la diversité observée entre les catégories d'échantillons n'était plus significative après nettoyage du jeu de données mettant ainsi en évidence l'impact que peut avoir la contamination sur l'analyse et l'interprétation des résultats dans le contexte de l'étude du microbiote des tiques.

Cette étude a donc permis de souligner l'importance de réaliser des témoins négatifs et de les séquencer pour ensuite nettoyer le jeu de données et ainsi éviter une surestimation de la diversité et de la composition des communautés microbiennes de tiques.

2. Article III : Soumis dans la revue Frontiers in Microbiology

bioRxiv preprint first posted online Jul. 24, 2019; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/714030>. The copyright holder for this preprint (which was not peer-reviewed) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under a [CC-BY-NC-ND 4.0 International license](#).

1 **Taxon appearance from extraction and amplification steps demonstrates the value** 2 **of multiple controls in tick microbiota analysis**

3 Emilie Lejal¹, Agustín Estrada-Peña², Maud Marsot³, Jean-François Cosson¹, Olivier Rué⁴, Mahendra
4 Mariadassou⁴, Cédric Midoux^{4,5}, Muriel Vayssier-Taussat⁶ and Thomas Pollet^{1*}

5

6 ¹UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, INRA, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université
7 Paris-Est, Maisons-Alfort, France

8 ²Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

9 ³ANSES, University Paris-Est, Laboratory for Animal Health, Epidemiology Unit, Maisons-Alfort, France

10 ⁴MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

11 ⁵Irstea, UR PROSE, Antony, France

12 ⁶INRA, Animal health department, Nouzilly, France

13 *** Correspondence:**

14 Dr Thomas Pollet

15 thomas.pollet@inra.fr

16 **Abstract**

17 **Background:** The development of high throughput sequencing technologies has substantially
18 improved analysis of bacterial community diversity, composition, and functions. Over the last decade,
19 high throughput sequencing has been used extensively to identify the diversity and composition of
20 tick microbial communities. However, a growing number of studies are warning about the impact of
21 contamination brought along the different steps of the analytical process, from DNA extraction to
22 amplification. In low biomass samples, e.g. individual tick samples, these contaminants may represent
23 a large part of the obtained sequences, and thus generate considerable errors in downstream
24 analyses and in the interpretation of results. Most studies of tick microbiota either do not mention
25 the inclusion of controls during the DNA extraction or amplification steps, or consider the lack of an
26 electrophoresis signal as an absence of contamination. In this context, we aimed to assess the
27 proportion of contaminant sequences resulting from these steps. We analyzed the microbiota of
28 individual *Ixodes ricinus* ticks by including several categories of controls throughout the analytical
29 process: crushing, DNA extraction, and DNA amplification.

30 **Results:** Controls yielded a significant number of sequences (1,126 to 13,198 mean sequences,
31 depending on the control category). Some operational taxonomic units (OTUs) detected in these
32 controls belong to genera reported in previous tick microbiota studies. In this study, these OTUs
33 accounted for 50.9% of the total number of sequences in our samples, and were considered
34 contaminants. Contamination levels (i.e. the percentage of sequences belonging to OTUs identified
35 as contaminants) varied with tick stage and gender: 76.3% of nymphs and 75% of males demonstrated
36 contamination over 50%, while most females (65.7%) had rates lower than 20%. Contamination
37 mainly corresponded to OTUs detected in crushing and DNA extraction controls, highlighting the
38 importance of carefully controlling these steps.

39 **Conclusion:** Here, we showed that contaminant OTUs from extraction and amplification steps can
40 represent more than half the total sequence yield in sequencing runs, and lead to unreliable results
41 when characterizing tick microbial communities. We thus strongly advise the routine use of negative
42 controls in tick microbiota studies, and more generally in studies involving low biomass samples.

43 **Keywords:** Contaminant, Low biomass sample, Tick, Microbiota, High-throughput sequencing.

44 Introduction

45 Analysis of microbial community composition by 16S tag sequencing represents a powerful
46 tool commonly used to evaluate the prokaryotic diversity in many ecosystems. Thanks to high-
47 throughput sequencing approaches, it is now feasible to identify microbiota with high coverage and
48 reveal the exceptional and complex microbial diversity of environments ranging from the wide ocean
49 (Sogin *et al.*, 2006; Hamdan *et al.*, 2013) to small arthropods (Degli Esposti and Martinez Romero,
50 2017; Estrada-Peña *et al.*, 2018). With the constant improvement of sensitivity associated with its
51 decreasing cost, 16S tag sequencing has spread to many areas, including those dealing with low
52 biomass communities such as tick microbiota.

53 Despite the limitation induced by low biomass, a high number of tick microbiota studies are
54 focusing on individual ticks (Lalzar *et al.*, 2012; Hawlena *et al.*, 2013; Rynkiewicz *et al.*, 2015; Van
55 Treuren *et al.*, 2015; Gall *et al.*, 2016; Khoo *et al.*, 2016; Kwan *et al.*, 2017; Swei and Kwan, 2017;
56 Estrada-Peña *et al.*, 2018) or even on individual or pooled tick organs (Andreotti *et al.*, 2011;
57 Budachetri *et al.*, 2014; Narasimhan *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2014; Clayton *et al.*, 2015; Gall *et al.*, 2016;
58 Zolnik *et al.*, 2016; Abraham *et al.*, 2017). The results obtained from these studies have improved our
59 knowledge of tick microbiota, while demonstrating links between its composition and several factors,
60 such as tick stages and gender (Lalzar *et al.*, 2012; Van Treuren *et al.*, 2015; Zolnik *et al.*, 2016; Swei
61 and Kwan, 2017), organ of origin (Zolnik *et al.*, 2016), living environment (Carpi *et al.*, 2011; Zolnik *et al.*,
62 2016; Estrada-Peña *et al.*, 2018), host blood meal (Swei and Kwan, 2017), or tick engorgement
63 (Moreno *et al.*, 2006; Heise *et al.*, 2010; Narasimhan *et al.*, 2014). The presence of tick-borne
64 pathogens has also been demonstrated to be related to differences in tick microbiota composition
65 and diversity (Narasimhan *et al.*, 2014; Gall *et al.*, 2016; Abraham *et al.*, 2017). The continuous
66 improvements in our knowledge, and in particular the assessment of potential links between tick-
67 borne pathogens and particular microbiota members, require us to continue performing analyses on
68 individual ticks, or even better, on individual tick organs.

69 Several potential biases, inherent to the PCR amplification (chimeric sequences) or sequencing
70 steps (random sequencing errors), are now well known (Galan *et al.*, 2016), and pipelines have been
71 developed to detect and remove these errors during the sequence analysis. However, several studies
72 have begun to warn scientists about the potential distortion of results due to contamination from the

73 extraction/amplification steps or from the environment during sample processing (Salter *et al.*, 2014;
74 Weiss *et al.*, 2014; Narasimhan and Fikrig, 2015; Galan *et al.*, 2016; Glassing *et al.*, 2016; Knight *et al.*,
75 2018). This potential contamination is able to significantly modify results concerning microbe
76 diversity and composition, particularly in the case of low biomass samples, and can have serious
77 consequences on the interpretation of results. For example, while investigating 16s rRNA gene
78 profiles from nasopharyngeal swabs regularly sampled from a cohort of children from 1 to 24 months,
79 Salter *et al.* (2014) demonstrated that the apparent clustering of samples by age, observed by
80 principal coordinate analysis, in fact corresponded to the commercial kit used to perform the DNA
81 extraction of these samples. While studying the influence of laboratory processing on diluted
82 samples, these authors also observed that the lower the initial biomass of samples, the higher the
83 proportion of contaminants associated with the kits or the environment. In the context of tick
84 microbiota studies, performing using negative controls would therefore be essential to detect
85 potential contamination, and efficiently distinguish this contamination from genuine tick microbial
86 communities. On the basis of an exhaustive review of the scientific literature, it is very clear that
87 routine multiple control analyses (extraction and PCR negative controls) are not considered at their
88 true value, and are only rarely implemented in tick microbial community analyses (Hawlana *et al.*,
89 2013; Gofton *et al.*, 2015; Rynkiewicz *et al.*, 2015; René-Martellet *et al.*, 2017; Sperling *et al.*, 2017;
90 Estrada-Peña *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2019). In this context, we performed a 16s rRNA gene
91 sequencing analysis on individual ticks (females, males and nymphs) considering concomitantly
92 several negative controls at each step of the process, prior to the sequencing run (tick crushing, DNA
93 extraction and amplification).

94 **Methods**

95 **Tick collection and sample selection**

96 Questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults were collected for three years by dragging (from
97 April 2014 to May 2017) in the Sénart forest in the south of Paris. More details on the sampling
98 location and design, and tick collection, are available in Lejal *et al.* (2019). After morphological
99 identification, ticks were stored at -80°C until further analysis.

100

101 **Tick washing, crushing, and DNA extraction**

102 Ticks were first washed once in ethanol 70% for 5 minutes and rinsed twice in sterile MilliQ
103 water for 5 minutes each time. Ticks were then individually crushed in 375 µL of Dulbecco's Modified
104 Eagle Medium with decomplexed fetal calf serum (10%) and six steel beads using the
105 homogenizer Precellys®24 Dual (Bertin, France) at 5,500 rpm for 20 seconds. DNA extraction was
106 performed on 100 µL of tick crushing, using the NucleoSpin® Tissue DNA extraction kit (Macherey-
107 Nagel, Germany). For these previous steps, sterile tubes and filter tips were used on a dedicated area
108 for DNA extraction. Bench and materials were decontaminated with DNA remover (Molecular
109 BioProducts, San Diego, CA, USA) before and after each use. Each time a tick crushing or DNA
110 extraction was performed, a crushing or extraction control was added for the corresponding step.

111

112 **DNA amplification and multiplexing**

113 In total, 32 males, 35 females, and 557 nymphs were subjected to sequencing analysis. DNA
114 amplifications were performed on the V4 region of the 16s rRNA gene using the primer pair used by
115 Galan *et al.* (2016) (16S-V4F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3' and 16S-V4R: 5'-
116 GGACTACHVGGGTWTCTAATCC-3'), producing a 251 bp amplicon. This primer pair was chosen for its
117 ability to specifically amplify prokaryotic DNA (86% or 95% of referenced bacterial DNA in the Silva
118 database, and 52.3% or 93% of Archaeal DNA, when considering 0 or 1 mismatch, respectively). This
119 characteristic is crucial in the context of tick microbiota analysis, due to the high amount of tick DNA

120 compared to prokaryotic DNA. An 8 bp-index was added to the forward and reverse primers. The
121 individual amplification of each sample was performed using a combination of 22 and 32 index-tagged
122 forward and reverse primers, allowing for amplification and multiplexing of a maximum of 704
123 samples that can be loaded together on an Illumina MiSeq flow cell. Amplification and multiplexing
124 steps were performed under a sterile hood, decontaminated before and after use with DNA remover
125 and UVs, using tube strips with individual caps to prevent cross-contamination. All the PCR
126 amplifications were carried out using the Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase amplification kit
127 (Thermo Scientific, Lithuania). For each sample, 5 μ L of DNA extract were amplified in a 50 μ L final
128 reaction volume, containing 1X Phusion HF buffer, 0.2 μ M of dNTPs, 0.2 U/mL of Phusion DNA
129 polymerase, and 0.35 μ M of forward and reverse primer. The following thermal cycling procedure
130 was used: initial denaturation at 98°C for 30 s, 35 cycles of denaturation at 98°C for 10 s, annealing
131 at 55°C for 30 s, followed by extension at 72°C for 30 s. The final extension was carried out at 72°C
132 for 10 minutes. Amplification step was performed on a peqSTAR 2x thermocycler (PEQLAB, Germany).
133 For each PCR run, negative controls were performed by using the reaction mixture without template,
134 but using ultrapure water (Invitrogen, United Kingdom). PCR products were checked on 1.5% agarose
135 gels.

136

137 **DNA purification, quantification, and pooling**

138 Amplicons were cleaned and quantified using a SequalPrep normalization plate kit (Invitrogen,
139 USA), and a Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kit (Invitrogen, USA), respectively. Amplicons and
140 controls were pooled at equimolar concentrations and sent to the sequencing platform (GenoScreen,
141 France).

142

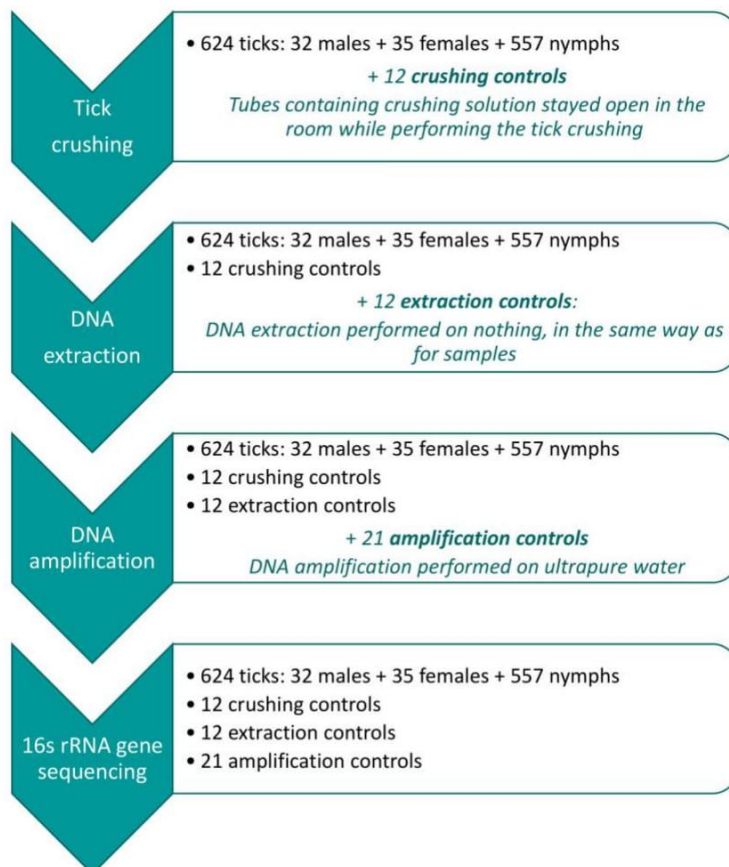
143 **Controls**

144 In total, 45 negative controls were included and analyzed using the same process as for tick
145 samples (**Figure 1**).

146 **12 Crushing controls (CCs):** Tube containing crushing solution, remaining open in the room while
147 putting ticks inside other tubes between the cleaning and crushing steps. DNA extraction and
148 amplification were then performed on the crushing control in the same conditions as for any other
149 sample.

150 **12 DNA extraction controls (ECs):** For these controls, the different DNA extraction steps were
151 performed under the same conditions as for any other samples, but without adding sample. DNA
152 amplification was then performed on the extraction control in the same conditions as for any other
153 sample.

154 **21 DNA amplification controls (ACs):** The DNA amplification step was performed on ultrapure water
155 (Invitrogen, United Kingdom), in the same conditions as for any other sample.



156

157 **Figure 1. Analyzing process for samples and added controls.**

158 **Sequencing and data processing**

159 The equimolar mix was concentrated and sequenced by GenoScreen (Lille, France) using
160 MiSeq Illumina 2 x 250 bp chemistry. Quality control checks on raw data were performed using FastQC
161 v0.11.3 (Andrews, 2010), and no problems were detected. First, pairs of amplicons were merged using
162 Pear v0.9.11 (Zhang *et al.*, 2014) with a minimum overlap of 20 bp, a minimum assembly length of
163 100 bp, a maximum assembly length of 480 bp, and an e-value of 0.01. Then, the sequencing
164 orientation of extended sequences was checked by using cutadapt v1.12 (Martin, 2011), with primers
165 in forward and reverse strands (without removing them). Sequences with a reversed orientation were
166 reverse-complemented to obtain a set of sequences with the same orientation (5' to 3'). The
167 sequence analysis was performed using FROGS (Escudié *et al.*, 2018). Primers were removed using
168 cutadapt and resulting sequences were dereplicated. Operational taxonomic units (OTUs) were built
169 using Swarm v2.1.12 (Mahé *et al.*, 2015) with parameter $d = 3$, and chimeras were filtered using
170 vsearch v1.4 (Rognes *et al.*, 2016) in a de novo mode. Finally, OTUs with low abundance ($< 0.005\%$ of
171 the total sequence count) were filtered out, resulting in 608 OTUs (corresponding to 2,835,506
172 sequences). OTUs were affiliated by blasting cluster seed sequences against the Silva database v132
173 (Quast *et al.*, 2013). OTUs corresponding to mitochondrial/chloroplast DNA or not affiliated to any
174 domain were removed, leading to a dataset composed of 513 OTUs and 2,726,287 sequences.

175

176 **Data processing to distinguish contaminant versus tick microbiota OTUs**

177 The control composition was used to distinguish tick microbial OTUs from contaminants. All
178 the OTUs corresponding to more than 1% of the total number of sequences obtained in each category
179 of control were identified as main contaminants. However, due to possible errors in sequence
180 assignment occurring during sequencing due to the formation of mixed clusters on the flow cell
181 (Kircher *et al.*, 2012), negative controls can also contain a few sequences of tick microbial OTUs,
182 complicating contaminant identification under this 1% threshold. Therefore, for each OTU, the
183 number of sequences expected to spread to other samples due to false assignment (i.e. expected
184 number) was determined by calculating 0.02% of the total number of each OTU in the dataset,
185 corresponding to a false assignment rate estimated previously by Galan *et al.* (2016). This expected
186 number was compared to the maximum number of obtained sequences in controls (i.e. maximum

187 number). As this rate was not estimated from our dataset, we decided to allow variability around this
188 threshold, while calculating a 99% confidence interval around the expected number of 0.02%. OTUs
189 whose maximum sequence number was above the upper threshold were considered contaminants.
190 Importantly, cross-contamination from samples to controls was considered negligible, as no negative
191 controls presented a higher maximum sequence number than the expected number for an OTU
192 belonging to the most abundant and characteristic genus of tick microbiota in our dataset
193 (*Midichloria*), which is also the 3rd most abundant OTU in the dataset (266,516 sequences).

194

195 **Statistical analyses**

196 The percentage of samples presenting a contamination rate higher than 50% was compared
197 between samples categories (nymphs, males and females) according to a Chi² statistical test.

198 Alpha diversity was estimated before and after sample cleaning. Samples containing fewer
199 than 500 sequences after cleaning were removed from the analysis, even if they contained more than
200 500 sequences before cleaning. Several measures of alpha diversity were calculated. Basically, the
201 observed number of OTUs (species richness) was used as well as the Faith Phylogenetic Diversity (PD)
202 index, corresponding to the total branch length of the subtree spanned by the community, and also
203 two indexes taking into account the number of sequences: the Shannon index (more influenced by
204 rare OTUs) and Simpson index (more influenced by dominant OTUs). Phylogenetic diversity was
205 estimated using the Picante package (Kembel *et al.*, 2010), while other measures were assessed
206 thanks to Easy 16S (<http://genome.jouy.inra.fr/shiny/easy16S/>), based on the phyloseq package
207 (McMurdie and Holmes, 2013). Alpha diversity measure comparison was performed between cleaned
208 and not cleaned groups, as well as between stages, using non-parametric statistical tests (Wilcoxon
209 and Kruskal–Wallis, respectively). Statistical computations were performed in R 3.6.0 (R Core Team,
210 2018).

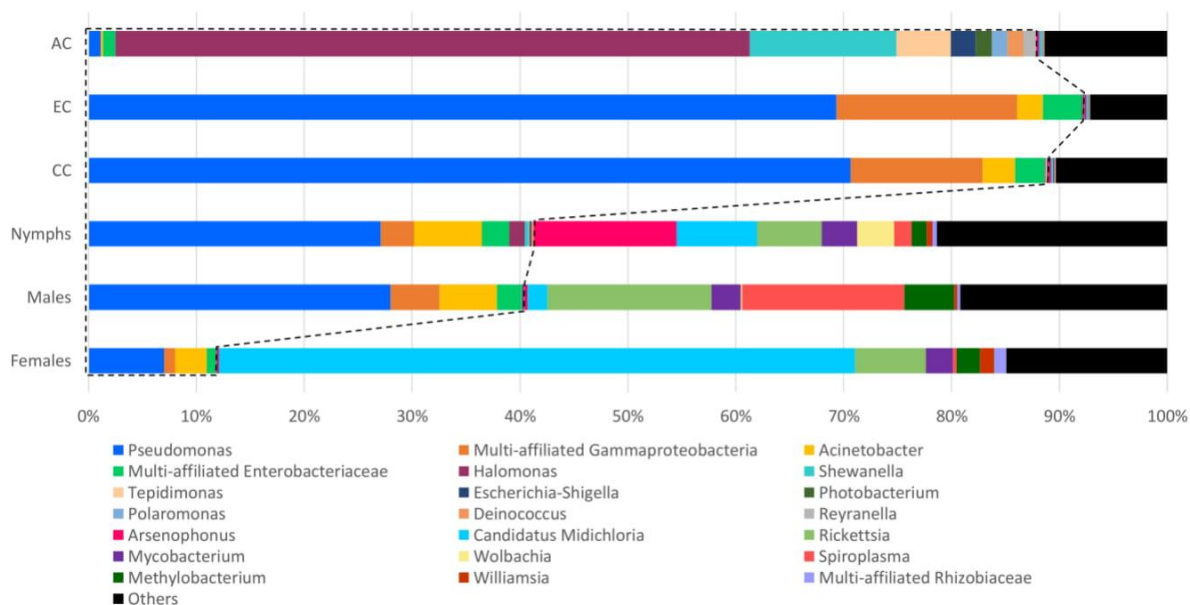
211

212 Results

213 Nymphs, males and females presented a mean number of sequences per sample of 3,721,
214 2,689 and 5,316, respectively. Concerning controls, a mean number of 13,198, 11,235 and 1,126
215 sequences per sample was obtained for crushing, extraction and amplification controls (CCs, ECs and
216 ACs), respectively.

217 The most abundant OTUs, with relative abundance higher than 1% in at least one category of
218 samples or controls, are represented in **Figure 2**. All other OTUs, i.e. those with relative abundance
219 lower than 1% in all categories were grouped together in the “Others” category.

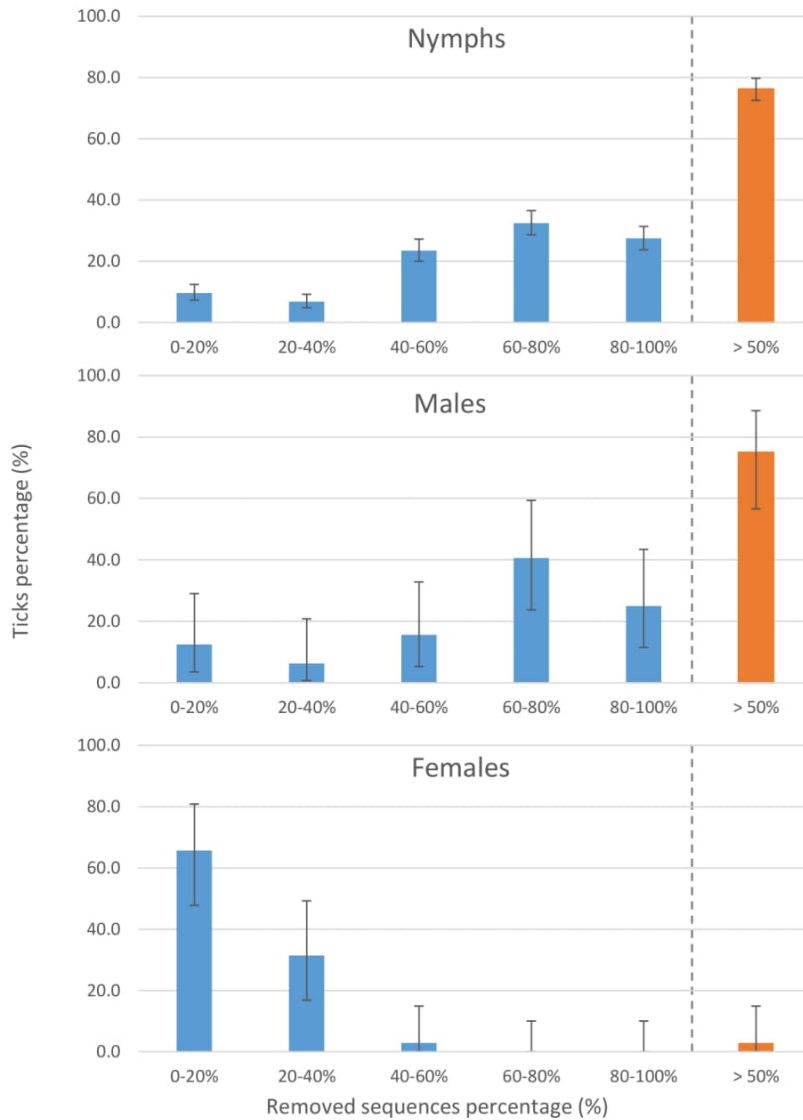
220 The examination of the at-least-1% OTU composition of the control (CCs, ECs, ACs) allowed to
221 identify OTUs belonging to the genera: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Halomonas*, *Shewanella*,
222 *Tepidimonas*, *Escherichia-Shigella*, *Photobacterium*, *Polaromonas*, *Deinococcus* and *Reyranella*, as well
223 as two OTUs belonging to the Enterobacteriaceae family but multi-affiliated at the genus level, and
224 one OTU only affiliated to Gammaproteobacteria at the Class level (**Figure 2**). OTU composition was
225 contrasted across the control types. While the same OTUs were identified in CCs and ECs and
226 belonged to *Pseudomonas* [70.7% and 69.3%, respectively], multi-affiliated Gammaproteobacteria
227 [12.2% and 16.7%, respectively], *Acinetobacter* [3.1% and 2.4%, respectively], and multi-affiliated
228 Enterobacteriaceae [2.7% and 3.6%, respectively]), the microbial community identified in AC controls
229 was dominated by OTUs belonging to *Halomonas* (58.8%), *Shewanella* (13.6%), *Tepidimonas* (5.1%),
230 *Escherichia-Shigella* (2.3%), *Photobacterium* (1.5%), *Polaromonas* (1.5%), *Deinococcus* (1.5%),
231 *Reyranella* (1.2%) and multi-affiliated Enterobacteriaceae (1.2%). These OTUs represented 38.9% of
232 the total number of sequences coming from the tick samples. Focusing on the sample category, these
233 OTUs correspond to 11.9%, 40.4% and 41.3% of sequences detected in females, males and nymphs,
234 respectively (**Figure 2**). These OTUs were therefore considered to be the main contaminants of the
235 dataset. It is interesting to note that most of these OTUs correspond to those detected in both EC and
236 CC controls. In fact, only 2.8% of sequences detected in the different categories of samples (nymphs,
237 females and males) correspond to OTUs detected in the AC controls and identified as main
238 contaminants.



239

240 **Figure 2. Comparison of the 16S rRNA gene sequencing taxonomic assignments between negative controls**
 241 **and samples.** Percentages are represented for the OTUs with proportions corresponding to at least 1% of the
 242 total number of sequences assigned to a category of samples or controls. Those corresponding to less than 1%
 243 are assigned as “Others”. OTUs belonging to the same genus or family (if multi-affiliated at the scale of genus)
 244 were assigned under the same name. One OTU was only identified until the class level (multi-affiliated
 245 Gammaproteobacteria).

246 A more in-depth identification of contaminants, including those corresponding to less than
 247 1% of the total number of sequences was performed, allowing us to identify 160 OTUs as
 248 contaminants among the 513 initially identified OTUs in the dataset. This identification increased the
 249 proportions of identified contaminants in the samples, which reach 50.9% of the total sequence count
 250 from the tick samples, and 20.1%, 51.2% and 53.7% of sequences detected in females, males and
 251 nymphs, respectively. Furthermore, after these cleaning steps, 201 samples contained less than 500
 252 sequences compared to 8 before cleaning. For 76.6% of nymph and 75% of male samples,
 253 contaminant OTUs represented more than 50% of the total sequence count (**Figure 3**). These sample
 254 contamination rates are significantly higher than those obtained for females ($p < 0.05$ according to a
 255 Chi^2 test), for which most of the samples (65.7%) exhibited a contamination rate below 20%.

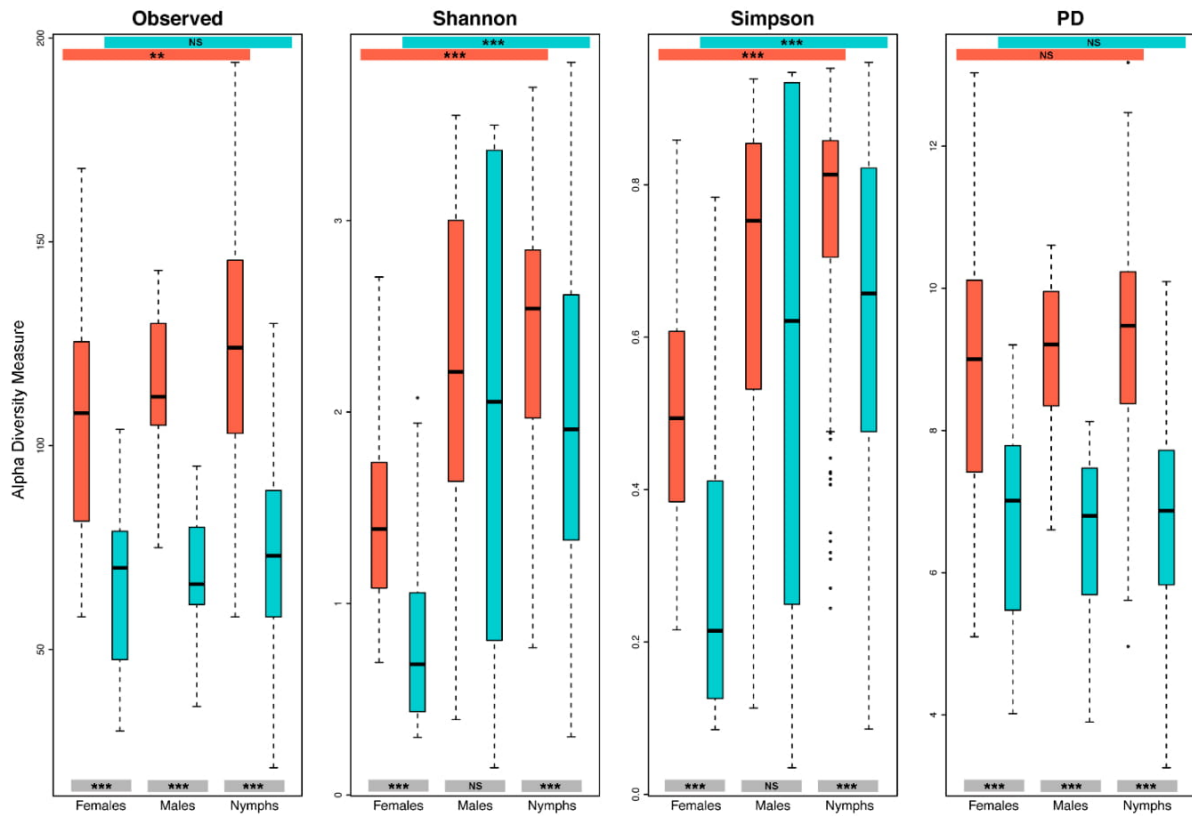


256

257 **Figure 3. Impact of contamination on the final number of sequences per sample according to the tick**
258 **stage/gender.**

259 The impact of this contamination on diversity, according to the sample category was
260 estimated (**Figure 4**). As expected, for all the studied diversity measures, cleaning led to a decrease
261 in diversity. Concerning nymphs and females, this decrease was significant for all the tested diversity
262 indexes, while for males, it was only significant for the observed and phylogenetic diversity measures,
263 suggesting that for males, contamination concerned mostly low-abundance taxa. The impact of this
264 cleaning on alpha diversity comparison between tick stages was been studied. Without cleaning,

265 significant differences in alpha diversity were found between tick stages for observed, Shannon and
266 Simpson measures. Concerning cleaned data, significant differences were still observed between
267 stages when using Shannon and Simpson indexes, but disappeared when using the observed diversity
268 measure.



269

270 **Figure 4. Impact of contamination on alpha diversity estimations according to the tick stages.** Alpha diversity
271 has been estimated according to the observed number of OTUs, the Shannon and Simpson indexes and the
272 Faith's phylogenetic diversity (PD), for each stage on cleaned (turquoise) and not cleaned (orange-red)
273 datasets. Results of the statistical test comparing alpha diversity measurement between stages, as well as
274 between the cleaned and uncleaned groups, are represented on coloured bands at both the top and the
275 bottom of the frame respectively: NS= Not Significant, ***= p < 0.001, **= p < 0.01.

276 Discussion

277 In this study, we sequenced the microbiota of 624 individual *I. ricinus* ticks including several
278 categories of negative controls to identify and quantify the contaminating sequences, in particular
279 those produced during the extraction or amplification steps. The performance of multiple negative
280 controls allowed us to perform in-depth identification of contaminant OTUs. These OTUs represented
281 50.9% of the total sequence yield from tick samples, and had a significant impact on microbial
282 diversity estimation. This shows the importance of contamination potentially arising from processing
283 steps, and demonstrates that its consequences on data analyses can be significant and should not be
284 neglected.

285 A high number of sequences in each category of controls was detected, particularly in CCs and
286 ECs, in which the mean number of sequences was even higher than the mean sequence number
287 detected in samples. Importantly, this higher number might be partly overestimated, first due to the
288 presence of tick DNA during the PCR that may have inhibited the reaction on the 16s rRNA gene in
289 samples while not in controls, and second during the measure of DNA concentrations that may have
290 led to a higher estimation of concentrations in samples compared to controls, before the pooling
291 step. Despite this, the high number of sequences in controls raises the issue of contaminant presence,
292 while performing each step of the sample processing.

293 Each processing step leads to a different contamination pattern. Most of the main
294 contaminants do not seem to originate from the DNA amplification step. Furthermore, as the
295 composition of crushing and extraction controls was the same, while the reagents used were different
296 and crushing control also underwent the extraction step, the contaminant sequences most probably
297 came from the DNA extraction step, rather than from the crushing step. The key role of the extraction
298 step in the contamination of low biomass samples has previously been demonstrated by Salter *et al.*
299 (2014). Furthermore, three of the four main contaminants identified in our analysis, corresponding
300 to *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and multi-affiliated Enterobacteriaceae, belong to families and
301 genera identified by these authors as contaminants coming from DNA extraction kits. Our
302 observations differed from those obtain by Galan *et al.* (2016), who mainly detected contaminants
303 coming from the DNA amplification step, while this step represented only 2% of the main
304 contaminants detected in our samples. In their study of kit contaminants, Salter *et al.* (2014) observed

305 that the extent of contamination arising from DNA extraction was different depending on the kit
306 brand used to perform this step. While using the less contaminating kit, they extracted DNA from
307 several 10-fold cascade dilutions of a pure suspension of *Salmonella bongori*, and subsequently
308 assessed 16s rRNA gene concentrations *via* q-PCR. They demonstrated a linear relationship between
309 the 16s rRNA gene copy number and the dilution fold only for the first dilution points, after which
310 levels started to stabilize and to reach a threshold of 10^5 mean copy number/mL. Consequently, the
311 higher rate of extraction, rather than amplification contaminants in samples, could be due either to
312 variations of contaminating load between our extraction and amplification kits, that are not sourced
313 from the same company, or to the presence of a basal level of extraction contaminant bacterial DNA,
314 potentially limiting the contamination arising from the next step (amplification).

315 Interestingly, we showed that in terms of contamination rates, the influence of contaminant
316 presence was significantly higher in nymph and male samples compared to female ones. Because low
317 biomass samples were shown to be particularly sensitive to contamination (Salter *et al.*, 2014), we
318 might suppose that the amount of bacterial DNA would be lower in males and nymphs, explaining
319 the higher presence of contaminants in these samples. It would be useful to develop epifluorescence
320 or flow cytometry protocols adapted to tick samples, to assess whether the amount of bacteria
321 composing the female microbiota is effectively higher than in the male and nymph. Additionally,
322 previous studies dealing with tick microbes have identified higher microbiota diversity in males and
323 nymphs compared to females, while investigating richness and PD (Van Treuren *et al.*, 2015; Zolnik
324 *et al.*, 2016) as well as Shannon and Simpson indexes (Zolnik *et al.*, 2016). However, no negative
325 controls and data cleaning were reported in these studies, and they could therefore result from
326 contamination. In the present study, we determined that the presence of contaminants can lead to
327 an overestimation of microbial diversity in all the tick stages, and that this is the case for several
328 diversity indexes, especially richness and PD estimations, which are the measures most affected by
329 the cleaning process. Furthermore, the impact of removing contaminants on diversity comparisons
330 between stages was estimated and showed that this cleaning step can influence the final results, and
331 particularly in our case, concerning the observed diversity estimation. Our results therefore call for
332 caution in attempts to draw conclusion about tick stage diversity without considering negative
333 controls.

334 As already mentioned by Narasimhan and Fikrig (2015), the understanding of arthropod
335 microbial communities in the context of arthropod survival and pathogen transmission may open new
336 routes in arthropod-borne pathogen control strategies. In this context, many studies have assessed
337 tick microbiota composition in individual ticks or even in tick organs (Andreotti *et al.*, 2011; Lalar *et al.*,
338 *et al.*, 2012; Hawlena *et al.*, 2013; Budachetri *et al.*, 2014; Narasimhan *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2014;
339 Clayton *et al.*, 2015; Rynkiewicz *et al.*, 2015; Van Treuren *et al.*, 2015; Gall *et al.*, 2016; Khoo *et al.*,
340 2016; Zolnik *et al.*, 2016; Abraham *et al.*, 2017; Kwan *et al.*, 2017; Swei and Kwan, 2017; Estrada-Peña
341 *et al.*, 2018). However, very few reported the use of negative controls or mentioned the identification
342 and removal of subsequently identified contaminants (Hawlena *et al.*, 2013; Rynkiewicz *et al.*, 2015;
343 Estrada-Peña *et al.*, 2018), thus obscuring the risk that identified micro-organisms as members of the
344 microbiota could correspond to contaminants. Nonetheless, the bias generated by the presence of
345 contaminants can have a considerable influence on the characterization of tick microbiota
346 composition and structure. Here, we showed that contaminants represented almost 50 % of the total
347 sequence yield of tick samples. Furthermore, several contaminants we identified belong to genera
348 (especially *Pseudomonas* and *Acinetobacter*) previously reported in several tick microbiota studies
349 (reviewed by Narasimhan and Fikrig, 2015). This does not necessarily mean that these OTUs are
350 contaminants, as several OTUs belonging to the same genera may correspond either to tick
351 microbiota members or to contaminants. However, this points out the lack of reliability concerning
352 this crucial point in the understanding of tick microbiota composition, and the need to perform
353 negative controls to clean the data set and to rule out the hypothesis of potential contamination.

354

355 **Conclusions**

356 Because of their ease of use and the fact that they employ safer chemicals than those in
357 conventional methods (i.e. phenol chloroform extraction), the use of commercial DNA extraction kits
358 has become standard, particularly in the context of studies dealing with the identification of tick
359 microbial communities. However, the issue of contaminants coming from DNA extraction kits has
360 recently been raised for microbiota studies dealing with low biomass samples, such as blood,
361 intestinal tissue, mucosal tissue, or nasopharyngeal samples. Our study adds further evidence
362 supporting these important concerns in the field of tick microbiota. Here, our results suggest that

363 many negative controls should be performed at each step of sample processing prior to performing
364 microbiota analyses, allowing us to efficiently identify a potentially serious bias in the study of the
365 actual tick microbial community. While more and more studies try to identify tick microbiota to *in*
366 *fine* potentially propose hypothesis for the development of new tick-borne pathogen control
367 strategies, we strongly advise the routine use of negative controls in microbiota studies, particularly
368 in the context of low biomass samples like ticks or other small arthropods. These procedures should
369 be used routinely in order to obtain the most reliable results possible.

370

371 **List of abbreviations**

372 OTU: Operational Taxonomic Unit

373 *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*

374 CC: Crushing Control

375 EC: Extraction Control

376 AC: Amplification Control

377

378 **Author Contributions**

379 Conceived and designed the experiments: TP, MVT, JFC, EL. Performed the experiments: EL. Analysed
380 the data: EL, AE, TP, MM, MM, CM, OR. Wrote the paper: EL, AE, MM, JFC, OR, MM, CM, MVT, TP. All
381 the authors read and approved the final manuscript.

382

383 **Funding**

384 This work was supported by the métaprogramme “Metaomics and microbial ecosystems” (MEM) and
385 the Métaprogramme “Adaptation of Agriculture and Forests to Climate Change” (ACCAF) granted by
386 the French National Institute for Agricultural Research (France).

387 The salary of Emilie Lejal, the PhD student working on this project was funded by the Ile-de-France
388 region.

389 **Acknowledgments**

390 The authors would like to thanks Sabine Delannoy and the IdentityPath genomic platform that
391 allowed us to perform part of the experiments in their laboratory. We also thank Maxime Galan for
392 providing index sequences and stimulating discussions. Thank you as well to Ladislav Šimo for his
393 precious help in figure improvement.

394 **References**

- 395 Abraham, N.M., Liu, L., Jutras, B.L., Yadav, A.K., Narasimhan, S., Gopalakrishnan, V., et al. (2017)
396 Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *Proc Natl*
397 *Acad Sci* **114**: E781–E790.
- 398 Andreotti, R., Pérez de León, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G., and Scoles, G.A. (2011)
399 Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
400 through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol* **11**: 6.
- 401 Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- 402 Budachetri, K., Browning, R.E., Adamson, S.W., Dowd, S.E., Chao, C.-C., Ching, W.-M., and Karim, S.
403 (2014) An Insight Into the Microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae). *J*
404 *Med Entomol* **51**: 119–129.
- 405 Carpi, G., Cagnacci, F., Wittekindt, N.E., Zhao, F., Qi, J., Tomsho, L.P., et al. (2011) Metagenomic
406 Profile of the Bacterial Communities Associated with *Ixodes ricinus* Ticks. *PLOS ONE* **6**:
407 e25604.
- 408 Clayton, K.A., Gall, C.A., Mason, K.L., Scoles, G.A., and Brayton, K.A. (2015) The characterization and
409 manipulation of the bacterial microbiome of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor*
410 *andersoni*. *Parasit Vectors* **8**: 632.
- 411 Degli Esposti, M. and Martinez Romero, E. (2017) The functional microbiome of arthropods. *PLOS*
412 *ONE* **12**: e0176573.
- 413 Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018) FROGS: Find,
414 Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **34**: 1287–1294.
- 415 Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., Pollet, T., Vayssier-Taussat, M., and Cosson, J.-F. (2018) High
416 Throughput Sequencing and Network Analysis Disentangle the Microbial Communities of
417 Ticks and Hosts Within and Between Ecosystems. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 236.
- 418 Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., et al. (2016) 16S rRNA
419 Amplicon Sequencing for Epidemiological Surveys of Bacteria in Wildlife. *mSystems* **1**:
420 e00032-16.

- 421 Gall, C.A., Reif, K.E., Scoles, G.A., Mason, K.L., Mousel, M., Noh, S.M., and Brayton, K.A. (2016) The
422 bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility.
423 *ISME J* **10**: 1846–1855.
- 424 Glassing, A., Dowd, S.E., Galandiuk, S., Davis, B., and Chiodini, R.J. (2016) Inherent bacterial DNA
425 contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of
426 microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathog* **8**: 24.
- 427 Gofton, A.W., Oskam, C.L., Lo, N., Beninati, T., Wei, H., McCarl, V., et al. (2015) Inhibition of the
428 endosymbiont “*Candidatus Midichloria mitochondrii*” during 16S rRNA gene profiling reveals
429 potential pathogens in *Ixodes* ticks from Australia. *Parasit Vectors* **8**: 345.
- 430 Hamdan, L.J., Coffin, R.B., Sikaroodi, M., Greinert, J., Treude, T., and Gillevet, P.M. (2013) Ocean
431 currents shape the microbiome of Arctic marine sediments. *ISME J* **7**: 685–696.
- 432 Hawlena, H., Rynkiewicz, E., Toh, E., Alfred, A., Durden, L.A., Hastriter, M.W., et al. (2013) The
433 arthropod, but not the vertebrate host or its environment, dictates bacterial community
434 composition of fleas and ticks. *ISME J* **7**: 221–223.
- 435 Heise, S.R., Elshahed, M.S., and Little, S.E. (2010) Bacterial Diversity in *Amblyomma americanum*
436 (Acari: Ixodidae) With a Focus on Members of the Genus *Rickettsia*. *J Med Entomol* **47**: 258–
437 268.
- 438 Kembel, S.W., Cowan, P.D., Helmus, M.R., Cornwell, W.K., Morlon, H., Ackerly, D.D., et al. (2010)
439 Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* **26**: 1463–1464.
- 440 Khoo, J.-J., Chen, F., Kho, K.L., Ahmad Shanizza, A.I., Lim, F.-S., Tan, K.-K., et al. (2016) Bacterial
441 community in *Haemaphysalis* ticks of domesticated animals from the Orang Asli
442 communities in Malaysia. *Ticks Tick-Borne Dis* **7**: 929–937.
- 443 Kircher, M., Sawyer, S., and Meyer, M. (2012) Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex
444 sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Res* **40**: e3–e3.
- 445 Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B.C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., et al. (2018) Best
446 practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol* **16**: 410.
- 447 Kwan, J.Y., Griggs, R., Chicana, B., Miller, C., and Sweit, A. (2017) Vertical vs. horizontal transmission
448 of the microbiome in a key disease vector, *Ixodes pacificus*. *Mol Ecol* **26**: 6578–6589.
- 449 Lalzar, I., Harrus, S., Mumcuoglu, K.Y., and Gottlieb, Y. (2012) Composition and Seasonal Variation of
450 *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* Bacterial Communities. *Appl Env*
451 *Microbiol* **78**: 4110–4116.
- 452 Lejal, E., Marsot, M., Chalvet-Monfray, K., Cosson, J.-F., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M., and
453 Pollet, T. (2019) A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French
454 peri-urban forest. *bioRxiv* 597013.
- 455 Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, and Dunthorn, M. (2015) Swarm v2: highly-scalable
456 and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* **3**: e1420.
- 457 Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.
458 *EMBnet.journal* **17**: 10–12.
- 459 McMurdie, P.J. and Holmes, S. (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis
460 and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* **8**: e61217.

- 461 Moreno, C.X., Moy, F., Daniels, T.J., Godfrey, H.P., and Cabello, F.C. (2006) Molecular analysis of
462 microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks
463 from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environ Microbiol* **8**: 761–772.
- 464 Narasimhan, S. and Fikrig, E. (2015) Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol* **31**: 315–
465 323.
- 466 Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y.O., Heisig, J., Pan, J., et al. (2014) Gut Microbiota of the
467 Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. *Cell*
468 *Host Microbe* **15**: 58–71.
- 469 Qiu, Y., Nakao, R., Ohnuma, A., Kawamori, F., and Sugimoto, C. (2014) Microbial Population Analysis
470 of the Salivary Glands of Ticks; A Possible Strategy for the Surveillance of Bacterial
471 Pathogens. *PLOS ONE* **9**: e103961.
- 472 Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013) The SILVA ribosomal
473 RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids*
474 *Res* **41**: D590–D596.
- 475 R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria: R
476 Foundation for Statistical Computing.
- 477 René-Martellet, M., Minard, G., Massot, R., Tran Van, V., Valiente Moro, C., Chabanne, L., and
478 Mavingui, P. (2017) Bacterial microbiota associated with *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) ticks
479 from France, Senegal and Arizona. *Parasit Vectors* **10**: 416.
- 480 Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016) VSEARCH: a versatile open source
481 tool for metagenomics. *PeerJ* **4**: e2584.
- 482 Rynkiewicz, E.C., Hemmerich, C., Rusch, D.B., Fuqua, C., and Clay, K. (2015) Concordance of bacterial
483 communities of two tick species and blood of their shared rodent host. *Mol Ecol* **24**: 2566–
484 2579.
- 485 Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Calus, S.T., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., et al. (2014) Reagent
486 and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses.
487 *BMC Biol* **12**: 87.
- 488 Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., et al. (2006) Microbial
489 diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci* **103**:
490 12115–12120.
- 491 Sperling, J.L., Silva-Brandão, K.L., Brandão, M.M., Lloyd, V.K., Dang, S., Davis, C.S., et al. (2017)
492 Comparison of bacterial 16S rRNA variable regions for microbiome surveys of ticks. *Ticks*
493 *Tick-Borne Dis* **8**: 453–461.
- 494 Swei, A. and Kwan, J.Y. (2017) Tick microbiome and pathogen acquisition altered by host blood
495 meal. *ISME J* **11**: 813–816.
- 496 Thapa, S., Zhang, Y., and Allen, M.S. (2019) Effects of temperature on bacterial microbiome
497 composition in *Ixodes scapularis* ticks. *MicrobiologyOpen* **8**: e00719.
- 498 Van Treuren, W., Ponnusamy, L., Brinkerhoff, R.J., Gonzalez, A., Parobek, C.M., Juliano, J.J., et al.
499 (2015) Variation in the Microbiota of *Ixodes* Ticks with Regard to Geography, Species, and
500 Sex. *Appl Env Microbiol* **81**: 6200–6209.

- 501 Weiss, S., Amir, A., Hyde, E.R., Metcalf, J.L., Song, S.J., and Knight, R. (2014) Tracking down the
502 sources of experimental contamination in microbiome studies. *Genome Biol* **15**: 564.
- 503 Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014) PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-
504 End reAd mergeR. *Bioinformatics* **30**: 614–620.
- 505 Zolnik, C.P., Prill, R.J., Falco, R.C., Daniels, T.J., and Kolokotronis, S.-O. (2016) Microbiome changes
506 through ontogeny of a tick pathogen vector. *Mol Ecol* **25**: 4963–4977.

III. Dynamique et interactions du microbiote d'*Ixodes ricinus*

Cette étude fait l'objet d'un article scientifique en préparation :

Lejal E, Chiquet J, Aubert J, Robin S, Estrada-Peña A, Rue O, Midoux C, Mariadassou M, Bailly X, Cougoul A, Gasqui P, Cosson JF, Chalvet-Montfray K, Vayssier-Taussat M, Pollet T (en préparation). Temporal patterns in tick microbial communities: an insight into microbiome-pathogen interactions.

1. Présentation générale de l'étude et principaux résultats

A. Contexte de l'étude

L'objectif de ma thèse était de caractériser la dynamique du pathobiome des tiques *Ixodes ricinus*. Dans le premier chapitre, j'ai pu caractériser la dynamique des agents pathogènes à l'échelle temporelle et à celle de deux organes clés des tiques. Après une rigoureuse mise au point méthodologique présentée précédemment, je me suis finalement intéressée dans cette dernière partie à la dynamique temporelle de l'ensemble du microbiote et ai cherché à mettre en évidence l'existence d'un potentiel schéma saisonnier. J'ai également essayé d'identifier des potentielles interactions entre les membres de ce microbiote.

B. Méthodes

Pour cela, j'ai déterminé, par séquençage du gène de l'ARN 16S, le microbiote de nymphes échantillonnées, à l'affût, mensuellement d'avril 2014 à mai 2017 en forêt de Sénart. Après avoir nettoyé notre jeu de données des contaminants pouvant biaiser les résultats (voir paragraphe II) du chapitre II), 371 nymphes ont finalement été considérées dans cette étude. L'ensemble des analyses statistiques réalisées sur les données d'abondance, a été effectué à l'aide du modèle Poisson Log Normal multivarié et de ses variantes dédiées à l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et à l'inférence de réseaux de corrélations partielles. L'ACP a permis de mettre à jour l'effet de la saisonnalité sur les communautés, tandis que l'analyse des réseaux de corrélations partielles a permis d'investiguer les relations liant les différentes OTUs membres de ces communautés

C. Résultats principaux et discussion

Au total, 353 OTUs différentes ont été détectées dans ce jeu de données. Les 5 genres bactériens les plus abondants en termes de nombre de séquences totales étaient *Arsenophonus* (30,4% du total des séquences) *Candidatus Midichloria* (16,5%), *Rickettsia* (14,0%), *Wolbachia* (9,7%) et *Spiroplasma* (4,0%). Tous correspondaient à des bactéries communément transmises verticalement chez différentes espèces d'arthropodes et ayant déjà été détectées précédemment chez les tiques (Duron *et al.*, 2017). Dans le cas des genres *Wolbachia* et *Arsenophonus*, il semble néanmoins que leur détection chez *I. ricinus* soit due au parasitisme de cette dernière par une espèce d'hyménoptère parasitoïde, *Ixodiphagus hookeri* (Plantard *et al.*, 2012; Bohacsova *et al.*, 2016). Parmi les autres genres majoritaires (> 0.5% du nombre total de séquences) détectés dans ce jeu de données, on compte également plusieurs autres genres bien connus pour circuler chez les tiques (*Rickettsiella*, *Borrelia*, *Anaplasma*), mais aussi des genres et familles correspondant typiquement à des micro-organismes de l'environnement, ayant été précédemment détectés chez *I. ricinus* (*Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Williamsa*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, et deux OTUs multi-affiliées appartenant aux familles Rhizobiaceae et Microbacteriaceae). Néanmoins, il semble qu'une part de ces OTUs puisse correspondre à de la contamination cuticulaire, non éliminée par notre protocole de nettoyage à l'éthanol (Binetruy *et al.*, 2019a).

La réalisation d'analyses multivariées de type ACP, a permis de mettre en évidence l'existence d'un schéma saisonnier dans le microbiote d'*I. ricinus*. Ce schéma semble être principalement dû à des OTUs appartenant à des genres et familles retrouvés habituellement dans l'environnement. Dans le cas où ces OTUs correspondraient à de la contamination cuticulaire, le schéma observé pourrait être le reflet de variations saisonnières des bactéries de l'environnement (Baldrian, 2017). Néanmoins, il est également possible que ces OTUs correspondent à des bactéries acquises par les tiques depuis l'environnement notamment lors du processus d'hydratation. Narasimhan *et al.* (2014) ont d'ailleurs démontré que l'environnement dans lequel se trouvaient les tiques pouvait avoir une influence sur la diversité de leur microbiote intestinal. Dans un tel cas, des variations du microbiote de leur environnement pourraient tout aussi bien être responsables du schéma saisonnier observé.

Par ailleurs, l'influence d'autres facteurs, tels que la température, pourraient enfin expliquer cet effet saisonnier. En effet, cette dernière semblent également impacter la diversité du microbiote des tiques (Thapa *et al.*, 2019).

L'analyse de réseaux réalisée sur mon jeu de données a permis de mettre en évidence l'existence d'un grand nombre de corrélations partielles significatives entre les OTUs (244), la plupart positives (238). Parmi les différents réseaux de corrélations partielles observés, l'un d'eux impliquait l'ensemble des OTUs appartenant aux genres *Wolbachia*, *Arsenophonus* et *Spiroplasma*. De manière intéressante, aucun de ces 3 genres n'interagissaient avec d'autres genres ou OTUs de la communauté. Considérant que la détection de *Wolbachia* et *Arsenophonus* chez les tiques est très probablement le reflet de la présence du parasitoïde *Ixodiphagus hookeri*, et que le rôle de *Spiroplasma* en tant que symbionte défensif à l'encontre de deux espèces de parasitoïdes a déjà été démontré chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Xie *et al.*, 2014), nous émettons l'hypothèse, que cette corrélation positive pourrait correspondre à une augmentation de la charge de *Spiroplasma* en réponse à la présence du parasitoïde *I. hookeri*. Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus exclure l'hypothèse que *Spiroplasma* soit un symbionte d'*I. hookeri*. Un autre lien intéressant détecté dans cette analyse est celui qui unissait une OTU du genre *Ca. Midichloria* avec plusieurs OTUs du genre *Rickettsia*, certaines pouvant correspondre à l'espèce pathogène *R. helvetica* détectée précédemment dans plusieurs des échantillons analysés dans l'étude de la dynamique temporelle des agents pathogènes (Lejal *et al.*, 2019a; voir paragraphe III) du chapitre I). Etant donnée la forte prévalence de *Ca. Midichloria* chez les tiques *I. ricinus*, les liens observés pourraient suggérer un rôle facilitateur de la présence de cet endosymbiote dans la colonisation par *Rickettsia*. Cette hypothèse est notamment étayée par le fait qu'une corrélation positive entre *Ca. Midichloria mitochondrii* et un autre agent pathogène du genre *Rickettsia* (*Rickettsia parkeri*) a déjà été détectée précédemment chez la tique *Amblyomma maculatum* (Budachetri *et al.*, 2018).

2. Article IV : En préparation

1 **Temporal patterns in tick microbial communities: an insight into tick microbe**
2 **interactions**

3 Lejal E¹, Chiquet J², Aubert J², Robin S², Estrada-Peña A³, Rue O⁴, Midoux C^{4,6}, Mariadassou
4 M⁴, Bailly X⁵, Cougoul A⁵, Gasqui P⁵, Cosson JF¹, Chalvet-Monfray K⁷, Vayssier-Taussat M⁸,
5 Pollet T¹

6

7

8 ¹UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, INRAE, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
9 Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

10 ²UMR MIA-Paris, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, 75005 Paris, France

11 ³Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

12 ⁴MaIAGE, INRAE, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

13 ⁵EPIA, UMR 0346, Epidémiologie des maladies Animales et zoonotiques, INRAE, VetAgroSup,
14 Route de Theix, F-63122, Saint Genes Champanelle, France

15 ⁶UR PROSE, INRAE, Antony, France

16 ⁷Université Clermont Auvergne, Université de Lyon, INRAE, VetAgro Sup, UMR EPIA, 63122
17 Saint-Genès-Champanelle, France.

18 ⁸INRAE, Animal health department, Nouzilly, France

19

20

21 *** Correspondence:**

22 Dr Thomas Pollet

23 thomas.pollet@inrae.fr

24 **Abstract**

25 Ticks transmit pathogens of medical and veterinary importance, and represent an
26 increasing threat for human and animal health. Important steps in assessing disease risk and
27 formulating possible intervention strategies involve identify microbial communities inhabiting
28 in ticks, their temporal dynamics and interactions. Using high throughput sequencing, we
29 studied the microbiota of 371 *Ixodes ricinus* nymphs collected monthly over three
30 consecutive years in a peri-urban forest. We also examined the temporal patterns and
31 highlighted interactions between all these microbial communities. Around 75% of the
32 sequences of our dataset belonged to five genera: *Arsenophonus*, *Candidatus Midichloria*,
33 *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Spiroplasma*. Using a principal component analysis allowed us to
34 characterize the temporal dynamics of the *I. ricinus* microbiota. Our results provide evidence
35 that the *I. ricinus* microbial communities exhibit temporal variations and that the observed
36 pattern was redundant from one year to another. Finally, we performed a network analysis
37 to identify potential interactions between members of the *I. ricinus* microbial communities.
38 More than 97% of interactions were positive suggesting that tick microbial communities
39 would favour mutualism and would perform similar or complementary functions. Three major
40 groups of interactions were observed: *Spiroplasma/Wolbachia/Arsenophonus*,
41 *Ca. Midichloria/Rickettsia* and a third group with multiple interactions, mainly between
42 *Methylobacterium* and OTUs of the Beijerinckiaceae family.

43

44 **Introduction**

45 Ticks, vectors of several zoonotic pathogens, represent an important and increasing
46 threat for human and veterinary health. While these arthropods are among the most
47 important vectors of pathogens affecting humans and animals worldwide, it is now well
48 established that tick-borne pathogens (TBPs) coexist with many other microorganisms in ticks.
49 These other tick-borne microbes, commensal and/or symbionts, are likely to confer multiple
50 detrimental, neutral, or beneficial effects to their tick hosts, and can play various roles in
51 nutritional adaptation, development, reproduction, defense against environmental stress,
52 and immunity (Duron *et al.*, 2015, 2018). Otherwise, they may also interact with tick-borne

53 pathogens, that can have consequences on tick vector competence (Vayssier-Taussat *et al.*,
54 2015; Bonnet *et al.*, 2017). In this context, the identification and characterization of tick
55 microbiota has become crucial to better understand the tick-microbe interactions. With the
56 development of high throughput sequencing technologies, the number of studies dealing with
57 tick microbiota considerably increased in the past ten years and revealed an unexpected
58 microbial diversity in ticks (Lalzar *et al.*, 2012; Nakao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Van
59 Treuren *et al.*, 2015; Gall *et al.*, 2016; René-Martellet *et al.*, 2017; Swei and Kwan, 2017;
60 Estrada-Peña *et al.*, 2018; Varela-Stokes *et al.*, 2018; Tokarz *et al.*, 2019). The microbiota of
61 several tick species of the genera *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* and
62 *Amblyomma* has been studied (see in Cabezas-Cruz *et al.*, 2018) and all these works have
63 given crucial details on microbial communities in ticks and improved our knowledge on tick
64 microbial community ecology. However, few information are currently available on the
65 microbiota composition of the tick *Ixodes ricinus* (Carpi *et al.*, 2011; Nakao *et al.*, 2013; Gofton
66 *et al.*, 2015; Estrada-Peña *et al.*, 2018; Hernández-Jarguín *et al.*, 2018; Portillo *et al.*, 2019),
67 the predominant tick species in western Europe, that is capable to transmit the largest variety
68 of pathogens, including the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* s.l.. Moreover, most of
69 these previous *I. ricinus* microbiota analyses have probably overestimate the microbiota
70 diversity due to extraction step contamination and the lack of controls in their analysis (Lejal
71 *et al.*, 2019a). Studies dealing with *I. ricinus* microbial communities pointed out complex
72 microbial assemblages inhabiting ticks as pathogens, specific endosymbionts, commensal and
73 environmental microbes. As already observed for pathogens (Gassner *et al.*, 2010; Coipan *et al.*
74 *et al.*, 2013; Takken *et al.*, 2016; Lejal *et al.*, 2019b), the other members of these biological
75 assemblages are probably dynamic and likely to vary with time. No information is currently
76 available on the temporal patterns of the *I. ricinus* microbiota. Does the *I. ricinus* microbiota
77 vary with season? Are these potential temporal patterns annually redundant? Finally, while
78 tick microbiota may also play a role in driving transmission or multiplication of tick-borne
79 pathogens, no information is available on the interactions between microbes inhabiting
80 *I. ricinus*. After monthly collecting *I. ricinus* nymphs over three consecutive years in a peri-
81 urban forest, we used a high throughput sequencing approach to identify the *I. ricinus*
82 microbiota and assess the seasonal variability. Thanks to multivariate and network analysis,
83 we tried to identify potential interactions between members of the microbiota, including
84 pathogenic genera.

85

86 **Material and Methods**

87 *Tick collection*

88 Questing *Ixodes ricinus* nymphs were collected for three years by dragging (from April
89 2014 to May 2017) in the Sénart forest in the south of Paris. More details on the sampling
90 location and design, and tick collection, are available in Lejal *et al.* (2019b).

91

92 *Tick homogenisation and DNA extraction*

93 998 nymphs have been collected over the three years (Lejal *et al.*, 2019b). As detailed
94 in this previous study, ticks were first washed once in ethanol 70% for 5 minutes and rinsed
95 twice in sterile MilliQ water. They were then individually homogenised in 375 µL of Dulbecco's
96 Modified Eagle Medium with decompemented fetal calf serum (10%) and six steel beads
97 using the homogenizer Precellys®24 Dual (Bertin, France) at 5,500 rpm for 20 seconds. DNA
98 extraction was performed on 100 µL of tick homogenate, using the NucleoSpin® Tissue DNA
99 extraction kit (Macherey-Nagel, Germany).

100

101 *DNA amplification and multiplexing*

102 Among the 998 nymphs, 557 have been chosen to characterize the temporal
103 dynamics. Thanks to our previous study (Lejal *et al.*, 2019b), we knew the infection rate of all
104 collected ticks. For each collecting month, while all infected nymphs have been compulsory
105 integrated in the analysis, non-infected nymphs (at least 15 per month) were added until
106 reaching a minimum of 30 ticks (infected and non-infected) per month, when it was possible.
107 When less than 30 ticks were collected in a month, all ticks were added in the analysis. In
108 addition to tick samples, 45 negative controls have been performed to distinguish tick
109 microbial OTUs from contaminants (Lejal *et al.*, 2019a). As detailed in Lejal *et al.* (2019a), DNA
110 amplifications were performed on the V4 region of the 16s rRNA gene using the primer pair
111 used by Galan *et al.* (2016) (16S-V4F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' and 16S-V4R: 5'-
112 GGACTACHVGGGTWTCTAATCC-3'), producing a 251 bp amplicon. Different 8bp indexes were
113 added to primers allowing *in fine* the amplification and multiplexing of all samples. All the PCR
114 amplifications were carried out using the Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase
115 amplification kit (Thermo Scientific, Lithuania). For each sample, 5 µL of DNA extract were
116 amplified in a 50 µL final reaction volume, containing 1X Phusion HF buffer, 0.2 µM of dNTPs,

4

117 0.2 U/mL of Phusion DNA polymerase, and 0.35 μ M of forward and reverse primer. The
118 following thermal cycling procedure was used: initial denaturation at 98°C for 30 s, 35 cycles
119 of denaturation at 98°C for 10 s, annealing at 55°C for 30 s, followed by extension at 72°C for
120 30 s. The final extension was carried out at 72°C for 10 minutes. PCR products were checked
121 on 1.5% agarose gels, cleaned and quantified and finally pooled at equimolar concentrations
122 and sent to the sequencing platform (GenoScreen, France) (Lejal *et al.*, 2019a).

123

124 *Sequencing and data processing*

125 The equimolar mix was concentrated and sequenced by GenoScreen (Lille, France)
126 using MiSeq Illumina 2 x 250 bp chemistry. All the quality controls and different steps of
127 sequence analyses have been performed (more details are available in Lejal *et al.*, 2019a).
128 Based on results obtained in the 45 negative controls, sequences considered as contaminants
129 have been removed from the dataset (Lejal *et al.*, 2019a). Due to this large OTUs filtration,
130 we identified several samples with less than 500 sequences. We considered this number of
131 sequences too low to be analysed and we thus removed the concerned samples. Finally, the
132 microbiota of 371 *I. ricinus* nymphs was analysed. Also, after filtering all sequences not
133 belonging to the tick microbiota, the final dataset was composed of 907,941 sequences.

134

135 *Data preprocessing*

136 Two distinct data sets have been analysed during this study. First, the entire one
137 including all the nymphs analysed in 16s rRNA gene sequencing (371 analysed samples), and
138 second, a reduced data set, whose samples harbouring OTUs belonging to *Arsenophonus*
139 and/or *Wolbachia* genera (beyond 10% of the total number of sequences per sample) have
140 been removed (303 analysed samples). Prior to analyse the data, we applied standard filtering
141 to both data sets to remove OTUs associated to weak counts, that could hamper the statistical
142 analysis. First, OTUs whose total number of sequences was lower than the total number of
143 samples have been removed. Second, a filter related to the yearly prevalence of each OTU:
144 those consistently detected in less than 10% of the samples of each year have been removed.
145 The application of these filters on both, entire and reduced data sets, lead to the selection of
146 127 and 120 OTUs to be included in the subsequent statistical analyses, respectively.

147

148

149 *Statistical analysis*

150 The statistical framework used to describe our data sets is the multivariate Poisson
151 lognormal (PLN) distribution (Aitchison and Ho, 1989). This statistical distribution is adapted
152 to multivariate count data and shows an expected over-dispersion property compared to the
153 standard Poisson distribution. The main idea behind the PLN model is to represent all the
154 dependency structure between the OTUs in a latent (hidden) multivariate Gaussian layer,
155 while a Poisson distribution in the observation space of the data is used to model counts and
156 noise. Moreover, the PLN framework can be easily interpreted as a Generalized Multivariate
157 Linear Model; thus it naturally allows one to include effects of covariates or offsets like in a
158 standard GLM. All the statistical analyses performed in our paper rely on the PLN model and
159 the variants implemented in the R package PLNmodels (Chiquet *et al.*, 2019). In particular,
160 PLNmodels includes variants to perform standard multivariate analyses for count tables, such
161 as PCA (Principal Component Analysis), LDA (Linear Discriminant Analysis), or sparse Network
162 reconstruction (aka sparse inference of (inverse) covariance matrix). Additional
163 methodological details can be found in (Chiquet *et al.*, 2018a, 2018b).

164 In all the models fitted in this paper, we accounted for the sampling effort (that is, the
165 sequencing depth of each sample) by adding an offset term corresponding to the (log) total
166 sum of count per sample obtained prior to any filtering. Moreover, in order to correct for any
167 spurious effect induced by a given year of sampling that may hide others effects such as
168 seasonality, we included a covariate to account for the year of sampling in all our models.

169 Principal component analysis was performed with the PCA variant of PLN and the
170 PLNPCA R function (Chiquet *et al.*, 2018a), which performs probabilistic Poisson PCA. Network
171 analysis was performed with the PLNnetwork function, which adds a sparsity constraint on
172 the inverse covariance matrix in the latent Gaussian layer (Chiquet *et al.*, 2018b). All the
173 statistical analyses were performed on R 3.6.1. (R Core Team, 2018).

174

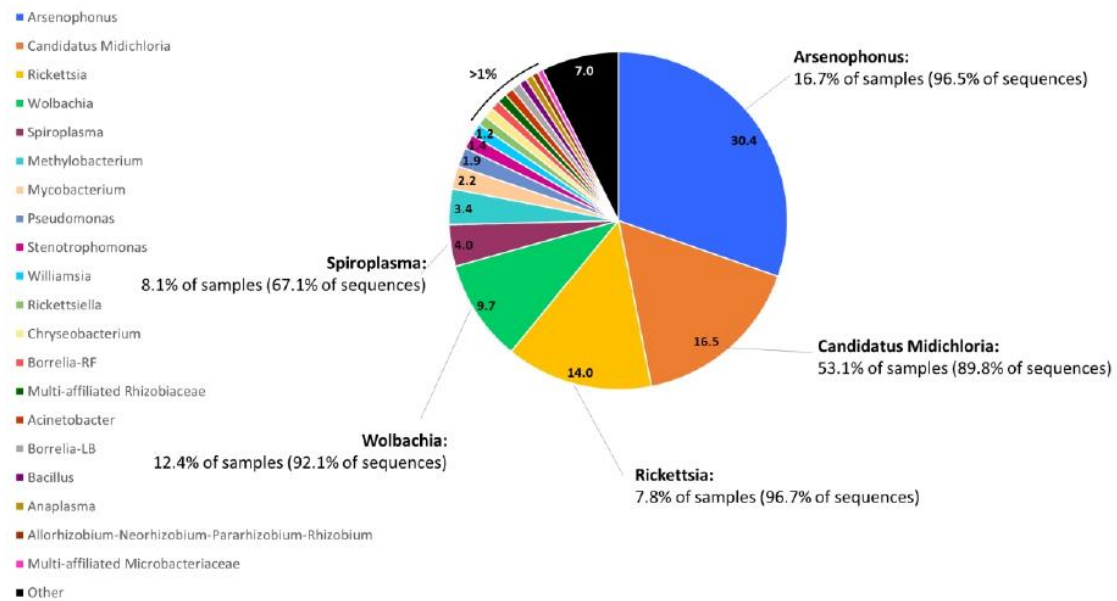
175 **Results**

176 • ***Ixodes ricinus* microbiota diversity and composition**

177 Considering the microbiota of all the 371 nymphs, we found 353 OTUs. Among them,
178 307 belong to 109 identified genera, and 46 OTUs belong to multi-affiliated or unknown
179 genera spread in 15 families. The mean Shannon diversity index was previously estimated
180 (Lejal *et al.*, 2019a) to 2.1 (SD= +/- 0.8) and varied between 0.3 (nymph sampled in April 2016)

181 and 3.8 (nymph sampled in October 2014). Genera with proportions higher than 0.5% of all
182 sequences in the dataset belonged to *Arsenophonus*, *Candidatus Midichloria*, *Rickettsia*,
183 *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*,
184 *Stenotrophomonas*, *Williamsa*, *Rickettsiella*, *Chryseobacterium*, *Borrelia*, *Bacillus*, *Anaplasma*,
185 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*. It was also the case of two multi-
186 affiliated OTUs belonging to Rhizobiaceae and Microbacteriaceae families. In total, these
187 sequences represented 93% of all sequences in the dataset (**Figure 1**).

188 Although these genera represent a large number of sequences identified in the
189 dataset, it is important to note that their presence is not equally distributed in all the samples.
190 To investigate this point, we determined, for the five first represented genera in term of total
191 number of sequences (*Arsenophonus*, *Ca. Midichloria*, *Rickettsia*, *Wolbachia* and
192 *Spiroplasma*), the number of samples that harbored them, beyond 10% of the total number
193 of sequences contained in each sample. For *Arsenophonus*, while this genus corresponded to
194 30% of the total number of sequences in the dataset, only 16.7% of samples harbored
195 members of this genus. This 16.7% of samples contained 96.5% of the total number of
196 sequences in the dataset for this genus. Concerning the endosymbiont *Ca. Midichloria*, its
197 repartition in nymph samples seems broader than for *Arsenophonus*, with 53% of nymphs
198 harboring it, and containing 90% of the total number of *Ca. Midichloria* sequences.
199 Concerning *Rickettsia*, it seems that a few samples are likely to harbor a large proportion of
200 sequences, with 7.8% of the samples containing 97% of the sequences identified in the total
201 dataset. Similarly, 92.1% of sequences belonging *Wolbachia*, were detected in 12.4% of the
202 samples. Finally, 8.1% of samples harboring *Spiroplasma*, contained 67% of the total number
203 of sequences corresponding to this genus in the dataset.



204

205 **Figure 1: Most dominant genera in the *Ixodes ricinus* microbiota.** Selected genera and multi-affiliated
 206 OTUs are those representing more than 0.5% of the total number of sequences detected in the entire
 207 dataset. Numbers gave in the pie chart correspond to this percentage.

208

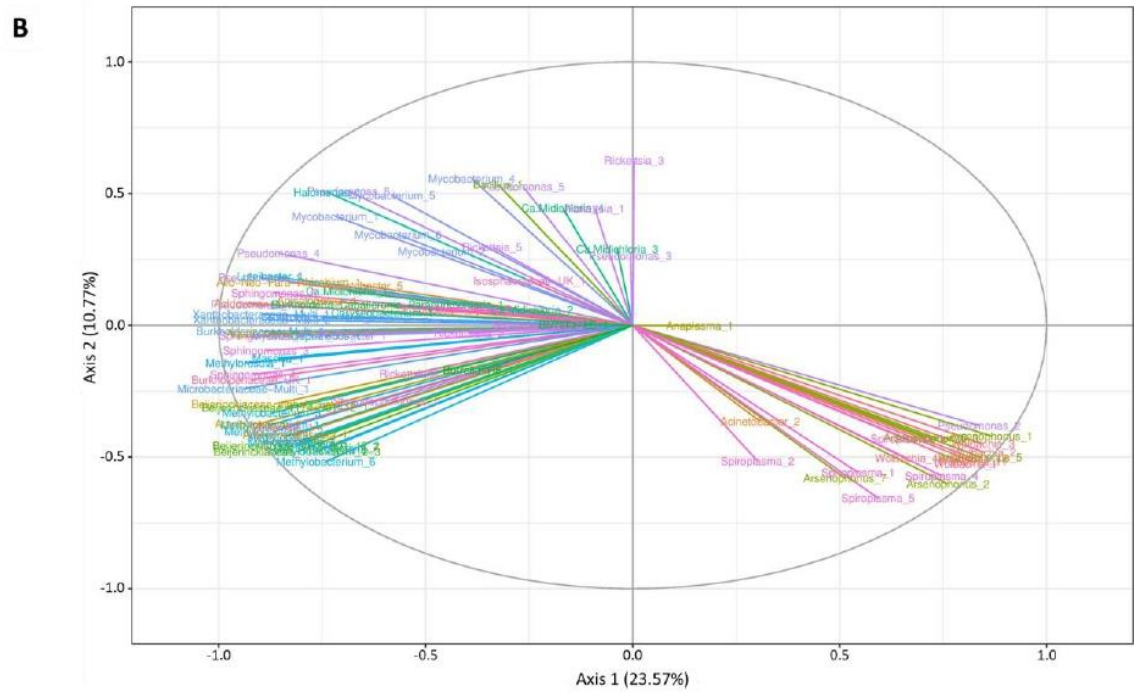
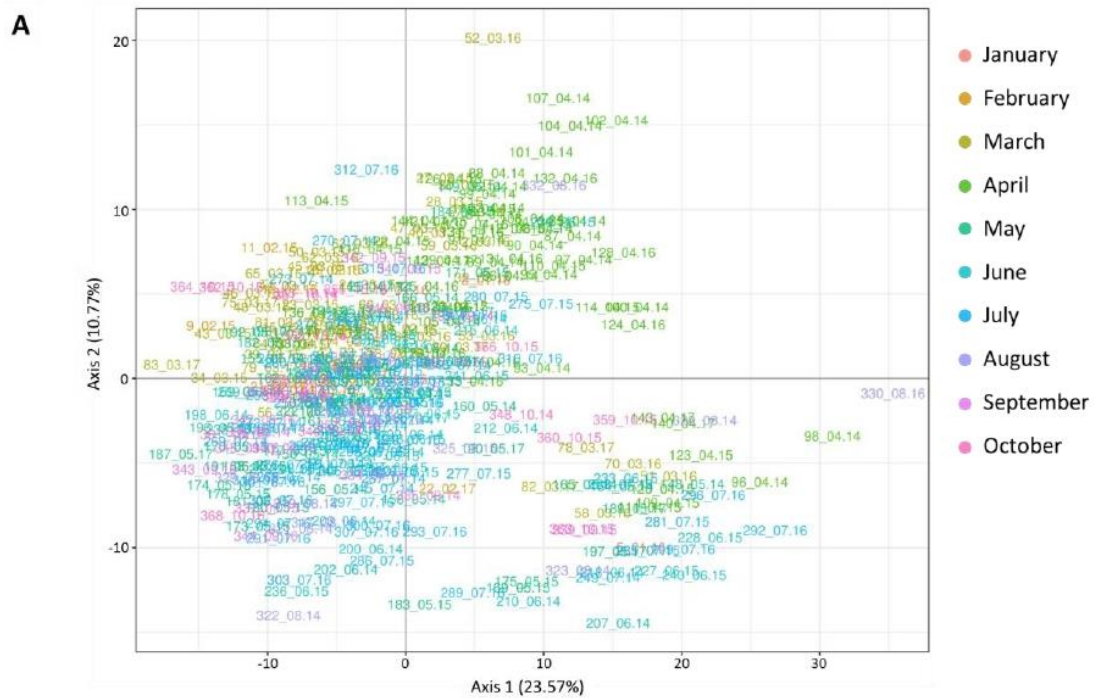
209 **● Temporal dynamics of the *Ixodes ricinus* microbiota**

210 - Principal component analysis performed on the entire dataset:

211 The principal component analysis was applied in this study to determine the temporal
 212 variation of the tick microbiota, based on the relative abundances of microbes (**Figure 2**). The
 213 first two principal components PC1 and PC2 explained 23.57% and 10.77% of the total
 214 variance, respectively (**Figure 2A**). All samples were clustered into three groups. The first one
 215 comprised 30 to 40 nymphs and was projected in the lower right quarter. This cluster was
 216 opposed to the rest of the analyzed samples, mainly according to the first axis. This small
 217 “outsider” cluster was composed of nymphs collected during different months and that seems
 218 to be randomly projected regarding the month variable. The remaining samples were divided
 219 into two clusters which were represented by ticks collected in March/April and
 220 May/June/July/August/September respectively. Note that these two clusters partially
 221 overlap.

222 Four main OTUs seem to drive the formation of the “outsider” cluster: *Wolbachia*
 223 (number 1, 2, 3, 4, 11, and 12), *Arsenophonus* (number 1, 2, 3, 5, 6 and 7), *Spiroplasma*
 224 (number 1, 3, 4 and 5) and *Pseudomonas* (number 2) (**Figure 2B**). The identification of the

225 remaining OTUs driving the two other clusters is more tricky as they are not distinctly
226 separated. In any way, it looks that OTUs belonging to *Methylobacterium* and *Sphingomonas*
227 genus, as well as those belonging to the Xhantobacteraceae, Burkholderiaceae,
228 Beijerinckiaceae families and OTUs *Actinomycespora_1*, *Williamsa_1*, *Massilia_1*,
229 *Methylorosula_1*, *Amnibacterium_1*, *Pseudomonas_1-4-7* strongly explained the variance
230 along the negative part of the second axis. As mentioned in the material and methods section,
231 we also performed a PCA on our dataset after excluding *Wolbachia* and *Arsenophonus*
232 positive samples.

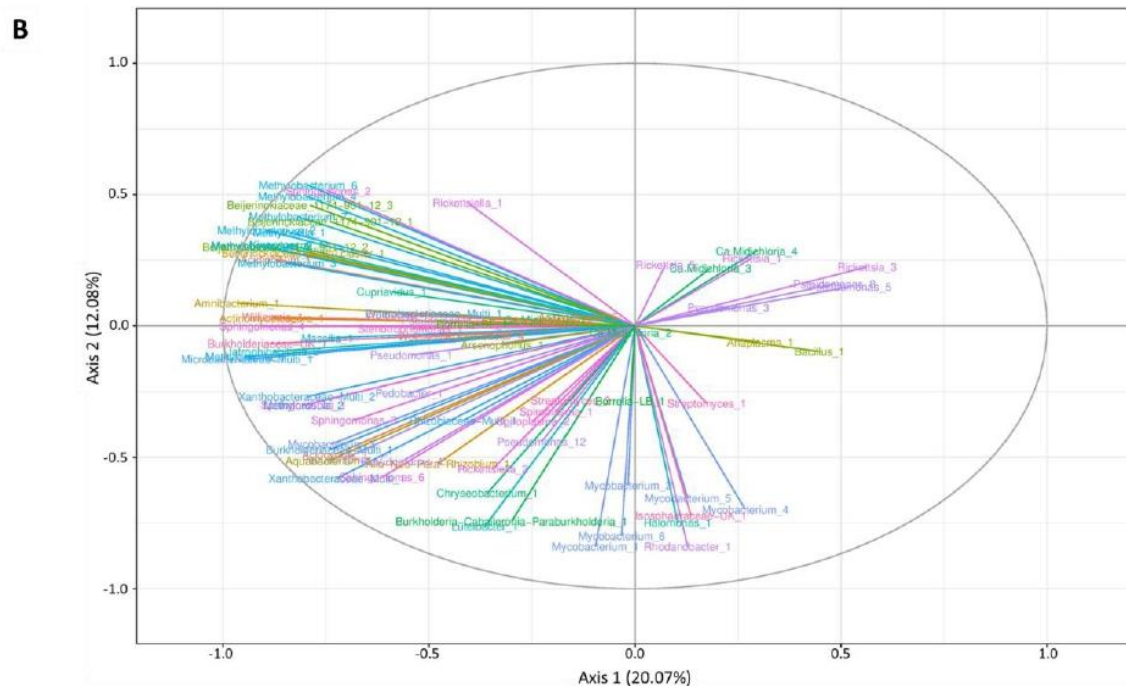
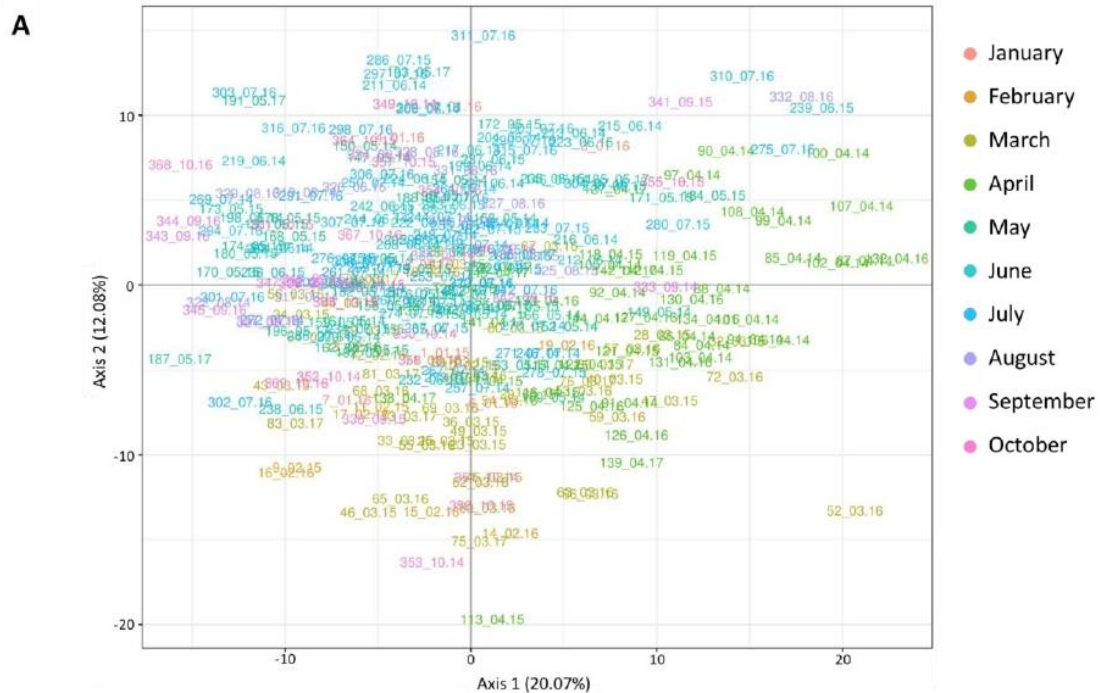


233
 234 **Figure2: Principal component analysis performed on the entire dataset, presented according to axes**
 235 **1 (23.57%) and 2 (10,77%). (A) Sample projection of the PCA. Samples are coloured according to the**
 236 **month of tick sampling. Plotted samples are named as following: ID_Month.Year. (B) Variable factor**
 237 **map of the PCA. OTUs are coloured by genera or by OTUs when belonging to a multi-affiliated (Multi)**
 238 **or unknown (UK) genera.**

239 - Principal component analysis performed on the dataset excluding *Wolbachia*
240 and *Arsenophonus* positive samples:

241 This second principal component analysis was applied to determine the temporal
242 variation of the tick microbiota excluding the *Wolbachia* and *Arsenophonus* positive samples
243 as these two genera could not be members of the tick microbiota (this will be discussed in the
244 discussion part). The first two principal components PC1 and PC2 explained 20.07% and
245 12.08% of the total variance, respectively (**Figure3A**). The clustering according to months is
246 still visible with samples clustered into three groups: the cluster 1 with samples collected in
247 March, the cluster 2 with samples collected in April and the third cluster regrouping samples
248 collected in May/June/July/August/September. Samples collected in April (Cluster 2) are
249 distributed all along the second axis, but only on the right part of the plot, and therefore
250 seemed to be separated from the rest of the community mainly *via* the first axis. By contrast,
251 samples in the cluster 1 collected in March seemed to be distributed all along the first axis,
252 but mainly on the bottom of the plot, and are consequently separated from the rest of the
253 community mainly through the second axis. For samples belonging to cluster 3, all of them
254 seemed to be globally distributed on the top left corner of the plot, distinct the two other
255 clusters 1 and 2 mainly through first and second axis, respectively.

256 Looking at the variable factor map (**Figure 3B**), we can see that the positive part of the
257 first axis (where are mainly distributed nymph sampled in April), seemed to be mainly
258 explained by *Rickettsia_3* and *Pseudomonas_5-8*. Let's note that their effect is not as strong
259 as those observed on the negative part of the same axis and implicating mainly
260 *Amibacterium_1*, *Sphingomonas_4*, *Williamsia_1*, *Actinomycetospora_1*, *Jatrophihabitans_2*,
261 *Methylorosula_1*, *Microbacteriaceae-Multi_1* and *Burkholderiaceae_UK_1*. The negative part
262 of the second axis (where samples of the Cluster 1 are mainly distributed), seemed to be
263 mainly explained by *Mycobacterium_1-4-5-6*, *Isosphaeraceae-UK_1*, *Halomonas_1*,
264 *Rhodanobacter_1*, *Luteibacter_1*, *Chryseobacterium_1* and *Burkholderia-Caballeronia-*
265 *Paraburkholderia_1*.



266
 267 **Figure 3: Principal component analysis performed on the dataset excluding *Wolbachia* and**
 268 ***Arsenophonus* positive samples, presented according to axes 1 (20.07%) and 2 (12,08%). (A) Sample**
 269 **projection of the PCA. Samples are coloured according to the month of tick sampling. Plotted samples**
 270 **are named as following: ID_Month.Year. (B) Variable factor map of the PCA. OTUs are coloured by**
 271 **genera or by OTUs when belonging to a multi-affiliated (Multi) or unknown (UK) genera.**
 272

273 ● **Network that links the *Ixodes ricinus* microbiota members**

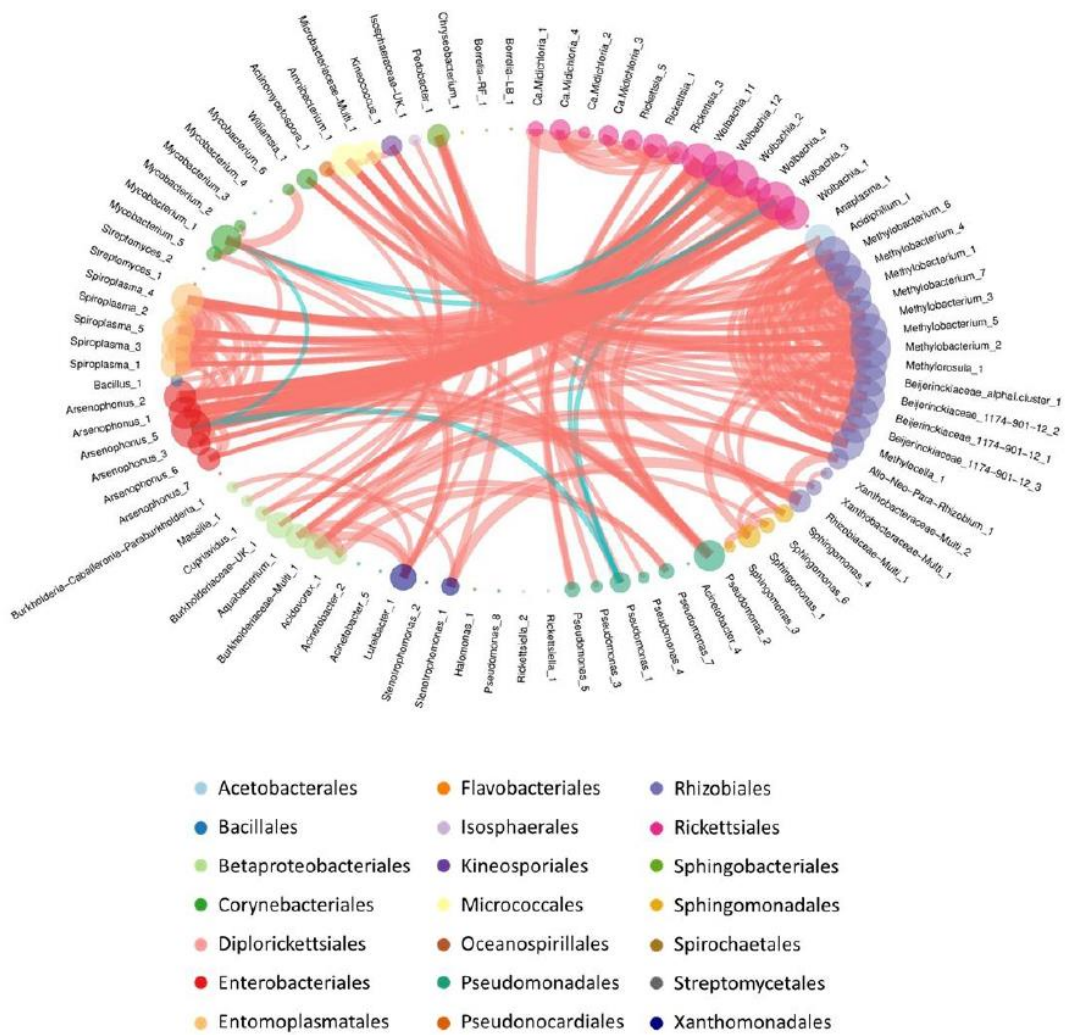
274 - *Network performed on the entire dataset*

275 Thanks to the network analysis, we observed a total of 244 significant partial
276 correlations between OTUs. Interestingly, 97.5% of these partial correlations were positive as
277 we only detected six negative ones (**Figure 4**).

278 Positive partial correlations frequently occurred between OTUs belonging to the same
279 genus or family, as it is the case for OTUs belonging to the genera: *Wolbachia*, *Arsenophonus*,
280 *Spiroplasma*, *Methylobacterium*, Beijerinckiaceae, Ca. *Midichloria*, *Rickettsia*, *Mycobacterium*
281 and *Sphingomonas*. By contrast, this pattern was not observed between any of the
282 *Pseudomonas* OTUs.

283 In the network, three main groups were observed. The first one, linking mainly several
284 OTUs belonging to *Wolbachia*, *Arsenophonus* and *Spiroplasma* genera altogether. Note that
285 *Spiroplasma* was mainly connected with *Arsenophonus* and *Wolbachia*. To these partial
286 correlations are added, one particular OTU *Pseudomonas_2*, that is linked with several OTUs
287 belonging to *Arsenophonus* and *Wolbachia*. The second main network was composed of
288 almost all OTUs belonging to *Methylobacterium*, connected to almost all OTUs of the
289 Beijerinckiaceae family. Several members of this family also exhibited partial correlations with
290 the OTUs: *Acidiphilium_1*, Burkholderiaceae-UK_1, *Pedobacter_1*, *Kineococcus_1*,
291 Microbacteriaceae-Multi_1, *Amnibacterium_1*, *Actinomycetospora_1*, *Williamsa_1*. Finally, a
292 third interesting group, smaller than the two previous as it implied only 6 OTUs, was
293 characterized by partial correlations between OTUs belonging to Ca. *Midichloria_3-4*, and
294 *Rickettsia_1-3-5*. Let's note that *Rickettsia_1-3* are both also linked to *Pseudomonas_5*.

295 Few represented, negative partial correlations have also been observed between
296 *Pseudomonas_1* and both *Arsenophonus_5* and *Wolbachia_2* and 3. *Mycobacterium_1* also
297 harboured negative partial correlations with *Arsenophonus_5* and *Wolbachia_3* and 12.



298

299 **Figure 4: Network analysis. Representation of the significant partial correlations detected between**
 300 **OTUs of the tick microbiota. OTU circles are coloured by Taxonomic order. These circles represent**
 301 **nodes of the networks. Their size is proportional to the sum of the incoming edge weights. Thickness**
 302 **of the edge are proportional to the strength of the observed partial correlation. Positive partial**
 303 **correlations are represented by red edges, negative partial correlations are represented by turquoise**
 304 **edges.**

305

306 Discussion

307

- ***Ixodes ricinus* microbial diversity and composition**

308

Investigating the microbiota of the 371 *I. ricinus* nymphs, we identified 109 genera,

309

that is in the range of what it has been previously observed in this tick species (Nakao *et al.*,

2013; Estrada-Peña *et al.*, 2018). Let's note that Gofton *et al.* (2015) only detected 14 genera in their *I. ricinus* ticks. However, the use of blocking primers against *Ca. Midichloria*, allowed them to increase the number of detected genera which reached 89 genera. Similarly, the mean Shannon diversity index we estimated (=2.1) is in the range of what it has been previously observed in the literature for *Ixodes* microbial community diversity, ranging from 1.4 to 3.7 (Heise *et al.*, 2010; Van Treuren *et al.*, 2015; Zolnik *et al.*, 2016; Portillo *et al.*, 2019). However, these values are commonly known to fluctuate, mainly according to the tick stages (males usually harboring a higher diversity than nymph, harboring a higher diversity than females), the tick species or localization, and are therefore difficult to compare (Carpi *et al.*, 2011; Lalar *et al.*, 2012; Menchaca *et al.*, 2013; Van Treuren *et al.*, 2015; Trout Fryxell and DeBruyn, 2016; Zolnik *et al.*, 2016; Gurfield *et al.*, 2017; René-Martellet *et al.*, 2017; Estrada-Peña *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2019). Furthermore, the fact that not all studies used negative controls to identify potential contaminants and remove them from their datasets calls for caution in attempts to draw conclusions about these differences, particularly when we know that these contaminating sequences can represent more than 50% of sequences detected in tick samples (Lejal *et al.*, 2019a). In our dataset, almost 75% of the sequences belonged to five genera: *Arsenophonus*, *Ca. Midichloria*, *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Spiroplasma*, all of them corresponding to maternally inherited bacteria circulating in arthropods (Duron *et al.*, 2018). The high prevalence of these genera in the dataset could suggest they might be widely distributed all over the samples. It was clearly the case for *Ca. Midichloria*, for which a high number of sequences were found in almost 50% of tick samples. For the other genera (*Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Wolbachia* and *Arsenophonus*), most of their sequences were found in less than 17% of samples (7.8%, 8.1%, 12.4% and 16.7% respectively). Concerning the *Ca. Midichloria* repartition, this result is completely in concordance with previous observations estimating that almost 100% of *I. ricinus* females and larvae, and almost 50% of nymphs and males were infected by this endosymbiont (Beninati *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 2006; Sasser *et al.*, 2006; Olivieri *et al.*, 2019). Concerning *Rickettsia*, it is likely that this detection correspond to *R. helvetica*, previously detected in these samples (Lejal *et al.*, 2019b) and which exhibits a high bacterial load in ticks (Schicht *et al.*, 2012; Raulf *et al.*, 2018). Concerning *Arsenophonus* and *Wolbachia*, while the high number of sequences detected in the dataset could suggest that they constitute dominant members of the *I. ricinus* microbial communities, their presence in *I. ricinus* ticks is likely to be correlated to the presence of the tick parasitoid

342 wasp, *Ixodiphagus hookeri* (Plantard *et al.*, 2012; Bohacsova *et al.*, 2016). Finally, among the
343 most detected genera in the *I. ricinus* microbial communities, *Spiroplasma* are known to be
344 symbionts of ticks and many other arthropods (Binetruy *et al.*, 2019a). As previously
345 mentioned, most of their sequences were found in 8% of tick samples, that's is coherent with
346 the previous assumption that members of this genera would represent secondary symbionts
347 (Binetruy *et al.*, 2019a), which are known to be not essential to their host survival but might
348 confer conditional adaptive advantages to their host, such as protecting their host against
349 pathogens and natural enemies (Oliver *et al.*, 2003; Guay *et al.*, 2009). Among the remaining
350 genera (> 0.5% of the total number of sequences in the dataset), several corresponded to
351 well-known genera circulating in *I. ricinus* ticks, such as *Rickettsiella* (that is also a maternally
352 inherited arthropod bacteria), *Borrelia* (Lyme Borreliosis and Recurrent Fever) and
353 *Anaplasma*. Some others such as *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*,
354 *Stenotrophomonas*, *Williamsia*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, *Allorhizobium*-
355 *Neorhizobium*-*Pararhizobium*-*Rhizobium*, as well as multi-affiliated OTUs belonging to
356 Rhizobiaceae and Microbacteriaceae, previously detected in ticks including *I. ricinus* (Carpi *et*
357 *al.*, 2011; Nakao *et al.*, 2013; Estrada-Peña *et al.*, 2018; Hernández-Jarguín *et al.*, 2018), have
358 already been identified as bacteria present in the environment (Towner, 2006; Falkinham,
359 2015; Kämpfer *et al.*, 2015; Horn *et al.*, 2016; An and Berg, 2018; Green and Ardley, 2018).
360 Many questions arise about these environmental taxa. Do they belong to the internal tick
361 microbiota or may they correspond to cuticular contaminations? Probably both. Indeed,
362 Binetruy *et al.* (2019b), demonstrated that the tick surface sterilization using ethanol (as we
363 did in the present study) did not efficiently remove bacterial DNA from the tick cuticle
364 compared to bleach. They also showed that environmental taxa, only detected in ethanol
365 cleaned entire ticks, belonged to the same family than those directly detected on the tick
366 cuticle by swabbing. However, let's note that they also found some of these taxa in the gut of
367 ticks and Hernández-Jarguín (2018), while studying the microbiota in organs of *I. ricinus* ticks
368 previously cleaned with bleach, also detected bacterial genera commonly found in the
369 environment.

370

371

372 ● **Temporal dynamics of *Ixodes ricinus* microbial communities**

373 We first performed a principal component analysis on the entire dataset to
374 characterize the temporal dynamics of the *I. ricinus* microbiota. Our results provide evidence
375 that the *I. ricinus* microbial communities exhibit marked temporal variations with two main
376 clusters, a first one defined by microbial communities identified in March-April and another
377 one with microbial communities identified from May to September. A third cluster was also
378 identified and corresponded to nymphs collected all over the years. This “outsider” cluster
379 was mainly composed by members belonging to the genera *Wolbachia*, *Arsenophonus* and
380 *Spiroplasma*. While the presence of *Wolbachia* and *Arsenophonus* was probably linked to the
381 presence of *I. hookeri* in ticks (Tijssse-Klasen *et al.*, 2011; Plantard *et al.*, 2012; Bohacsova *et*
382 *al.*, 2016), we hypothesized that their presence in our dataset could alter the visualization of
383 the temporal dynamics of the *I. ricinus* microbial communities. We therefore chose to
384 perform another PCA analysis after removing all samples harboring (beyond 10% of the total
385 number of sequences per sample) one or both genera *Wolbachia* and *Arsenophonus*. As
386 expected, the new PCA performed on the “reduced” dataset allowed to improve the
387 separation between clusters. We finally distinguished three main clusters. Whatever the year
388 of sampling, this analysis mainly distinguished ticks sampled in March (cluster 1), from those
389 sampled in April (cluster 2), from those sampled from May to September (Cluster 3).
390 Interestingly, this pattern is likely to be redundant from one year to another suggesting that
391 factors influencing the tick microbial community would be probably the same during the three
392 consecutive years.

393 Globally, we can observe that the OTUs that better explained this dynamic of the tick
394 microbial community structure were not the tick symbionts or pathogens but corresponded
395 to genera or families characteristics of the environment (i.e. *Methylobacterium*,
396 *Mycobacterium*, *Amnibacterium*, *Williamsia*, *Jatrophihabitans*, Beijerinckiaceae,
397 Xhantobacteriaceae and Burkholderiaceae). In the event that these OTUs would belong to
398 cuticular contamination (as discussed above), the observed fluctuations could therefore
399 correspond to variations of the environmental microbiota (Baldrian, 2017). Nonetheless,
400 these OTUs could also correspond to bacteria acquired by ticks from the environment, during
401 the water uptake mechanism for example, or from other orifices of the tick such as spiracles

402 and anal port. This was already suggested by Narasimhan *et al.* (2015) while they observed
403 that tick hatched in sterile environment harbored a significantly different gut microbiota than
404 those hatched in “normal” conditions (Narasimhan *et al.*, 2014). In such a case, temporal
405 variations observed in our analysis would also be due to differences of environment
406 microbiota composition. Otherwise, abiotic factors such as temperature, that is likely to
407 follow a yearly redundant pattern, have been demonstrated to influence the microbiota
408 diversity of *I. scapularis* ticks (Thapa *et al.*, 2019). Furthermore, blood meal and host identity
409 were also shown to influence the tick microbiota diversity (Heise *et al.*, 2010; Narasimhan *et*
410 *al.*, 2014; Swei and Kwan, 2017; Landesman *et al.*, 2019).

411

412 • **The *Ixodes ricinus* microbiota: a good way to investigate the tick infections by**
413 ***Ixodiphagus hookeri*?**

414 As previously mentioned, we detected an “outsider” cluster, composed from 30 to 40
415 nymphs collected all over the years and mainly driven by bacterial members belonging to the
416 genera *Wolbachia*, *Arsenophonus* and *Spiroplasma*. The presence of species belonging to
417 *Wolbachia* and *Arsenophonus* in *I. ricinus* ticks were associated to the presence of the
418 parasitoid wasps, *Ixodiphagus hookeri* (Plantard *et al.*, 2012; Bohacsova *et al.*, 2016), that is
419 strictly associated with tick for its development. In their study, Plantard *et al.* (2012) reported
420 that *I. hookeri* was infested at almost 100% prevalence by *Wolbachia pipientis*. They also
421 showed that all unfed nymphs parasitized by *I. hookeri* also harboured *Wolbachia*, while non
422 infected ticks were *Wolbachia*-free (with only one exception). *Wolbachia* was vertically
423 transmitted from the female *I. hookeri* to its eggs and subsequent generation harboured
424 *Wolbachia*. Similarly, Bohacsova *et al.* (2016) detected the symbiont *Arsenophonus nasoniae*
425 only in nymphs parasited by the wasp *I. hookeri*, whose population was harboring at almost
426 30% prevalence with *A. nasoniae*. In this context, through the study of tick microbial
427 communities, we suggest that identifying the temporal dynamics of both *Wolbachia* and
428 *Arsenophonus* could serve as a proxy to characterize both the infection rate and temporal
429 dynamics of *I. hookeri* in *I. ricinus*.

430

431 • ***Ixodes ricinus* microbial community interactions**

432 Network analysis revealed that more than 97% of interactions between members of the
433 *I. ricinus* microbial community were positive. Taxa with positive associations have generally
434 been interpreted as functional guilds of organisms performing similar or complementary
435 functions (Eiler *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2014) or feature interactions shaped by interspecies
436 cross-feeding (Fuhrman and Steele, 2008), although sometimes they may, to a large extent,
437 reflect similar preferred conditions (Berdjeb *et al.*, 2018). Analogously, negative associations
438 have been suggested to reflect interactions including competition and niche partitioning. The
439 vast majority of positive correlations observed could therefore suggest that tick microbial
440 communities could favor mutualism and perform similar or complementary functions. But
441 let's keep in mind that correlations observed during this study were obtained by examining
442 entire individuals, and may impair the observation of associations occurring at a finer scale
443 (e.g. organs) (Pollet *et al.*, 2020).

444 Based on the network analysis, we were interested to three main groups of partial
445 correlations between tick microbial community members. The first one highlighted the strong
446 links between *Wolbachia*, *Arsenophonus* and *Spiroplasma*. As previously mentioned,
447 detecting *Wolbachia* and *Arsenophonus* in a couple of ticks probably suggested the presence
448 of the parasitoid *I. hookeri* in these ticks. Interestingly, *Spiroplasma*, identified as a tick and
449 other arthropod symbionts (Tully *et al.*, 1981, 1995; Henning *et al.*, 2006; Weinert *et al.*, 2007;
450 Duron *et al.*, 2008, 2017), was highly linked to the dynamics of these two genera. Identified
451 as a “male killer” in several other arthropods (Hurst *et al.*, 1999; Majerus *et al.*, 1999, 2000;
452 Jiggins *et al.*, 2000; Tinsley and Majerus, 2006; Sanada-Morimura *et al.*, 2013), no evidence of
453 sex-ratio distortion has been observed in the *Rhipicephalus decoloratus* tick population
454 infected with *Spiroplasma ixodetis* (Binetruy *et al.*, 2019a). However, based on the fact that
455 the detection of both *Wolbachia* and *Arsenophonus* is probably due to the infection of ticks
456 by *I. hookeri*, we hypothesize that *Spiroplasma* presence could be upregulated as a defensive
457 response mechanism against *I. hookeri*, as previously mentioned in *Drosophila melanogaster*
458 infested by two species of parasitoid wasp (Xie *et al.*, 2014). Nevertheless, we cannot rule out
459 the hypothesis that, while identified in a large variety of tick species (Binetruy *et al.*, 2019a),
460 *Spiroplasma* could correspond to a symbiont of *I. hookeri*. Let's note that contrary to

461 *Spiroplasma*, two other OTUs were negatively correlated with both *Arsenophonus* and
462 *Wolbachia* genera: *Pseudomonas_1* and *Mycobacterium_2*. In this case, the presence of *I.*
463 *hookeri* might, by a direct or indirect way, have a negative impact on these OTUs.

464 Another group, including *Methylobacterium*, OTUs of the Beijerinckiaceae family,
465 *Acidiphilium_1*, Burkholderiaceae-UK_1, *Pedobacter_1*, *Kineococcus_1*, Microbacteriaceae-
466 Multi_1, *Amnibacterium_1*, *Actinomycespora_1*, *Williamsa_1*, exhibited numerous positive
467 interactions. All these OTUs belong to genera and families of micro-organisms commonly
468 found in the environment (Evtushenko and Takeuchi, 2006; Jiang *et al.*, 2008; Lee, 2009;
469 Yamamura *et al.*, 2011; Eberl and Vandamme, 2016; Horn *et al.*, 2016; Viana *et al.*, 2018), that
470 may potentially inhabiting ticks. The high connectivity displayed by these OTUs may reflect
471 similar functions between OTUs adapted to various environmental conditions (functional
472 redundancy) or on the contrary may show reduced functional capabilities of each OTU and
473 thus a complementary functional role of these taxa in ticks. All these hypotheses will have to
474 be investigated in future works studying the functional ecology of tick microbes.

475 Finally, we interestingly observed interactions between one Ca. *Midichloria* OTU and
476 several members of the genus *Rickettsia*. Some of these taxa might be pathogenic agents as
477 *Rickettsia helvetica* has already been detected in several of these samples (Lejal *et al.*, 2019b).
478 Considering the strong prevalence of Ca. *Midichloria* in *I. ricinus* ticks, the positive interactions
479 between this OTU and *Rickettsia* might suggest a facilitating role of Ca. *Midichloria* in the
480 *I. ricinus* colonisation by *Rickettsia*. This hypothesis is in accordance with Budachetri *et al.*'s
481 results (2018) which observed positive correlation between Ca. *Midichloria mitochondrii* load
482 and *Rickettsia parkeri* presence in the tick *Amblyomma maculatum*. Our findings might be a
483 first step in the understanding of potential interactions between pathogens and the *I. ricinus*
484 microbiota and might illustrate the potential role of the *I. ricinus* symbiont in the tick-borne
485 pathogen presence. Let's note that no evident correlation has been detected between other
486 tick-borne pathogens such as *Borrelia* and *Anaplasma* and the rest of the *I. ricinus* microbiota.
487 This observation is in accordance with the Swei and Kwan findings (2017) which examined
488 *I. pacificus* ticks that were *B. burgdorferi* positive or negative and found no significant
489 differences in microbiota species richness or composition. On the other hand, these
490 observations might be surprising knowing that recent studies mentioned strong links between

491 the microbiota of *I. scapularis* and the pathogen acquisition. In their study, Narasimhan *et al.*
492 (2014) indeed showed the influence of the tick microbiota on the *Borrelia burgdorferi* s.s.
493 acquisition. Conversely, the presence of *Anaplasma phagocytophilum* in *I. scapularis* would
494 modify the gut microbiota whose modification would disrupt the integrity of the gut
495 membrane and help the pathogen entry (Abraham *et al.*, 2017). These results could suggest
496 that interactions between tick-borne pathogen and microbiota might be tick species
497 dependant and/or that other factors (i.e. abiotic factors, the microbiota composition, the tick
498 physiology, the investigated organ) would have an effect on these interactions. Nevertheless,
499 the absence of correlations with particular members of the microbiota does not necessarily
500 mean that their presence does not affect the composition and overall structure of these
501 communities.

502

503 **Acknowledgements**

504 This work was supported by the métaprogramme “Metaomics and microbial
505 ecosystems” (MEM) and the Métaprogramme “Adaptation of Agriculture and Forests to
506 Climate Change” (ACCAF) granted by the French National Institute for Agriculture,
507 Alimentation and Environment Research (France). The authors would like to thank Sabine
508 Delannoy and the IdentityPath genomic platform that allowed us to perform part of the
509 experiments in their laboratory. We also thank Maxime Galan for providing index sequences
510 and stimulating discussions.

511

512 **References**

- 513 Abraham, N.M., Liu, L., Jutras, B.L., Yadav, A.K., Narasimhan, S., Gopalakrishnan, V., et al.
514 (2017) Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote
515 infection. *Proc Natl Acad Sci* **114**: E781–E790.
- 516 Aitchison, J. and Ho, C.H. (1989) The multivariate Poisson-log normal distribution.
517 *Biometrika* **76**: 643–653.
- 518 An, S. and Berg, G. (2018) *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends Microbiol* **26**: 637–638.
- 519 Baldrian, P. (2017) Microbial activity and the dynamics of ecosystem processes in forest
520 soils. *Curr Opin Microbiol* **37**: 128–134.

521 Beninati, T., Lo, N., Sacchi, L., Genchi, C., Noda, H., and Bandi, C. (2004) A Novel Alpha-
522 Proteobacterium Resides in the Mitochondria of Ovarian Cells of the Tick *Ixodes*
523 *ricinus*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2596–2602.

524 Berdjeb, L., Parada, A., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2018) Short-term dynamics and
525 interactions of marine protist communities during the spring–summer transition.
526 *ISME J* **12**: 1907–1917.

527 Binetruy, F., Bailly, X., Chevillon, C., Martin, O.Y., Bernasconi, M.V., and Duron, O. (2019a)
528 Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers
529 between ticks and other arthropods. *Ticks Tick-Borne Dis* **10**: 575–584.

530 Binetruy, F., Dupraz, M., Buysse, M., and Duron, O. (2019b) Surface sterilization methods
531 impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasit Vectors* **12**: 268.

532 Bohacsova, M., Mediannikov, O., Kazimirova, M., Raoult, D., and Sekeyova, Z. (2016)
533 *Arsenophonus nasoniae* and *Rickettsia* Infection of *Ixodes ricinus* Due to Parasitic
534 Wasp *Ixodiphagus hookeri*. *PLOS ONE* **11**: e0149950.

535 Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M., and Duron, O. (2017) The Tick
536 Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and
537 Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:.

538 Budachetri, K., Kumar, D., Crispell, G., Beck, C., Dasch, G., and Karim, S. (2018) The tick
539 endosymbiont *Candidatus Midichloria mitochondrii* and selenoproteins are essential
540 for the growth of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick vector. *Microbiome* **6**: 141.

541 Cabezas-Cruz, A., Pollet, T., Estrada-Peña, A., Allain, E., Bonnet, S.I., and Moutailler, S. (2018)
542 Handling the Microbial Complexity Associated to Ticks. *Ticks Tick-Borne Pathog.*

543 Carpi, G., Cagnacci, F., Wittekindt, N.E., Zhao, F., Qi, J., Tomsho, L.P., et al. (2011)
544 Metagenomic Profile of the Bacterial Communities Associated with *Ixodes ricinus*
545 Ticks. *PLOS ONE* **6**: e25604.

546 Chiquet, J., Mariadassou, M., and Robin, S. (2019) PLNmodels: Poisson Lognormal Models.
547 Chiquet, J., Mariadassou, M., and Robin, S. (2018a) Variational inference for probabilistic
548 Poisson PCA. *Ann Appl Stat* **12**: 2674–2698.

549 Chiquet, J., Mariadassou, M., and Robin, S. (2018b) Variational inference for sparse network
550 reconstruction from count data. *ArXiv180603120 Stat.*

551 Chow, C.-E.T., Kim, D.Y., Sachdeva, R., Caron, D.A., and Fuhrman, J.A. (2014) Top-down
552 controls on bacterial community structure: microbial network analysis of bacteria,
553 T4-like viruses and protists. *ISME J* **8**: 816–829.

554 Coipan, E.C., Jahfari, S., Fonville, M., Maassen, C., van der Giessen, J., Takken, W., et al.
555 (2013) Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*.
556 *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 36.

557 Duron, O., Binetruy, F., Noël, V., Cremaschi, J., McCoy, K.D., Arnathau, C., et al. (2017)
558 Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol* **26**: 2905–
559 2921.

560 Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., and Hurst, G.D.
561 (2008) The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not
562 walk alone. *BMC Biol* **6**: 27.

563 Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., et al. (2018) Tick-
564 Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways. *Curr Biol* **28**: 1896-
565 1902.e5.

- 566 Duron, O., Noël, V., McCoy, K.D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., et al. (2015)
567 The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the
568 Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog* **11**: e1004892.
- 569 Eberl, L. and Vandamme, P. (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys.
570 *F1000Research* **5**:.
- 571 Eiler, A., Heinrich, F., and Bertilsson, S. (2012) Coherent dynamics and association networks
572 among lake bacterioplankton taxa. *ISME J* **6**: 330–342.
- 573 Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., Pollet, T., Vayssier-Taussat, M., and Cosson, J.-F. (2018)
574 High Throughput Sequencing and Network Analysis Disentangle the Microbial
575 Communities of Ticks and Hosts Within and Between Ecosystems. *Front Cell Infect*
576 *Microbiol* **8**: 236.
- 577 Evtushenko, L.I. and Takeuchi, M. (2006) The Family Microbacteriaceae. In *The Prokaryotes*:
578 *Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Dworkin, M., Falkow, S.,
579 Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds). New York, NY: Springer
580 New York, pp. 1020–1098.
- 581 Falkinham, J.O. (2015) Environmental Sources of Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Chest*
582 *Med* **36**: 35–41.
- 583 Fuhrman, J.A. and Steele, J.A. (2008) Community structure of marine bacterioplankton:
584 patterns, networks, and relationships to function. *Aquat Microb Ecol* **53**: 69–81.
- 585 Gall, C.A., Reif, K.E., Scoles, G.A., Mason, K.L., Mousel, M., Noh, S.M., and Brayton, K.A.
586 (2016) The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences
587 pathogen susceptibility. *ISME J* **10**: 1846–1855.
- 588 Gassner, F., van Vliet, A.J.H., Burgers, S.L.G.E., Jacobs, F., Verbaarschot, P., Hovius, E.K.E., et
589 al. (2010) Geographic and Temporal Variations in Population Dynamics of *Ixodes*
590 *ricinus* and Associated *Borrelia* Infections in The Netherlands. *Vector-Borne Zoonotic*
591 *Dis* **11**: 523–532.
- 592 Gofton, A.W., Oskam, C.L., Lo, N., Beninati, T., Wei, H., McCarl, V., et al. (2015) Inhibition of
593 the endosymbiont “*Candidatus Midichloria mitochondrii*” during 16S rRNA gene
594 profiling reveals potential pathogens in *Ixodes* ticks from Australia. *Parasit Vectors* **8**:
595 345.
- 596 Green, P.N. and Ardley, J.K. (2018) Review of the genus *Methylobacterium* and closely
597 related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified
598 into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 2727–2748.
- 599 Guay, J.-F., Boudreault, S., Michaud, D., and Cloutier, C. (2009) Impact of environmental
600 stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonella defensa*
601 bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *J*
602 *Insect Physiol* **55**: 919–926.
- 603 Gurfield, N., Grewal, S., Cua, L.S., Torres, P.J., and Kelley, S.T. (2017) Endosymbiont
604 interference and microbial diversity of the Pacific coast tick, *Dermacentor*
605 *occidentalis*, in San Diego County, California. *PeerJ* **5**: e3202.
- 606 Heise, S.R., Elshahed, M.S., and Little, S.E. (2010) Bacterial Diversity in *Amblyomma*
607 *americanum* (Acari: Ixodidae) With a Focus on Members of the Genus *Rickettsia*. *J*
608 *Med Entomol* **47**: 258–268.
- 609 Henning, K., Greiner-Fischer, S., Hotzel, H., Ebsen, M., and Theegarten, D. (2006) Isolation of
610 *Spiroplasma* sp. from an *Ixodes* tick. *Int J Med Microbiol* **296**: 157–161.

611 Hernández-Jarguín, A., Díaz-Sánchez, S., Villar, M., and de la Fuente, J. (2018) Integrated
612 metatranscriptomics and metaproteomics for the characterization of bacterial
613 microbiota in unfed *Ixodes ricinus*. *Ticks Tick-Borne Dis* **9**: 1241–1251.

614 Horn, H., Keller, A., Hildebrandt, U., Kämpfer, P., Riederer, M., and Hentschel, U. (2016)
615 Draft genome of the *Arabidopsis thaliana* phyllosphere bacterium, *Williamsia* sp.
616 ARP1. *Stand Genomic Sci* **11**: 8.

617 Hurst, G.D.D., Schulenburg, J.H.G. von der, Majerus, T.M.O., Bertrand, D., Zakharov, I.A.,
618 Baungaard, J., et al. (1999) Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two
619 different male-killing bacteria. *Insect Mol Biol* **8**: 133–139.

620 Jiang, Y., Wiese, J., Tang, S.K., Xu, L.H., Imhoff, J.F., and Jiang, C.L. (2008) *Actinomycetospora*
621 *chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family
622 *Pseudonocardiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 408–413.

623 Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D., Jiggins, C.D., Schulenburg, J.H.G. v d, and Majerus, M.E.N. (2000)
624 The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium.
625 *Parasitology* **120**: 439–446.

626 Kämpfer, P., McInroy, J.A., and Glaeser, S.P. (2015) *Chryseobacterium rhizoplaneae* sp. nov.,
627 isolated from the rhizoplane environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**: 533–538.

628 Lalar, I., Harrus, S., Mumcuoglu, K.Y., and Gottlieb, Y. (2012) Composition and Seasonal
629 Variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* Bacterial
630 Communities. *Appl Env Microbiol* **78**: 4110–4116.

631 Landesman, W.J., Mulder, K., Allan, B.F., Bashor, L.A., Keesing, F., LoGiudice, K., and Ostfeld,
632 R.S. (2019) Potential effects of blood meal host on bacterial community composition
633 in *Ixodes scapularis* nymphs. *Ticks Tick-Borne Dis* **10**: 523–527.

634 Lee, S.D. (2009) *Kineococcus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil. *Int J Syst*
635 *Evol Microbiol* **59**: 2204–2207.

636 Lejal, E., Estrada-Peña, A., Marsot, M., Cosson, J.-F., Rué, O., Mariadassou, M., et al. (2019a)
637 Taxon appearance from extraction and amplification steps demonstrates the value of
638 multiple controls in tick microbiome analysis. *bioRxiv* 714030.

639 Lejal, E., Marsot, M., Chalvet-Monfray, K., Cosson, J.-F., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M.,
640 and Pollet, T. (2019b) A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in
641 a French peri-urban forest. *bioRxiv* 597013.

642 Lo, N., Beninati, T., Sasser, D., Bouman, E. a. P., Santagati, S., Gern, L., et al. (2006)
643 Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont
644 in the tick *Ixodes ricinus*. *Environ Microbiol* **8**: 1280–1287.

645 Majerus, M.E.N., Hinrich, J., Schulenburg, G.V.D., and Zakharov, I.A. (2000) Multiple causes
646 of male-killing in a single sample of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata*
647 (Coleoptera: Coccinellidae) from Moscow. *Heredity* **84**: 605–609.

648 Majerus, T.M.O., Schulenburg, J.H.G.V.D., Majerus, M.E.N., and Hurst, G.D.D. (1999)
649 Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis*
650 (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Insect Mol Biol* **8**: 551–555.

651 Menchaca, A.C., Visi, D.K., Strey, O.F., Teel, P.D., Kalinowski, K., Allen, M.S., and Williamson,
652 P.C. (2013) Preliminary Assessment of Microbiome Changes Following Blood-Feeding
653 and Survivorship in the *Amblyomma americanum* Nymph-to-Adult Transition using
654 Semiconductor Sequencing. *PLOS ONE* **8**: e67129.

655 Nakao, R., Abe, T., Nijhof, A.M., Yamamoto, S., Jongejan, F., Ikemura, T., and Sugimoto, C.
656 (2013) A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps),
657 to the microbiome analysis of ticks. *ISME J* **7**: 1003–1015.

- 658 Narasimhan, S. and Fikrig, E. (2015) Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol* **31**:
659 315–323.
- 660 Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y.O., Heisig, J., Pan, J., et al. (2014) Gut
661 Microbiota of the Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme
662 Disease Spirochete. *Cell Host Microbe* **15**: 58–71.
- 663 Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A., and Hunter, M.S. (2003) Facultative bacterial
664 symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci* **100**:
665 1803–1807.
- 666 Olivieri, E., Epis, S., Castelli, M., Varotto Boccazzi, I., Romeo, C., Desirò, A., et al. (2019)
667 Tissue tropism and metabolic pathways of *Midichloria mitochondrii* suggest tissue-
668 specific functions in the symbiosis with *Ixodes ricinus*. *Ticks Tick-Borne Dis* **10**: 1070–
669 1077.
- 670 Plantard, O., Bouju-Albert, A., Malard, M.-A., Hermouet, A., Capron, G., and Verheyden, H.
671 (2012) Detection of *Wolbachia* in the Tick *Ixodes ricinus* is Due to the Presence of the
672 Hymenoptera Endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLOS ONE* **7**: e30692.
- 673 Pollet, T., Sprong, H., Lejal, E., Krawczyk, A.I., Moutailler, S., Cosson, J.-F., et al. (2020) The
674 scale affects our view on the identification and distribution of microbial communities
675 in ticks. *Parasit Vectors* **13**: 36.
- 676 Portillo, A., Palomar, A.M., Toro, M. de, Santibáñez, S., Santibáñez, P., and Oteo, J.A. (2019)
677 Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: To investigate the vectors for
678 diagnosis. *PLOS ONE* **14**: e0213384.
- 679 R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna,
680 Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- 681 Raulf, M.-K., Jordan, D., Fingerle, V., and Strube, C. (2018) Association of *Borrelia* and
682 *Rickettsia* spp. and bacterial loads in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks Tick-Borne Dis* **9**: 18–
683 24.
- 684 René-Martellet, M., Minard, G., Massot, R., Tran Van, V., Valiente Moro, C., Chabanne, L.,
685 and Mavingui, P. (2017) Bacterial microbiota associated with *Rhipicephalus*
686 *sanguineus* (s.l.) ticks from France, Senegal and Arizona. *Parasit Vectors* **10**: 416.
- 687 Sanada-Morimura, S., Matsumura, M., and Noda, H. (2013) Male Killing Caused by a
688 *Spiroplasma* Symbiont in the Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus*. *J*
689 *Hered* **104**: 821–829.
- 690 Sasser, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E.A.P., Sacchi, L., Fabbri, M., and Lo, N. (2006)
691 ‘*Candidatus Midichloria mitochondrii*’, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus*
692 with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2535–2540.
- 693 Schicht, S., Schnieder, T., and Strube, C. (2012) *Rickettsia* spp. and Coinfections With Other
694 Pathogenic Microorganisms in Hard Ticks From Northern Germany. *J Med Entomol*
695 **49**: 766–771.
- 696 Swej, A. and Kwan, J.Y. (2017) Tick microbiome and pathogen acquisition altered by host
697 blood meal. *ISME J* **11**: 813–816.
- 698 Takken, W., van Vliet, A.J.H., Verhulst, N.O., Jacobs, F.H.H., Gassner, F., Hartemink, N., et al.
699 (2016) Acarological Risk of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Infections Across Space
700 and Time in The Netherlands. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **17**: 99–107.
- 701 Thapa, S., Zhang, Y., and Allen, M.S. (2019) Effects of temperature on bacterial microbiome
702 composition in *Ixodes scapularis* ticks. *MicrobiologyOpen* **8**: e00719.

703 Tijssse-Klasen, E., Braks, M., Scholte, E.-J., and Sprong, H. (2011) Parasites of vectors -
704 Ixodiphagus hookeri and its Wolbachia symbionts in ticks in the Netherlands. *Parasit*
705 *Vectors* **4**: 228.

706 Tinsley, M.C. and Majerus, M.E.N. (2006) A new male-killing parasitism: Spiroplasma
707 bacteria infect the ladybird beetle Anisosticta novemdecimpunctata (Coleoptera:
708 Coccinellidae). *Parasitology* **132**: 757–765.

709 Tokarz, R., Tagliafierro, T., Sameroff, S., Cucura, D.M., Oleynik, A., Che, X., et al. (2019)
710 Microbiome analysis of Ixodes scapularis ticks from New York and Connecticut. *Ticks*
711 *Tick-Borne Dis* **10**: 894–900.

712 Towner, K. (2006) The Genus Acinetobacter. In *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria:*
713 *Gamma Subclass*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and
714 Stackebrandt, E. (eds). New York, NY: Springer New York, pp. 746–758.

715 Trout Fryxell, R.T. and DeBruyn, J.M. (2016) The Microbiome of Ehrlichia-Infected and
716 Uninfected Lone Star Ticks (Amblyomma americanum). *PLOS ONE* **11**: e0146651.

717 Tully, J.G., ROSE, D.L., YUNKER, C.E., CARLE, P., BOVÉ, J.M., WILLIAMSON, D.L., and
718 WHITCOMB, R.F. (1995) Spiroplasma ixodetis sp. nov., a New Species from Ixodes
719 pacificus Ticks Collected in Oregon. *Int J Syst Evol Microbiol* **45**: 23–28.

720 Tully, J.G., Rose, D.L., Yunker, C.E., Cory, J., Whitcomb, R.F., and Williamson, D.L. (1981)
721 Helical mycoplasmas (spiroplasmas) from Ixodes ticks. *Science* **212**: 1043–1045.

722 Van Treuren, W., Ponnusamy, L., Brinkerhoff, R.J., Gonzalez, A., Parobek, C.M., Juliano, J.J.,
723 et al. (2015) Variation in the Microbiota of Ixodes Ticks with Regard to Geography,
724 Species, and Sex. *Appl Env Microbiol* **81**: 6200–6209.

725 Varela-Stokes, A.S., Park, S.H., Stokes, J.V., Gavron, N.A., Lee, S.I., Moraru, G.M., and Ricke,
726 S.C. (2018) Tick microbial communities within enriched extracts of Amblyomma
727 maculatum. *Ticks Tick-Borne Dis* **9**: 798–805.

728 Vayssier-Taussat, M., Kazimirova, M., Hubalek, Z., Hornok, S., Farkas, R., Cosson, J.-F., et al.
729 (2015) Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the ‘one pathogen–one
730 disease’ vision to the pathobiome paradigm. *Future Microbiol* **10**: 2033–2043.

731 Viana, A.T., Caetano, T., Covas, C., Santos, T., and Mendo, S. (2018) Environmental
732 superbugs: The case study of Pedobacter spp. *Environ Pollut* **241**: 1048–1055.

733 Weinert, L.A., Tinsley, M.C., Temperley, M., and Jiggins, F.M. (2007) Are we underestimating
734 the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird
735 beetles. *Biol Lett* **3**: 678–681.

736 Xie, J., Butler, S., Sanchez, G., and Mateos, M. (2014) Male killing Spiroplasma protects
737 Drosophila melanogaster against two parasitoid wasps. *Heredity* **112**: 399–408.

738 Yamamura, H., Ashizawa, H., Nakagawa, Y., Hamada, M., Ishida, Y., Otaguro, M., et al. (2011)
739 Actinomycetospora rishiriensis sp. nov., isolated from a lichen. *Int J Syst Evol*
740 *Microbiol* **61**: 2621–2625.

741 Zhang, X.-C., Yang, Z.-N., Lu, B., Ma, X.-F., Zhang, C.-X., and Xu, H.-J. (2014) The composition
742 and transmission of microbiome in hard tick, Ixodes persulcatus, during blood meal.
743 *Ticks Tick-Borne Dis* **5**: 864–870.

744 Zolnik, C.P., Prill, R.J., Falco, R.C., Daniels, T.J., and Kolokotronis, S.-O. (2016) Microbiome
745 changes through ontogeny of a tick pathogen vector. *Mol Ecol* **25**: 4963–4977.

746

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Comme évoqué dès les premières lignes introductives de ce manuscrit, les tiques sont les premiers vecteurs d'agents pathogènes pour l'homme et l'animal en Europe et constituent donc un problème de santé publique et vétérinaire préoccupant. Face à ce constat, les différents acteurs de la recherche ont commencé par s'atteler à la caractérisation du système tiques/agents pathogènes dans le but de mieux le décrire et le comprendre, pour *in fine* être en mesure de mieux appréhender et gérer le risque lié aux maladies à tiques. Néanmoins, la récente émergence du concept de pathobiome des tiques a considérablement modifié notre perception du fonctionnement du système tique (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014, 2015). Suite à ce changement de paradigme, il était crucial de considérer les agents pathogènes dans leur environnement biotique et d'étudier, entre autres, les potentielles relations entre ces agents et le reste des membres de la communauté microbienne des tiques. Quelques études ont d'ailleurs déjà permis de relier composition du microbiote et présence d'agents pathogènes chez les tiques (Narasimhan *et al.*, 2014; Gall *et al.*, 2016; Abraham *et al.*, 2017; Budachetri *et al.*, 2018). Néanmoins, peu d'informations étaient jusqu'ici disponibles quant à la composition du microbiote d'*Ixodes ricinus* et aux potentielles relations existant entre ce microbiote et les multiples agents pathogènes que cette tique est capable de transmettre. Le but de mon travail de thèse était donc de palier à ce manque et d'étudier, grâce aux nouvelles approches de détection et séquençage haut débit, la dynamique du pathobiome d'*I. ricinus*. Un tel objectif nécessitait avant tout de considérer certains biais que pouvait présenter l'analyse des données issues du séquençage à haut débit et de s'en affranchir par une importante mise au point méthodologique, notamment dans le cas de l'étude du microbiote. Je commencerais donc cette discussion générale en insistant sur la nécessité de réaliser une rigoureuse mise au point méthodologique pour réaliser l'analyse du microbiote des tiques. Je poursuivrai en discutant de l'importance de considérer l'échelle d'étude dans les projets visant à améliorer notre compréhension des tiques et maladies à tiques pour enfin discuter des interactions microbiennes chez les tiques. Chacune de ces trois parties sera ponctuée par quelques idées de perspectives qu'il serait, à mon sens, intéressant de développer suite aux résultats obtenus au cours de mon projet de thèse.

La méthodologie : Une étape clé dans l'analyse du microbiote

Dans toute étude expérimentale, de multiples biais méthodologiques peuvent exister et impacter l'analyse des données. Dans le contexte de l'étude du microbiote par les nouvelles approches de séquençage haut débit, l'un de ces biais est la contamination des échantillons par de l'ADN extérieur, pouvant survenir lors des étapes de préparation au séquençage (Salter *et al.*, 2014; Galan *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2018). En effet, l'impact de la contamination, plus particulièrement dans l'étude du microbiote d'échantillons de faible biomasse, a notamment été démontré par Salter *et al.* (2014), qui ont pu mettre en évidence un effet important de ces contaminants sur l'analyse et l'interprétation des résultats. De plus, quelques études portant sur le microbiote des tiques ont déjà souligné la potentielle présence de ces contaminants, pouvant souiller les échantillons (Hawlana *et al.*, 2013; Gofton, Doggett, *et al.*, 2015; Gofton, Oskam, *et al.*, 2015; Rynkiewicz *et al.*, 2015; René-Martellet *et al.*, 2017; Sperling *et al.*, 2017; Estrada-Peña *et al.*, 2018b; Thapa *et al.*, 2019). Dans le cadre de notre étude visant à identifier le microbiote d'*I. ricinus*, la réalisation de nombreux témoins négatifs, à plusieurs étapes du processus, nous a permis d'identifier les OTUs contaminantes principales, qui appartiennent à des genres ayant jusqu'ici été considérés comme membres du microbiote des tiques. L'estimation de cette contamination nous a permis de mettre en évidence qu'elle pouvait représenter une part importante des OTUs identifiées dans l'étude du microbiote (plus de 50% des séquences identifiées dans l'ensemble de nos échantillons). Au-delà de la simple perte d'informations dans le séquençage des échantillons, cette contamination a des conséquences majeures sur l'analyse des résultats. Dans notre étude, nous avons montré qu'elle engendre une surestimation de plusieurs indices de diversité pour l'ensemble ou plusieurs des catégories d'échantillons testés selon l'indice étudié. Pour certains indices de diversité, la présence de contaminants biaisait même l'issue des comparaisons entre catégories d'échantillons (i.e. diversité observée dans notre étude entre nymphes, mâles et femelles). Alors que plusieurs études suggèrent des différences de diversité et de composition du microbiote entre les différentes stases de tiques (Lalzar *et al.*, 2012; Menchaca *et al.*, 2013; Van Treuren *et al.*, 2015; Zolnik *et al.*, 2016; Gurfield *et al.*, 2017; René-Martellet *et al.*, 2017; Swei and Kwan, 2017; Thapa *et al.*, 2019), avec notamment une plus grande diversité des communautés microbiennes chez les mâles et les nymphes, peu mentionnent la réalisation de témoins négatifs et leur analyse de façon concomitante à celle des échantillons lors du

séquençage (René-Martellet *et al.*, 2017; Thapa *et al.*, 2019). Dès lors, on peut imaginer que dans plusieurs de ces études, certains indices de diversité du microbiote aient pu être surestimés, tout comme les différences entre catégories d'échantillons. Ainsi la réalisation de témoins négatifs, à chaque étape du processus d'analyse en amont du séquençage, et le nettoyage des données, sont des étapes cruciales et indispensables pour obtenir des résultats les plus justes possibles.

D'autres biais peuvent également engendrer une surestimation de la diversité des communautés microbiennes de tiques comme par exemple la méthode de nettoyage des tiques. Deux méthodes s'opposent dans la réalisation de cette étape : l'utilisation de l'éthanol *versus* l'hypochlorite de sodium (javel). Bien que les deux permettent de tuer les micro-organismes se trouvant sur la cuticule des tiques, l'éthanol ne permettrait pas l'élimination de la totalité de l'ADN microbien contrairement à la javel. Le nettoyage à l'éthanol est cependant celui qui a été, et est toujours, le plus communément réalisé chez les tiques. C'est d'ailleurs cette approche que j'ai utilisée au début de ma thèse pour nettoyer les tiques utilisées dans mes différentes analyses. L'un des principaux arguments utilisés par les détracteurs de l'utilisation de la javel est que cette dernière pourrait être trop agressive et ainsi affecter également le microbiote interne des tiques, et plus particulièrement celui du tube digestif. En comparant les résultats de séquençage obtenus sur des tiques entières, *Amblyomma cajennense*, nettoyées à la javel par rapport à celles nettoyées à l'éthanol, Binetruy *et al.* (2019a) ont montré des différences significatives en termes de diversité microbienne (distance Generalized Unifrac, tenant compte de la phylogénie ainsi que de l'abondance des séquences, mais permettant de « pondérer » l'effet des OTUs les plus abondantes) selon les modes de lavage des tiques : celles nettoyées à l'éthanol présentant une diversité toujours plus élevée que celles nettoyées à la javel. En outre, l'étude du microbiote du tube digestif de tiques nettoyées dans ces deux conditions leur a permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence significative de diversité microbienne selon le mode de nettoyage, suggérant ainsi que le nettoyage à la javel n'aurait pas plus d'effet sur la diversité du microbiote interne des tiques que celui à l'éthanol. Notons tout de même que la structure de ces communautés était affectée de façon significative selon la réalisation d'un nettoyage ou d'un autre. De plus, la réalisation d'un écouvillonnage de plusieurs tiques leur a permis d'en identifier le microbiote cuticulaire. La comparaison de ce microbiote avec celui des tiques nettoyées à l'éthanol, et dont les séquences correspondant aux familles de

symbiotes majoritaires (Coxiellaceae et Rickettsiaceae) avaient été éliminées, a permis de montrer que le microbiote cuticulaire était proche du microbiote résiduel des tiques nettoyées à l'éthanol et ne différait que par la présence de quelques OTUs. Par ailleurs, parmi les bactéries détectées sur la cuticule des tiques, plusieurs appartenaient à des familles de bactéries caractéristiques de l'environnement, également détectées lors de notre étude. C'est notamment le cas des Beijerinckiaceae, Mycobacteriaceae, Microbacteriaceae et Rhizobiaceae dont plusieurs genres appartenant à ces familles figurent au top 20 des genres identifiés dans notre étude. Toutefois, Binetruy *et al.* (2019a) ont également détecté plusieurs familles de bactéries typiquement environnementales dans leur analyse du microbiote intestinal des tiques (nettoyées par les deux méthodes), dont des Beijerinckiaceae. En conclusion, au cours de notre étude, nous avons observé plusieurs OTUs appartenant à des genres typiquement environnementaux, qui pourraient correspondre à de la contamination cuticulaire, non éliminée lors de notre nettoyage à l'éthanol. Pour autant, ne négligeons pas l'hypothèse que certaines de ces OTUs puissent également se trouver dans le tube digestif des tiques, auquel elles auraient pu accéder lors du mécanisme d'hydratation par exemple, se mêlant ainsi à la flore commensale des tiques.

L'ensemble des données obtenues au cours de ces deux études (Binetruy *et al.*, 2019a; Lejal *et al.*, 2019c), illustre parfaitement la nécessité de réaliser toute une batterie de tests antérieurement/concomitamment au processus d'analyse des échantillons pour caractériser au mieux le microbiote des tiques et s'assurer de la robustesse des hypothèses et conclusions émises. Dans le cadre de l'étude du microbiote d'*I. ricinus*, une perspective intéressante serait, à l'instar de l'étude de Binetruy *et al.* (2019a), d'étudier la composition du microbiote cuticulaire des tiques *I. ricinus*, mais également de comparer la composition du microbiote intestinal de tiques non nettoyées avec celui de tiques nettoyées par les deux méthodes, permettant ainsi de déterminer laquelle impacte le moins les structures des communautés du microbiote intestinal par rapport à un témoin non affecté par le processus de nettoyage.

Importance de l'échelle d'étude

L'échelle a une profonde influence sur la façon dont nous allons conduire une étude, interpréter les résultats obtenus et comprendre les processus qui en découlent. Des schémas apparents à une certaine échelle peuvent disparaître lorsqu'ils sont vus à partir d'une autre échelle, indiquant que la perception et la compréhension des processus est échelle

dépendante (Pollet *et al.*, 2020). Mieux comprendre les tiques et les maladies qu'elles sont susceptibles d'engendrer nécessite de mieux appréhender les différents facteurs biotiques ou abiotiques pouvant influencer la dynamique à la fois des tiques, des agents pathogènes et du microbiote. Considérer un maximum de ces facteurs nécessite de travailler à différentes échelles (temporelles, spatiales, tiques...). Alors que de plus en plus d'études s'intéressent au microbiote des tiques s'attachent à savoir qui est là et en quelle quantité, peu se sont intéressées à la dynamique des communautés microbiennes des tiques et ont tenu compte du contexte pour l'expliquer. Face à ce manque d'informations et afin de mieux comprendre l'écologie des communautés microbiennes de tiques, j'ai donc choisi de m'intéresser à la dynamique de ces communautés à la fois à l'échelle temporelle, sur des tiques échantillonnées mensuellement pendant trois années consécutives, et à l'échelle des tiques elles-mêmes en considérant deux organes clés, le tube digestif et les glandes salivaires.

1. La dynamique temporelle

Les résultats obtenus sur les échantillons collectés au cours des trois années consécutives nous ont permis de montrer des différences de prévalences de plusieurs agents pathogènes en fonction des saisons ou des années. En effet, nous avons constaté que les prévalences des agents pathogènes dans les populations de tiques échantillonnées au même endroit étaient variables en fonction du temps, et ne semblaient pas présenter de récurrences saisonnières, bien que certains agents aient été observés de façon significativement plus importante à certaines saisons qu'à d'autres. D'autres études avant la nôtre avaient également permis d'observer des variations temporelles de prévalence chez différents agents pathogènes (Gassner *et al.*, 2010; Reye *et al.*, 2010; Coipan *et al.*, 2013a; Takken *et al.*, 2016; Chvostáč *et al.*, 2018). La présence d'hôtes réservoirs à la période à laquelle les tiques ont effectué leur dernier repas sanguin, est l'une des raisons pouvant expliquer des différences de prévalences selon les saisons ou les années. En effet, dans leur étude des prévalences de différents agents pathogènes chez des tiques échantillonnées pendant 10 ans au même endroit, Coipan *et al.* (2013a) avaient observé une synergie dans la dynamique de plusieurs agents pathogènes circulant chez les mêmes hôtes, venant ainsi soutenir l'importance de l'influence qu'a la présence des hôtes réservoirs sur la dynamique de prévalence des agents pathogènes chez les tiques. Néanmoins, étant donné le cycle de vie pluriannuel des tiques, il est difficile de savoir si les nymphes échantillonnées à la même période ont réalisé leur

précédent repas sanguin sur la même catégorie d'hôte. En effet, les populations à l'affût à un moment donné peuvent correspondre à un mix de populations dont le dernier repas sanguin peut remonter à différentes périodes (Gray *et al.*, 2016). D'autant que les phénomènes d'interruption ou de co-repas peuvent encore venir compliquer ce tableau. Un autre point à prendre en considération lorsque l'on s'intéresse à la dynamique temporelle de prévalence des agents pathogènes, semble être l'influence de certains paramètres abiotiques. En effet, le rôle de certains agents pathogènes dans la réponse à différents stress abiotiques a déjà été mis en évidence. Dans le cas des *Borrelia*, par exemple, il semblerait que leur présence induise, chez les tiques *I. ricinus*, une plus grande résistance à la dessiccation et favorise leur comportement de chasse à l'affût (Herrmann and Gern, 2010, 2012). Ce comportement serait lié à la présence de plus grandes réserves énergétiques chez les tiques infectées par *Borrelia* (Herrmann and Gern, 2012, 2015; Herrmann *et al.*, 2013b). Dans le même ordre d'idées, *Anaplasma phagocytophilum*, dont la présence chez la tique *Ixodes scapularis* induit la production d'une glycoprotéine impliquée dans la résistance au froid (*iafgp* : *I. scapularis* anti-freeze glycoproteine), permettrait d'augmenter le taux de survie au froid chez les tiques infectées (Neelakanta *et al.*, 2010). Ces capacités de résistance accrues pourraient être responsables d'une plus forte prévalence des tiques infectées par *A. phagocytophilum* lorsqu'il fait froid ou avec *Borrelia burgdorferi* s.l. en période de stress hydrique. Plusieurs études ont d'ailleurs observé une plus forte prévalence d'*I. ricinus* infectées avec *B. burgdorferi* s.l. pendant les mois d'été (Coipan *et al.*, 2013a; Takken *et al.*, 2016) et dans notre cas juste après la période estivale, ce qui pourrait correspondre aux tiques ayant mieux survécu au stress hydrique subi pendant l'été.

Parallèlement à cette analyse focalisée sur les agents pathogènes, je me suis également intéressée à la dynamique temporelle de l'ensemble de la communauté microbienne d'*I. ricinus*. Première étude à caractériser la dynamique multi-annuelle du microbiote de cette espèce, elle a tout d'abord permis de constater que les cinq genres bactériens majoritairement détectés sur l'ensemble des séquences obtenues (>75% de toutes les séquences identifiées), appartenaient à des organismes symbiotiques, affiliés aux genres : *Arsenophonus*, *Candidatus Midichloria*, *Rickettsia*, *Wolbachia* et *Spiroplasma*.

En ce qui concerne les genres *Wolbachia* et *Arsenophonus*, deux études ont permis de montrer que les espèces *Wolbachia pipientis* et *Arsenophonus nasoniae* étaient présentes dans les populations d'*Ixodiphagus hookeri*, un hyménoptère parasitoïde des tiques Ixodidae,

et que quasiment toutes les tiques *I. ricinus* qui contenaient l'ADN de ces bactéries étaient également parasitées par *I. hookeri* (Plantard *et al.*, 2012; Bohacsova *et al.*, 2016). Il est donc très probable que la détection de ces genres dans notre étude soit due à la présence d'*I. hookeri* chez les tiques testées, d'autant que nos résultats ont permis de démontrer une corrélation positive entre les OTUs appartenant à ces deux genres, et que la présence de ce parasitoïde a déjà été détectée chez les tiques *I. ricinus* en forêt de Sénart (Almazan *et al.*, en préparation). Non présentée dans ce travail de thèse, l'analyse spécifique de la dynamique temporelle de ces deux genres bactériens (*Arsenophonus* et *Wolbachia*) pourrait de ce fait nous servir de proxy pour estimer le taux et la dynamique d'infection des tiques par ce parasite au cours des années.

Par ailleurs, l'analyse du microbiote des tiques *I. ricinus* non infectées par ces agents, a permis de mettre en évidence des différences entre le microbiote des tiques selon la période de l'année à laquelle elles avaient été échantillonnées, suggérant ainsi l'existence d'un schéma saisonnier redondant d'une année sur l'autre, et qui semble être principalement dû aux genres bactériens communément trouvés dans l'environnement. Dans le cas où la présence de ces genres serait due à de la contamination cuticulaire (Binetruy *et al.*, 2019a), ces différences pourraient alors être dues aux variations saisonnières du microbiote de l'environnement dans lequel elles se trouvent (Baldrian, 2017). Rappelons toutefois que dans leur étude Binetruy *et al.* (2019a) avaient tout de même observé des bactéries communément détectées dans l'environnement et dans le tube digestif des tiques. Par ailleurs, alors qu'ils étudiaient le microbiote des organes internes de tiques *I. ricinus*, nettoyées à la javel, Hernández-Jarguín *et al.* (2018), ont également détecté des bactéries appartenant à des genres typiquement environnementaux. Ces résultats suggèrent ainsi que ces bactéries, qui auraient pu être acquises lors du processus d'hydratation des tiques, pourraient s'être jointes à leur microbiote. Dans un tel cas, les variations saisonnières observées pourraient également être dues à des différences de composition du microbiote de l'environnement dans lequel se trouve la tique, et avec lequel elles pourraient régulièrement se contaminer lors du processus d'hydratation. Par ailleurs, il est également possible que les facteurs abiotiques environnementaux auxquels la tique est soumise puissent avoir une influence sur la composition et structure de son microbiote et ainsi être responsables des différences saisonnières observées. En effet, les tiques, en tant qu'organismes ectothermes, vont être assujetties à la température de l'environnement dans lequel elles se trouvent. Ainsi, les

différences de températures de leur environnement pourraient impacter la dynamique de leur microbiote. Comme déjà évoqué dans le paragraphe introductif de cette thèse, il a récemment été démontré par Thapa *et al.* (2019) que les tiques *I. scapularis* maintenues à une humidité constante mais à différentes températures présentaient des différences significatives en termes de diversité microbienne (Shannon), particulièrement observées chez les tiques mâles dont la diversité était significativement réduite après plusieurs jours à 30 ou 37°C. Ainsi, dans le contexte de notre étude, on peut imaginer que le « vécu abiotique » des tiques pourrait expliquer une partie des différences observées entre les individus. En outre, plusieurs facteurs biotiques comme la présence d'agents pathogènes (e.g. premier paragraphe de cette partie) et le spectre d'hôtes (Swei and Kwan, 2017; Landesman *et al.*, 2019) sont également décrits comme pouvant potentiellement influencer le microbiote des tiques. En effet, dans chacune des deux études citées précédemment, des différences significatives de diversité microbienne ont été constatées entre les tiques s'étant gorgées sur différentes espèces d'hôtes. Des différences dans la spécificité de la réponse immunitaire innée de l'hôte, médiée par la présence des protéines de la voie du complément pourrait être à l'origine de ces différences (Swei and Kwan, 2017; Landesman *et al.*, 2019).

2. Dynamique à l'échelle des organes

Mieux comprendre et contrôler les maladies à tiques, c'est aussi pouvoir estimer leur risque de co-transmission lors de la piqûre et si un agent pathogène est susceptible d'être transmis rapidement par la tique. Bien que dans le cas de parasites du genre *Babesia*, la présence dans les glandes salivaires ne soit pas synonyme de transmission rapide (étape de différenciation nécessaire à leur transmission, stimulée par la prise du repas sanguin), pour certaines espèces pathogènes, comme c'est le cas par exemple des *Borrelia* du groupe des Recurrent fever, la présence initiale dans les glandes salivaires au début du repas sanguin, contribue à leur transmission rapide dès le début de la piqûre (Boyle *et al.*, 2014). À l'inverse, les espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* s.l. (Schwan and Piesman, 2000 ; Ohnishi *et al.*, 2001 ; Piesman and Schneider, 2002) sont *a priori* connues pour ne migrer vers les glandes salivaires qu'au moment du repas sanguin (élément déclencheur), ce qui générerait un délai entre le début du gorgement et leur transmission à l'hôte. Identifier les agents pathogènes au sein de ces différents organes est donc une information cruciale pour progresser dans la compréhension des maladies à tiques.

Au cours de ma thèse, j'ai ainsi étudié les prévalences des agents pathogènes dans certains organes (tubes digestifs et glandes salivaires) de tiques *I. ricinus* mâles et femelles échantillonnées à l'affût à un temps t en forêt de Sénart. Le tube digestif et les glandes salivaires constituent des organes clés pour le processus d'acquisition et de transmission des agents pathogènes. L'analyse de ces organes a permis d'émettre des hypothèses quant à la dynamique et au mode de transmission des agents transportés par *I. ricinus*. Ceci était le cas notamment pour certaines bactéries du complexe *B. burgdorferi* s.l. (*B. garinii*, *B. spielmanii* et *B. lusitaniae* détectées à la fois au niveau des glandes salivaires et du tube digestif de femelles), pour lesquelles les résultats obtenus entrent en contradiction avec le postulat communément admis qui considère que les bactéries de ce groupe seraient initialement stockées au niveau du tube digestif, avant de migrer, sous la stimulation d'un nouveau repas sanguin, dans les glandes salivaires (Schwan and Piesman, 2000; Ohnishi *et al.*, 2001; Piesman and Schneider, 2002). Néanmoins, ces études ont toutes été réalisées chez le vecteur *I. scapularis* et avec la souche *B. burgdorferi* s.s. B31. Ainsi, nous pouvons imaginer que le stimulus du repas sanguin pourrait n'être nécessaire que pour certaines souches/espèces de *Borrelia burgdorferi* s.l., comme le suggère nos résultats puisque, contrairement aux 3 espèces précédemment citées, *B. afzelii* n'était détectée que dans le tube digestif. Cette possibilité était notamment évoquée par Sertour *et al.* (2018) alors qu'ils détectaient également la présence de certaines souches de *B. burgdorferi* s.l. dans les glandes salivaires de tiques non gorgées ainsi que la transmission à des souris non infectées en moins de 12 heures de gorgement de plusieurs souches testées (*B. burgdorferi* s.s. BRE-13, *B. bavariensis* PBi et *B. afzelii* IBS-5). Par ailleurs, la détection d'ADN d'autres agents pathogènes dans les glandes salivaires de tiques nous a également permis d'apporter de nouvelles données pouvant aider à la compréhension de leur mécanisme de transmission, peu connu jusqu'à présent. C'est le cas notamment de *B. miyamotoi*, détectée majoritairement dans les glandes salivaires de mâles. Dans l'éventualité où la localisation de cette bactérie serait identique chez les autres stases d'*I. ricinus*, cela suggérerait une transmission rapide lors du prochain repas sanguin comme nous pouvons l'observer chez les autres *Borrelia* du groupe des fièvres récurrentes transmises par les tiques molles (Boyle *et al.*, 2014). Par ailleurs, *R. helvetica* a également été détectée dans les glandes salivaires de femelles et de mâles. La présence de cette espèce avait d'ailleurs déjà été détectée par Qiu *et al.* (2014) dans les glandes salivaires d'*I. persulcatus* alors qu'ils en étudiaient le microbiote. Cette observation permet ainsi de suggérer une

transmission rapide de cette bactérie, comme c'est le cas pour *Rickettsia parkeri*, transmise à l'Homme dans les 8 heures suivant la piqure de tique (Whitman *et al.*, 2007).

Outre les informations pertinentes en termes de processus de transmission, l'identification des agents pathogènes dans les organes de tiques, nous a également permis de mettre en évidence des profils de co-infections différents de ceux observés dans notre étude dynamique sur tiques entières. En effet, les co-infections les plus souvent observées à l'échelle des organes, à la fois dans les glandes salivaires et dans le tube digestif, étaient *R. helvetica*/*A. phagocytophilum* chez les mâles et *R. helvetica*/*B. lusitaniae* chez les femelles. Chez les nymphes entières collectées pour notre étude temporelle, le profil de co-infection le plus souvent observé et qui présentait une co-occurrence positive est celui qui concerne *B. garinii* et *B. afzelii*, aussi observé dans trois autres études portant sur des tiques entières (Moutailler *et al.*, 2016; Raileanu *et al.*, 2017; Aivelo *et al.*, 2019). De plus, nous avons également détecté une co-occurrence positive entre *B. garinii* et *B. spielmanii*. La détection de profils de co-infections différents peut, bien évidemment, être le reflet d'hôtes différents lors des repas sanguins, d'autant plus que les deux études ont été effectuées chez des stases différentes n'ayant pas effectué le même nombre de repas sanguins. Notons aussi que dans le cas des organes, toutes les tiques ont été prélevées le même jour. Cette absence de dynamique temporelle pourrait également expliquer les différences observées dans les profils de co-infections entre tiques entières et organes.

Des études portant sur d'autres échelles non abordées au cours de cette thèse, telles que l'échelle spatiale ou encore les stases de tiques ont également permis de montrer des variations dans la composition du microbiote à ces échelles (Carpi *et al.*, 2011; Lalar *et al.*, 2012; Menchaca *et al.*, 2013; Williams-Newkirk *et al.*, 2014; Van Treuren *et al.*, 2015; Trout Fryxell and DeBruyn, 2016; Zolnik *et al.*, 2016; Gurfield *et al.*, 2017; René-Martellet *et al.*, 2017; Swei and Kwan, 2017; Estrada-Peña *et al.*, 2018b; Thapa *et al.*, 2019). Ainsi, les données obtenues au cours de cette thèse, associées à celles déjà rapportées dans la littérature, illustrent bien la nécessité de relativiser les données obtenues selon l'échelle à laquelle l'étude a été conduite et de considérer ces différentes échelles pour étudier et comprendre le fonctionnement du système complexe que constituent les communautés microbiennes de tiques. En effet, la réalisation d'études épidémiologiques ainsi que l'identification des communautés microbiennes hébergées par les tiques ont été, et restent encore, des étapes essentielles pour identifier les agents pathogènes transmis par les tiques et comprendre la

complexité des communautés microbiennes associées aux tiques. Toutefois, la non considération de l'échelle d'étude et du contexte environnemental dans lequel évoluent les tiques et leurs micro-organismes rend l'utilisation de ces données limitée. Dans les futures études, ces investigations devraient être poursuivies en explorant différentes échelles spatiales, en suivant un gradient allant notamment de l'échelle très locale à l'échelle régionale. En effet, une étude récente a montré que les genres fortement associés au microbiote des tiques différaient à l'échelle locale, entre les populations de tiques collectées en bordure de forêt et celles collectées dans la forêt, soulignant une probable influence de facteurs locaux comme la végétation et le spectres d'hôte, sans doute différents dans ces environnements pourtant très proches (Estrada-Peña *et al.*, 2018b). Par ailleurs, alors que j'identifiais dans ce travail de thèse le microbiote des nymphes d'*I. ricinus* et montrais une variation temporelle de la structure de ce microbiote récurrente d'une année à l'autre, d'autres perspectives seront, toujours en considérant cette échelle temporelle : 1) d'identifier le microbiote chez d'autres stases d'*I. ricinus* ; 2) de caractériser à l'aide d'approche de métatranscriptomique les fonctions de ce microbiote chez les différentes stases et ; 3) d'évaluer si les schémas récurrents observés à l'échelle taxonomique le sont également en termes de fonctions.

Interactions microbiennes chez *Ixodes ricinus*.

Au vu de mes résultats et à la lecture de la littérature, les tiques constituent des écosystèmes qui sont constitués d'une grande variété de micro-organismes, pathogènes, commensaux et symbiotiques, qui forment des communautés microbiennes complexes et dynamiques et qui vivent en interaction les unes avec les autres. Ces interactions sont susceptibles d'avoir des conséquences sur la physiologie de la tique mais aussi l'acquisition et la transmission des agents pathogènes (Narasimhan *et al.*, 2014; Gall *et al.*, 2016; Abraham *et al.*, 2017; Budachetri *et al.*, 2018).

Au cours de ce travail de thèse, je me suis, entre autres, intéressée aux co-occurrences existant entre agents pathogènes chez les tiques entières, ce qui nous a permis d'observer des associations pouvant refléter les hôtes sur lesquels la tique a effectué son repas sanguin ou la transmission par co-repas. J'ai également identifié les co-infections observées à l'échelle des organes. Les co-infections les plus représentées à cette échelle étaient différentes par rapport à celles observées à l'échelle d'un individu entier. Cette échelle plus fine pourrait nous

permettre d'avoir une idée plus précise, dans le cas des co-infections observées dans les glandes salivaires, du risque de co-transmission rapide de certains agents lors de la piqûre. La présence des co-infections représente un point fondamental à considérer dans l'étude du pathobiome car les infections simultanées par plusieurs agents pathogènes peuvent avoir différentes conséquences sur le tableau clinique, du fait de synergie ou d'antagonisme entre agents infectieux (McArdle *et al.*, 2018; Bass *et al.*, 2019). Dans le cas des maladies à tiques, les cas de co-infections chez l'Homme à *B. burgdorferi* s.s. avec *A. phagocytophilum* ou *Babesia microti* sont effectivement plus sévères, avec plus de symptômes et une plus longue durée de la maladie qu'en cas d'infection unique (Krause *et al.*, 1996; Diuk-Wasser *et al.*, 2016).

En élargissant notre étude à la communauté microbienne totale, nous avons observé que la quasi-totalité des corrélations observées entre les micro-organismes hébergés par *I. ricinus* étaient positives et que beaucoup d'entre elles avaient lieu entre des micro-organismes appartenant à différents genres bactériens. Ce constat pourrait suggérer une faible compétition entre ces différents taxa et au contraire une coopération efficace et une dépendance mutuelle entre les membres de la communauté microbienne, cette dernière favorisant plutôt le mutualisme avec des membres semblant avoir, pour la plupart, des préférences pour des conditions environnementales / niches similaires.

1. *Spiroplasma* – *Wolbachia* - *Arsenophonus*

Tout comme évoqué précédemment dans cette discussion, des études récentes laissent penser que les deux genres *Wolbachia* et *Arsenophonus*, initialement considérés comme des symbiontes de tiques, seraient associés à la présence du parasitoïde de tique *I. hookeri* (Plantard *et al.*, 2012; Bohacsova *et al.*, 2016). Les fortes corrélations observées entre ces deux genres dans notre analyse de réseau vont dans le sens de cette hypothèse et mettent ainsi en évidence l'importance que peut avoir la présence d'*I. hookeri* sur l'analyse des données de séquençage d'*I. ricinus*. Par ailleurs, nous avons également observé que plusieurs OTUs du genre *Spiroplasma*, identifié comme symbionte circulant chez plusieurs arthropodes et notamment les tiques (Duron *et al.*, 2017), étaient positivement corrélés au duo *Wolbachia* / *Arsenophonus*. Identifié comme un agent « tueur de mâles » chez de nombreux insectes (Hurst *et al.*, 1999; Majerus *et al.*, 1999, 2000; Jiggins *et al.*, 2000; Tinsley and Majerus, 2006; Sanada-Morimura *et al.*, 2013), les investigations réalisées chez la tique

Rhipicephalus decoloratus, n'ont pas mis en évidence de distorsion du sex-ratio des tiques infectées. Toutefois, en associant la présence de *Wolbachia* et *Arsenophonus* à celle d'*I. hookeri*, nous émettons l'hypothèse que la présence de *Spiroplasma* pourrait constituer une ligne de défense de la tique, mise en place à l'encontre d'*I. hookeri*, comme cela a déjà été observé chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, à l'encontre de deux autres hyménoptères parasitoïdes, *Leptopilina heterotoma* et *boulardi* (Xie *et al.*, 2014). Néanmoins, malgré le fait que *Spiroplasma* ait été détecté chez de multiples espèces de tiques (Binetruy *et al.*, 2019b) et ait donc été identifié comme symbionte de ces tiques, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que *Spiroplasma* puisse également être un membre du microbiote d'*I. hookerii*.

2. Candidatus *Midichloria* – *Rickettsia*

En analysant le réseau des corrélations significatives généré lors de notre étude sur la dynamique temporelle du microbiote, plusieurs corrélations positives ont été observées entre une OTU du genre *Ca. Midichloria* et plusieurs du genre *Rickettsia* pouvant correspondre à des agents pathogènes et plus particulièrement à *R. helvetica*, dont la présence a été mise en évidence lors de l'étude spécifique aux agents pathogènes (cf Chapitre I). Etant donné la forte prévalence de *Ca. Midichloria* au sein des populations sauvages d'*I. ricinus*, ces corrélations positives laissent supposer que cette OTU *Ca. Midichloria* pourrait favoriser la colonisation ou le maintien de ces *Rickettsia* chez *I. ricinus*. Chez la tique *Amblyomma maculatum*, alors qu'ils étudiaient l'abondance des populations de symbiontes au sein de colonies de tiques infectées ou non à *Rickettsia parkeri*, Budachetri *et al.* (2018) ont observé une corrélation positive entre la charge de *Ca. Midichloria* et la présence de *R. parkeri*, suggérant ainsi une relation synergique entre ces deux micro-organismes. L'observation de corrélations positives, liant plusieurs espèces de *Rickettsia* pathogènes avec *Ca. Midichloria* chez la tique est particulièrement intéressante, quand on sait que les espèces du genre *Rickettsia* (symbiotiques) sont souvent impliquées dans des corrélations négatives avec d'autres micro-organismes appartenant à des genres symbiotiques ou pathogènes (Burgdorfer *et al.*, 1981; Burgdorfer, 1988; Macaluso *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2008; Telford, 2009; Williams-Newkirk *et al.*, 2014; Gall *et al.*, 2016; René-Martellet *et al.*, 2017).

Excepté ce lien entre *Ca. Midichloria* et les OTUs du genre *Rickettsia*, aucune autre interaction n'a pu être mise en évidence entre d'autres potentiels agents pathogènes comme

les *Anaplasma* et les *Borrelia*, et certaines OTUs appartenant au reste du microbiote d'*I. ricinus*. Ces premiers résultats peuvent paraître surprenants au vu de certaines études ayant mis en évidence, chez *I. scapularis*, l'altération de la composition et la structure du microbiote, en présence d'*A. phagocytophilum*, perturbant ainsi l'intégrité de la matrice péritrophique du tube digestif, ce qui facilite son passage de la barrière intestinale (Abraham *et al.*, 2017). Dans le cas des *Borrelia*, chez cette même espèce de tique, il semble que ce soit la composition du microbiote qui puisse influencer sur l'installation du spirochète (altérée en cas de dysbiose; Narasimhan *et al.*, 2014). Néanmoins, il convient de préciser que ces deux études ont été menées à une échelle différente de la nôtre, c'est-à-dire, en étudiant le microbiote d'un organe particulier, le tube digestif, qui plus est chez une espèce différente. De plus, l'absence de corrélations avec des membres particuliers du microbiote, ne signifie pas nécessairement que leur présence n'affecte pas la composition et la structure globale de ces communautés.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de montrer l'existence de corrélations entre les micro-organismes hébergés par les tiques et probablement ceux d'une espèce parasitoïde de tique. Une perspective intéressante serait de mettre en place un protocole expérimental permettant d'approfondir l'étude de ces interactions. Pour ce qui est de la caractérisation des interactions observées entre *Wolbachia*, *Arsenophonus* et *Spiroplasma*, semblant impliquer *I. hookeri*, la mise en place d'un élevage de cet hyménoptère au laboratoire, à partir des populations présentes en forêt de Sénart, permettrait : 1) de confirmer la co-infection de ces insectes par *Arsenophonus* et *Wolbachia*, et leur absence chez les tiques non parasitées ; 2) de confirmer que la détection de *Spiroplasma* est bien due à la présence de cette bactérie chez *I. ricinus* et non chez *I. hookeri* ; 3) le cas échéant, de comparer l'évolution du parasitisme chez les populations de tiques infectées ou non par *Spiroplasma*; 4) d'étudier l'effet du parasitisme des tiques *I. ricinus* sur la dynamique des *Spiroplasma* au sein des tiques. Dans le cas de l'étude de l'interaction *Ca. Midichloria* et *Rickettsia*, sachant que *Ca. M. mitochondrii* et *R. helvetica*, sont naturellement transmises verticalement chez *I. ricinus* (Burgdorfer *et al.*, 1979; Lo *et al.*, 2006; Sprong *et al.*, 2009), et que la prévalence de *Ca. M. mitochondrii* est très réduite chez les tiques maintenues en élevage depuis plusieurs années (Lo *et al.*, 2006), il serait envisageable de mettre en place un élevage de tiques divisé en plusieurs populations : *Ca. Midichloria* + / *Rickettsia* +, *Ca. Midichloria* - / *Rickettsia* +, et *Ca. Midichloria* + / *Rickettsia* -; permettant ainsi, à l'instar de l'étude réalisée par Budachetri

et al. (2018), d'étudier la dynamique de ces bactéries dans les différentes situations, afin d'étayer nos hypothèses. Lors de ces approches, il sera également essentiel de considérer le concept d'holobionte (Guégan *et al.*, 2018; Simon *et al.*, 2019). En effet, comme illustré par plusieurs exemples évoqués au cours de cette thèse, la tique n'est pas un simple dispositif passif dont la fonction se résume à acquérir et transmettre des agents pathogènes. Elle doit être considérée comme un système actif, en constante interaction avec l'ensemble des membres de son microbiote. Ainsi, outre la nécessité de considérer les interactions existant entre les différents membres des communautés bactériennes d'*I. ricinus*, la caractérisation du potentiel impact de ces interactions sur la biologie de la tique et inversement, doivent être considérés pour permettre une meilleure compréhension de ce système complexe.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, N.M., Liu, L., Jutras, B.L., Yadav, A.K., Narasimhan, S., Gopalakrishnan, V., et al. (2017) Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *PNAS* **114**: E781–E790.
- Agoulon, A., Malandrin, L., Lepigeon, F., Vénisse, M., Bonnet, S., Becker, C.A.M., et al. (2012) A Vegetation Index qualifying pasture edges is related to *Ixodes ricinus* density and to *Babesia divergens* seroprevalence in dairy cattle herds. *Veterinary Parasitology* **185**: 101–109.
- Aivelo, T., Norberg, A., and Tschirren, B. (2019) Bacterial microbiota composition of *Ixodes ricinus* ticks: the role of environmental variation, tick characteristics and microbial interactions. *bioRxiv* 559245.
- Akl, T., Bourgoïn, G., Souq, M.-L., Appolinaire, J., Poirel, M.-T., Gibert, P., et al. (2019) Detection of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* in the French Pyrenees and first identification of *Rickettsia monacensis* in France. *Parasite* **26**:
- Ammazzalorso, A.D., Zolnik, C.P., Daniels, T.J., and Kolokotronis, S.-O. (2015) To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). *PeerJ* **3**: e1147.
- Anderson, B.E. and Neuman, M.A. (1997) *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 203–219.
- Andersson, M., Bartkova, S., Lindestad, O., and Råberg, L. (2013) Co-Infection with ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks in Southern Sweden. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **13**: 438–442.
- Andreotti, R., Pérez de León, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G., and Scoles, G.A. (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology* **11**: 6.
- Angelakis, E., Billeter, S.A., Breitschwerdt, E.B., Chomel, B.B., and Raoult, D. (2010a) Potential for Tick-borne Bartonelloses. *Emerg Infect Dis* **16**: 385–391.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Parola, P., and Raoult, D. (2016) *Rickettsia felis*: The Complex Journey of an Emergent Human Pathogen. *Trends in Parasitology* **32**: 554–564.
- Angelakis, E., Pulcini, C., Waton, J., Imbert, P., Socolovschi, C., Edouard, S., et al. (2010b) Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy Caused by *Bartonella henselae* after Tick Bite. *Clin Infect Dis* **50**: 549–551.
- Angelakis, E. and Raoult, D. (2010) Q fever. *Veterinary Microbiology* **140**: 297–309.
- Arsuaga, M., Gonzalez, L.M., Lobo, C.A., de la Calle, F., Bautista, J.M., Azcárate, I.G., et al. (2016) First Report of *Babesia microti*-Caused Babesiosis in Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **16**: 677–679.
- Bakken, J.S. and Dumler, S. (2008) Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America* **22**: 433–448.
- Balashov, I. (1994) Importance of continental drift in the distribution and evolution of ixodid ticks. *Entomol Rev* **74**: 42–50.
- Baldrian, P. (2017) Microbial activity and the dynamics of ecosystem processes in forest soils. *Current Opinion in Microbiology* **37**: 128–134.
- Balogh, Z., Ferenczi, E., Szeles, K., Stefanoff, P., Gut, W., Szomor, K.N., et al. (2010) Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *Journal of Virological Methods* **163**: 481–485.
- Barbour, A.G., Bunikis, J., Travinsky, B., Hoen, A.G., Diuk-Wasser, M.A., Fish, D., and Tsao, J.I. (2009) Niche Partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the Same

- Tick Vector and Mammalian Reservoir Species. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **81**: 1120–1131.
- Barker, S.C. and Walker, A.R. (2014) Ticks of Australia. The species that infest domestic animals and humans. *Zootaxa* **3816**: 1–144.
- Bass, D., Stentiford, G.D., Wang, H.-C., Koskella, B., and Tyler, C.R. (2019) The Pathobiome in Animal and Plant Diseases. *Trends in Ecology & Evolution*.
- Beauté, J., Spiteri, G., Warns-Petit, E., and Zeller, H. (2018) Tick-borne encephalitis in Europe, 2012 to 2016. *Euro Surveill* **23**:
- Beninati, T., Lo, N., Sacchi, L., Genchi, C., Noda, H., and Bandi, C. (2004) A Novel Alpha-Proteobacterium Resides in the Mitochondria of Ovarian Cells of the Tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2596–2602.
- Binetruy, F., Bailly, X., Chevillon, C., Martin, O.Y., Bernasconi, M.V., and Duron, O. (2019b) Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. *Ticks and Tick-borne Diseases* **10**: 575–584.
- Binetruy, F., Dupraz, M., Buysse, M., and Duron, O. (2019a) Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasites Vectors* **12**: 268.
- Bläckberg, J., Lazarevic, V.L., Hunfeld, K.-P., and Persson, K.E.M. (2018) Low-virulent *Babesia venatorum* infection masquerading as hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol* **97**: 731–733.
- Blaňarová, L., Stanko, M., Miklisová, D., Víchová, B., Mošanský, L., Kraljik, J., et al. (2016) Presence of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Babesia microti* in rodents and two tick species (*Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps*) in Slovakia. *Ticks and Tick-borne Diseases* **7**: 319–326.
- Bohacsova, M., Mediannikov, O., Kazimirova, M., Raoult, D., and Sekeyova, Z. (2016) *Arsenophonus nasoniae* and *Rickettsia* Infection of *Ixodes ricinus* Due to Parasitic Wasp *Ixodiphagus hookeri*. *PLOS ONE* **11**: e0149950.
- Bonnet, S., Brisseau, N., Hermouet, A., Jouglin, M., and Chauvin, A. (2009) Experimental in vitro transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. *Vet Res* **40**: 1–8.
- Bonnet, S., Jouglin, M., L’Hostis, M., and Chauvin, A. (2007b) *Babesia* sp. EU1 from Roe Deer and Transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* **13**: 1208–1210.
- Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L’hostis, M., and Chauvin, A. (2007a) Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology* **134**: 197–207.
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M., and Duron, O. (2017) The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:
- Botha, J. and Smith, R.M.H. (2006) Rapid vertebrate recuperation in the Karoo Basin of South Africa following the End-Permian extinction. *Journal of African Earth Sciences* **45**: 502–514.
- Boyle, W.K., Wilder, H.K., Lawrence, A.M., and Lopez, J.E. (2014) Transmission Dynamics of *Borrelia turicatae* from the Arthropod Vector. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **8**: e2767.
- Breuner, N.E., Dolan, M.C., Replogle, A.J., Sexton, C., Hojgaard, A., Boegler, K.A., et al. (2017) Transmission of *Borrelia miyamotoi* sensu lato relapsing fever group spirochetes in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* nymphs. *Ticks and Tick-borne Diseases* **8**: 677–681.

- Budachetri, K., Browning, R.E., Adamson, S.W., Dowd, S.E., Chao, C.-C., Ching, W.-M., and Karim, S. (2014) An Insight Into the Microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* **51**: 119–129.
- Budachetri, K., Kumar, D., Crispell, G., Beck, C., Dasch, G., and Karim, S. (2018) The tick endosymbiont *Candidatus Midichloria mitochondrii* and selenoproteins are essential for the growth of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick vector. *Microbiome* **6**: 141.
- Buffet, J.-P., Marsot, M., Vaumourin, E., Gasqui, P., Masségli, S., Marcheteau, E., et al. (2012) Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **35**: 583–589.
- Burgdorfer, W. (1988) Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In *Biology of rickettsial diseases*. pp. 33–50.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Péter, O., and Aeschlimann, A. (1979) *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Tropica*.
- Burgdorfer, W., Hayes, S.F., and Mavros, A.J. (1981) Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 585–594.
- Burri, C., Schumann, O., Schumann, C., and Gern, L. (2014) Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks and Tick-borne Diseases* **5**: 245–251.
- Cabezas-Cruz, A., Pollet, T., Estrada-Peña, A., Allain, E., Bonnet, S.I., and Moutailler, S. (2018) Handling the Microbial Complexity Associated to Ticks. *Ticks and Tick-Borne Pathogens*.
- Caini, S., Szomor, K., Ferenczi, E., Gáspár, Á.S., Csohán, Á., Krisztalovics, K., et al. (2012) Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Eurosurveillance* **17**: 20128.
- Carpi, G., Cagnacci, F., Wittekindt, N.E., Zhao, F., Qi, J., Tomsho, L.P., et al. (2011) Metagenomic Profile of the Bacterial Communities Associated with *Ixodes ricinus* Ticks. *PLOS ONE* **6**: e25604.
- Castro, L.R., Gabrielli, S., Iori, A., and Cancrini, G. (2015) Molecular detection of *Rickettsia*, *Borrelia*, and *Babesia* species in *Ixodes ricinus* sampled in northeastern, central, and insular areas of Italy. *Exp Appl Acarol* **66**: 443–452.
- Chastagner, A., Dugat, T., Vourc'h, G., Verheyden, H., Legrand, L., Bachy, V., et al. (2014) Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Veterinary Research* **45**: 114.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., and Malandrin, L. (2009) *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* **40**: 1–18.
- Chitimia-Dobler, L., Araujo, B.C.D., Ruthensteiner, B., Pfeffer, T., and Dunlop, J.A. (2017) *Amblyomma birmittum* a new species of hard tick in Burmese amber. *Parasitology* **144**: 1441–1448.
- Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts-Wilson, J., et al. (1996) Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 1952–1956.

- Chow, J., Tang, H., and Mazmanian, S.K. (2011) Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current Opinion in Immunology* **23**: 473–480.
- Chowdri, H.R., Gugliotta, J.L., Berardi, V.P., Goethert, H.K., Molloy, P.J., Sterling, S.L., and Telford, S.R. (2013) *Borrelia miyamotoi* Infection Presenting as Human Granulocytic Anaplasmosis: A Case Report. *Ann Intern Med* **159**: 21.
- Chvostáč, M., Špitalská, E., Václav, R., Vaculová, T., Minichová, L., and Derdáková, M. (2018) Seasonal Patterns in the Prevalence and Diversity of Tick-Borne *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in an Urban Temperate Forest in South Western Slovakia. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **15**: 994.
- Cirimotich, C.M., Dong, Y., Clayton, A.M., Sandiford, S.L., Souza-Neto, J.A., Mulenga, M., and Dimopoulos, G. (2011) Natural Microbe-Mediated Refractoriness to *Plasmodium* Infection in *Anopheles gambiae*. *Science* **332**: 855–858.
- Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zajac, V., Sroka, J., Buczek, A., and Dutkiewicz, J. (2010) Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* **17**: 283–286.
- Clayton, K.A., Gall, C.A., Mason, K.L., Scoles, G.A., and Brayton, K.A. (2015) The characterization and manipulation of the bacterial microbiome of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Parasites & Vectors* **8**: 632.
- Coipan, E.C., Jahfari, S., Fonville, M., Maassen, C., van der Giessen, J., Takken, W., et al. (2013a) Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 36.
- Coipan, E.C., Jahfari, S., Fonville, M., Maassen, C., van der Giessen, J., Takken, W., et al. (2013b) Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schäfer, S.M., Vitorino, L., et al. (2004) First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 1316–1318.
- Commins, S.P. and Platts-Mills, T.A.E. (2013) Tick bites and red meat allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **13**: 354–359.
- Cosson, J.-F., Michelet, L., Chotte, J., Le Naour, E., Cote, M., Devillers, E., et al. (2014) Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasites & Vectors* **7**: 233.
- Cotté, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H.-J., et al. (2008) Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* **14**: 1074–1080.
- Crowder, C.D., Rounds, M.A., Phillipson, C.A., Picuri, J.M., Matthews, H.E., Halverson, J., et al. (2010) Extraction of Total Nucleic Acids From Ticks for the Detection of Bacterial and Viral Pathogens. *J Med Entomol* **47**: 89–94.
- Cutullé, C., Jonsson, N.N., and Seddon, J.M. (2009) Multiple paternity in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* confirmed by microsatellite analysis. *Exp Appl Acarol* **50**: 51.
- Da Franca, I., Santos, L., Mesquita, T., Collares-Pereira, M., Baptista, S., Vieira, L., et al. (2005) Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wien Klin Wochenschr* **117**: 429–432.

- Dantas-Torres, F. (2015) Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **4**: 452–461.
- Diniz, P.P.V.P., Schulz, B.S., Hartmann, K., and Breitschwerdt, E.B. (2011) “Candidatus Neoehrlichia mikurensis” Infection in a Dog from Germany. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 2059–2062.
- Diuk-Wasser, M.A., Vannier, E., and Krause, P.J. (2016) Coinfection by Ixodes Tick-Borne Pathogens: Ecological, Epidemiological, and Clinical Consequences. *Trends in Parasitology* **32**: 30–42.
- Diza, E., Papa, A., Vezyri, E., Tsounis, S., Milonas, I., and Antoniadis, A. (2004) *Borrelia valaisiana* in Cerebrospinal Fluid. *Emerg Infect Dis* **10**: 1692–1693.
- Dobson, S.J. and Barker, S.C. (1999) Phylogeny of the Hard Ticks (Ixodidae) Inferred from 18S rRNA Indicates That the Genus *Aponommalis* Paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**: 288–295.
- Dugat, T., Chastagner, A., Lagrée, A.-C., Petit, E., Durand, B., Thierry, S., et al. (2014) A new multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. *Parasites & Vectors* **7**: 439.
- Dugat, T., Lagrée, A.-C., Maillard, R., Boulouis, H.-J., and Haddad, N. (2015) Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* **5**:
- van Duijvendijk, G., Coipan, C., Wagemakers, A., Fonville, M., Ersöz, J., Oei, A., et al. (2016) Larvae of *Ixodes ricinus* transmit *Borrelia afzelii* and *B. miyamotoi* to vertebrate hosts. *Parasites & Vectors* **9**: 97.
- Duron, O., Binetruy, F., Noël, V., Cremaschi, J., McCoy, K.D., Arnathau, C., et al. (2017) Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Molecular Ecology* **26**: 2905–2921.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., and Hurst, G.D. (2008) The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology* **6**: 27.
- Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., et al. (2018) Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways. *Current Biology* **28**: 1896-1902.e5.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., and Jourdain, E. (2015) The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends Parasitol* **31**: 536–552.
- Dutra, H.L.C., Rocha, M.N., Dias, F.B.S., Mansur, S.B., Caragata, E.P., and Moreira, L.A. (2016) *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host & Microbe* **19**: 771–774.
- Duvallet, G., Fontenille, D., and Robert, V. (2017) *Entomologie médicale et vétérinaire*, Editions Quae.
- Dzięgiel, B., Adaszek, Ł., Kalinowski, M., and Winiarczyk, S. (2013) Equine granulocytic anaplasmosis. *Research in Veterinary Science* **95**: 316–320.
- Edlow, J.A. and McGillicuddy, D.C. (2008) Tick Paralysis. *Infectious Disease Clinics of North America* **22**: 397–413.
- Ellis, J., Oyston, P.C.F., Green, M., and Titball, R.W. (2002) Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 631–646.

- Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., Pollet, T., Vayssier-Taussat, M., and Cosson, J.-F. (2018b) High Throughput Sequencing and Network Analysis Disentangle the Microbial Communities of Ticks and Hosts Within and Between Ecosystems. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 236.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., and Petney, T.N. (2018a) Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification, Springer.
- Estrada-Peña, A., Sprong, H., Cabezas-Cruz, A., de la Fuente, J., Ramo, A., and Coipan, E.C. (2016) Nested coevolutionary networks shape the ecological relationships of ticks, hosts, and the Lyme disease bacteria of the *Borrelia burgdorferi* (s.l.) complex. *Parasites & Vectors* **9**: 517.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2014) Annual Epidemiologic Report 2014 - Emerging and Vector Borne Diseases. *Report 3*.
- Filippova, N.A. (1977) Arachnida class: ixodid ticks of the subfamily Ixodinae. *Fauna SSSR Paukoobraznye*.
- Fomenko, N.V., Livanova, N.N., Borgoyakov, V.Y., Kozlova, I.V., Shulaykina, I.V., Pukhovskaya, N.M., et al. (2010) Detection of *Borrelia miyamotoi* in ticks *Ixodes persulcatus* from Russia. *Parazitologiya* **44(3)**: 201–211.
- Franke, J., Fritzsche, J., Tomaso, H., Straube, E., Dorn, W., and Hildebrandt, A. (2010) Coexistence of Pathogens in Host-Seeking and Feeding Ticks within a Single Natural Habitat in Central Germany. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6829–6836.
- de la Fuente, J. (2003) The fossil record and the origin of ticks (Acari: Parasitiformes: Ixodida). *Exp Appl Acarol* **29**: 331–344.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., and Sonenshine, D.E. (2008) Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* **13**: 6938–6946.
- Fukunaga, M., TAKAHASHI, Y., TSURUTA, Y., MATSUSHITA, O., RALPH, D., McCLELLAND, M., and NAKAO, M. (1995) Genetic and Phenotypic Analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., Isolated from the Ixodid Tick *Ixodes persulcatus*, the Vector for Lyme Disease in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **45**: 804–810.
- Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., et al. (2016) 16S rRNA Amplicon Sequencing for Epidemiological Surveys of Bacteria in Wildlife. *mSystems* **1**: e00032-16.
- Galindo, R.C., Ayllón, N., Smrdel, K.S., Boadella, M., Beltrán-Beck, B., Mazariegos, M., et al. (2012) Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasites & Vectors* **5**: 181.
- Gall, C.A., Reif, K.E., Scoles, G.A., Mason, K.L., Mousel, M., Noh, S.M., and Brayton, K.A. (2016) The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *The ISME Journal* **10**: 1846–1855.
- Gassner, F., van Vliet, A.J.H., Burgers, S.L.G.E., Jacobs, F., Verbaarschot, P., Hovius, E.K.E., et al. (2010) Geographic and Temporal Variations in Population Dynamics of *Ixodes ricinus* and Associated *Borrelia* Infections in The Netherlands. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**: 523–532.
- Gauthier-Clerc, M., Clerquin, Y., and Handrich, Y. (1998) Hyperinfestation by Ticks *Ixodes uriae*: A Possible Cause of Death in Adult King Penguins, a Long-Lived Seabird. *Colonial Waterbirds* **21**: 229–233.

- Gehringer, H., Schacht, E., Maylaender, N., Zeman, E., Kaysser, P., Oehme, R., et al. (2013) Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis holarctica* in *Ixodes ricinus* ticks from south-western Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases* **4**: 93–100.
- Gerhart, J.G., Moses, A.S., and Raghavan, R. (2016) A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Scientific Reports* **6**: 33670.
- Gilbert, L., Aungier, J., and Tomkins, J.L. (2014) Climate of origin affects tick (*Ixodes ricinus*) host-seeking behavior in response to temperature: implications for resilience to climate change? *Ecology and Evolution* **4**: 1186–1198.
- Glassing, A., Dowd, S.E., Galandiuk, S., Davis, B., and Chiodini, R.J. (2016) Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathogens* **8**: 24.
- Gofton, A.W., Doggett, S., Ratchford, A., Oskam, C.L., Paparini, A., Ryan, U., and Irwin, P. (2015) Bacterial Profiling Reveals Novel “*Ca. Neoehrlichia*”, *Ehrlichia*, and *Anaplasma* Species in Australian Human-Biting Ticks. *PLoS One* **10**:
- Gofton, A.W., Oskam, C.L., Lo, N., Beninati, T., Wei, H., McCarl, V., et al. (2015) Inhibition of the endosymbiont “*Candidatus Midichloria mitochondrii*” during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in *Ixodes* ticks from Australia. *Parasites & Vectors* **8**: 345.
- Gondard, M., Delannoy, S., Pinarello, V., Aprelon, R., Devillers, E., Galon, C., et al. (2019) Upscaling surveillance of tick-borne pathogens in the French Caribbean islands. *bioRxiv* 532457.
- Gottlieb, Y., Lalar, I., and Klasson, L. (2015) Distinctive Genome Reduction Rates Revealed by Genomic Analyses of Two *Coxiella*- Like Endosymbionts in Ticks. *Genome Biol Evol* **7**: 1779–1796.
- Grankvist, A., Andersson, P.-O., Mattsson, M., Sender, M., Vaht, K., Höper, L., et al. (2014) Infections With the Tick-Borne Bacterium “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” Mimic Noninfectious Conditions in Patients With B Cell Malignancies or Autoimmune Diseases. *Clin Infect Dis* **58**: 1716–1722.
- Gray, J., Stedingk, L.V. von, Gürtelschmid, M., and Granström, M. (2002) Transmission Studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* Ticks and Gerbils. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 1259–1263.
- Gray, J.S. (1985) A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. *Exp Appl Acarol* **1**: 35–44.
- Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Levin, M.L., and Tsao, J.I. (2016) Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks and Tick-borne Diseases* **7**: 992–1003.
- Greay, T.L., Gofton, A.W., Paparini, A., Ryan, U.M., Oskam, C.L., and Irwin, P.J. (2018) Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites & Vectors* **11**: 12.
- Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., et al. (2018) The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* **6**: 49.
- Gugliotta, J.L., Goethert, H.K., Berardi, V.P., and Telford, S.R. (2013) Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an Immunocompromised Patient. *New England Journal of Medicine* **368**: 240–245.

- Guizzo, M.G., Parizi, L.F., Nunes, R.D., Schama, R., Albano, R.M., Tirloni, L., et al. (2017) A Coxiella mutualist symbiont is essential to the development of Rhipicephalus microplus. *Sci Rep* **7**: 1–10.
- Gurfield, N., Grewal, S., Cua, L.S., Torres, P.J., and Kelley, S.T. (2017) Endosymbiont interference and microbial diversity of the Pacific coast tick, Dermacentor occidentalis, in San Diego County, California. *PeerJ* **5**: e3202.
- Gyuranecz, M., Rigó, K., Dán, Á., Földvári, G., Makrai, L., Dénes, B., et al. (2010) Investigation of the Ecology of Francisella tularensis During an Inter-Epizootic Period. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**: 1031–1035.
- Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Beugnet, F., Menach, A.L., Boulouis, H.-J., and Vayssier-Taussat, M. (2005) Evidence of Bartonella sp. in questing adult and nymphal Ixodes ricinus ticks from France and co-infection with Borrelia burgdorferi sensu lato and Babesia sp. *Vet Res* **36**: 79–87.
- Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Menach, A.L., et al. (2004) Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res* **35**: 709–713.
- Hamer, S.A., Hickling, G.J., Keith, R., Sidge, J.L., Walker, E.D., and Tsao, J.I. (2012) Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with Borrelia miyamotoi and Borrelia andersonii in Michigan, U.S.A. *Parasites & Vectors* **5**: 231.
- Hamsten, C., Starkhammar, M., Tran, T. a. T., Johansson, M., Bengtsson, U., Ahlén, G., et al. (2013a) Identification of galactose- α -1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick Ixodes ricinus; possible relationship with red meat allergy. *Allergy* **68**: 549–552.
- Hamsten, C., Tran, T.A.T., Starkhammar, M., Brauner, A., Commins, S.P., Platts-Mills, T.A.E., and Hage, M. van (2013b) Red meat allergy in Sweden: Association with tick sensitization and B-negative blood groups. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **132**: 1431-1434.e6.
- Hanincova, K., Taragelova, V., Koci, J., Schafer, S.M., Hails, R., Ullmann, A.J., et al. (2003) Association of Borrelia garinii and B. valaisiana with Songbirds in Slovakia. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2825–2830.
- Hasle, G. (2013) Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:
- Hasle, G., Bjune, G., Edvardsen, E., Jakobsen, C., Linnehol, B., Røer, J.E., et al. (2009) Transport of Ticks by Migratory Passerine Birds to Norway. *para* **95**: 1342–1351.
- Hasle, G., Røed, K.H., and Leinaas, H.P. (2008) Multiple Paternity in Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), Assessed by Microsatellite Markers. *para* **94**: 345–347.
- Hawlena, H., Rynkiewicz, E., Toh, E., Alfred, A., Durden, L.A., Hastriter, M.W., et al. (2013) The arthropod, but not the vertebrate host or its environment, dictates bacterial community composition of fleas and ticks. *The ISME Journal* **7**: 221–223.
- Heise, S.R., Elshahed, M.S., and Little, S.E. (2010) Bacterial Diversity in Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae) With a Focus on Members of the Genus Rickettsia. *J Med Entomol* **47**: 258–268.
- Hernández-Jarguín, A., Díaz-Sánchez, S., Villar, M., and de la Fuente, J. (2018) Integrated metatranscriptomics and metaproteomics for the characterization of bacterial microbiota in unfed Ixodes ricinus. *Ticks and Tick-borne Diseases* **9**: 1241–1251.
- Herrmann, C. and Gern, L. (2012) Do the level of energy reserves, hydration status and Borrelia infection influence walking by Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) ticks? *Parasitology* **139**: 330–337.

- Herrmann, C. and Gern, L. (2015) Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors* **8**: 6.
- Herrmann, C. and Gern, L. (2010) Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) Under Challenging Conditions of Temperature and Humidity is Influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato Infection. <http://dx.doi.org/10.1603/ME10111>.
- Herrmann, C., Gern, L., and Voordouw, M.J. (2013a) Species co-occurrence patterns among Lyme borreliosis pathogens in the tick vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 7273–7280.
- Herrmann, C., Voordouw, M.J., and Gern, L. (2013b) *Ixodes ricinus* ticks infected with the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, have higher energy reserves. *International Journal for Parasitology* **43**: 477–483.
- Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., Giessen, J. van der, Sprong, H., Porter, S.R., et al. (2010) A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **8**: 33–50.
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K.-P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., et al. (2007) First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**: 595–601.
- Hilger, C., Bessot, J.-C., Hutt, N., Grigioni, F., de Blay, F., Pauli, G., and Hentges, F. (2005) IgE-mediated anaphylaxis caused by bites of the pigeon tick *Argas reflexus*: Cloning and expression of the major allergen Arg r 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**: 617–622.
- Hofmann-Lehmann, R., Wagmann, N., Meli, M.L., Riond, B., Novacco, M., Joekel, D., et al. (2016) Detection of “*Candidatus Neorhlichia mikurensis*” and other Anaplasmataceae and Rickettsiaceae in Canidae in Switzerland and Mediterranean countries. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **158**: 691–700.
- Hoogstraal, H. (1985) Argasid and Nuttalliellid Ticks as Parasites and Vectors. In *Advances in Parasitology*. Baker, J.R. and Muller, R. (eds). Academic Press, pp. 135–238.
- Hoogstraal, H. and Aeschlimann, A. (1982) Tick-host specificity. *Bulletin de la société entomologique suisse* **55**: 5–32.
- Hovius, J.W.R., Li, X., Ramamoorthi, N., van Dam, A.P., Barthold, S.W., van der Poll, T., et al. (2007) Coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia garinii* alters the course of murine Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **49**: 224–234.
- Hubálek, Z. and Halouzka, J. (1998) Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitology Research* **84**: 167–172.
- Hubálek, Z. and Rudolf, I. (2012) Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* **111**: 9–36.
- Hudopisk, N., Korva, M., Janet, E., Simetinger, M., Grgič-Vitek, M., Gubenšek, J., et al. (2013) Tick-borne Encephalitis Associated with Consumption of Raw Goat Milk, Slovenia, 2012. *Emerg Infect Dis* **19**: 806–808.
- Huhn, C., Winter, C., Wolfesperger, T., Wüppenhorst, N., Smrdel, K.S., Skuballa, J., et al. (2014) Analysis of the Population Structure of *Anaplasma phagocytophilum* Using Multilocus Sequence Typing. *PLOS ONE* **9**: e93725.
- Hunter, D.J., Torkelson, J.L., Bodnar, J., Mortazavi, B., Laurent, T., Deason, J., et al. (2015) The *Rickettsia* Endosymbiont of *Ixodes pacificus* Contains All the Genes of De Novo Folate Biosynthesis. *PLOS ONE* **10**: e0144552.

- Hurst, G.D.D., Schulenburg, J.H.G. von der, Majerus, T.M.O., Bertrand, D., Zakharov, I.A., Baungaard, J., et al. (1999) Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. *Insect Molecular Biology* **8**: 133–139.
- Jaenson, T.G., Jaenson, D.G., Eisen, L., Petersson, E., and Lindgren, E. (2012) Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasites & Vectors* **5**: 8.
- Jaenson, T.G.T. and Lindgren, E. (2011) The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2**: 44–49.
- Jaenson, T.G.T. and Tälleklint, L. (1992) Incompetence of Roe Deer as Reservoirs of the Lyme Borreliosis Spirochete. *Journal of Medical Entomology* **29**: 813–817.
- Jahfari, S., Coipan, E.C., Fonville, M., van Leeuwen, A.D., Hengeveld, P., Heylen, D., et al. (2014) Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasites & Vectors* **7**: 365.
- Jahfari, S., Hofhuis, A., Fonville, M., Giessen, J. van der, Pelt, W. van, and Sprong, H. (2016) Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Humans with Tick Bites and Erythema Migrans, in the Netherlands. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **10**: e0005042.
- Jereb, M., Pecaver, B., Tomazic, J., Muzlovic, I., Avsic-Zupanc, T., Premru-Srsen, T., et al. (2012) Severe Human Granulocytic Anaplasmosis Transmitted by Blood Transfusion. *Emerg Infect Dis* **18**: 1354–1357.
- Jeyaparakash, A. and Hoy, M.A. (2009) First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Exp Appl Acarol* **47**: 1–18.
- Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D., Jiggins, C.D., Schulenburg, J.H.G. v d, and Majerus, M.E.N. (2000) The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology* **120**: 439–446.
- Jongejan, F. and Uilenberg, G. (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* **129**: S3–S14.
- Jouglin, M., Perez, G., Butet, A., Malandrin, L., and Bastian, S. (2017) Low prevalence of zoonotic *Babesia* in small mammals and *Ixodes ricinus* in Brittany, France. *Veterinary Parasitology* **238**: 58–60.
- Kahl, O. and Knülle, W. (1988) Water vapour uptake from subsaturated atmospheres by engorged immature ixodid ticks. *Exp Appl Acarol* **4**: 73–83.
- Kawahara, M., Rikihisa, Y., Isogai, E., Takahashi, M., Misumi, H., Suto, C., et al. (2004) Ultrastructure and phylogenetic analysis of ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks.’ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 1837–1843.
- Kazimirova, M. and Stibraniova, I. (2013) Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:.
- Kelly, J.R., Borre, Y., O’ Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., et al. (2016) Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of Psychiatric Research* **82**: 109–118.
- Kersh, G.J., Wolfe, T.M., Fitzpatrick, K.A., Candee, A.J., Oliver, L.D., Patterson, N.E., et al. (2010) Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the Environment of the United States, 2006 to 2008. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4469–4475.

- Kleine-Tebbe, J., Heinatz, A., Gräser, I., Dautel, H., Hansen, G.N., Kespohl, S., et al. (2006) Bites of the European pigeon tick (*Argas reflexus*): Risk of IgE-mediated sensitizations and anaphylactic reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **117**: 190–195.
- Klompen, J.S.H., Black, W.C., Keirans, J.E., and Norris, D.E. (2000) Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. *Cladistics* **16**: 70–102.
- Klyachko, O., Stein, B.D., Grindle, N., Clay, K., and Fuqua, C. (2007) Localization and Visualization of a Coxiella-Type Symbiont within the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6584–6594.
- Knight, R., Vrbanc, A., Taylor, B.C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., et al. (2018) Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology* **16**: 410.
- Krause, P.J., Fish, D., Narasimhan, S., and Barbour, A.G. (2015) *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clinical Microbiology and Infection* **21**: 631–639.
- Krause, P.J., Narasimhan, S., Wormser, G.P., Rollend, L., Fikrig, E., Lepore, T., et al. (2013) Human *Borrelia miyamotoi* Infection in the United States. *N Engl J Med* **368**: 291–293.
- Krause, P.J., Telford, S.R., Spielman, A., Sikand, V., Ryan, R., Christianson, D., et al. (1996) Concurrent Lyme Disease and Babesiosis: Evidence for Increased Severity and Duration of Illness. *JAMA* **275**: 1657–1660.
- Kurtenbach, K., Sewell, H.-S., Ogden, N.H., Randolph, S.E., and Nuttall, P.A. (1998) Serum Complement Sensitivity as a Key Factor in Lyme Disease Ecology. **66**: 4.
- Lagrée, A.-C., Rouxel, C., Kevin, M., Dugat, T., Girault, G., Durand, B., et al. (2018) Co-circulation of different *A. phagocytophilum* variants within cattle herds and possible reservoir role for cattle. *Parasites & Vectors* **11**: 163.
- Lalzar, I., Friedmann, Y., and Gottlieb, Y. (2014) Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environmental Microbiology* **16**: 3657–3668.
- Lalzar, I., Harrus, S., Mumcuoglu, K.Y., and Gottlieb, Y. (2012) Composition and Seasonal Variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4110–4116.
- Landesman, W.J., Mulder, K., Allan, B.F., Bashor, L.A., Keesing, F., LoGiudice, K., and Ostfeld, R.S. (2019) Potential effects of blood meal host on bacterial community composition in *Ixodes scapularis* nymphs. *Ticks and Tick-borne Diseases* **10**: 523–527.
- Lees, A.D. (1948) The Sensory Physiology of the Sheep Tick, *Ixodes Ricinus* L. *Journal of Experimental Biology* **25**: 145–207.
- Léger, E., Vourc'h, G., Vial, L., Chevillon, C., and McCoy, K.D. (2013) Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Exp Appl Acarol* **59**: 219–244.
- Lejal, E., Estrada-Peña, A., Marsot, M., Cosson, J.-F., Rué, O., Mariadassou, M., et al. (2019c) Taxon appearance from extraction and amplification steps demonstrates the value of multiple controls in tick microbiome analysis. *bioRxiv* 714030.
- Lejal, E., Marsot, M., Chalvet-Monfray, K., Cosson, J.-F., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M., and Pollet, T. (2019a) A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest. *bioRxiv* 597013.
- Lejal, E., Moutailler, S., Šimo, L., Vayssier-Taussat, M., and Pollet, T. (2019b) Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors* **12**: 152.
- Lempereur, L., De Cat, A., Caron, Y., Madder, M., Claerebout, E., Saegerman, C., and Losson, B. (2010) First Molecular Evidence of Potentially Zoonotic *Babesia microti* and

- Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* Ticks in Belgium. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**: 125–130.
- Li, H., Jiang, J.-F., Liu, W., Zheng, Y.-C., Huo, Q.-B., Tang, K., et al. (2012) Human Infection with *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, China. *Emerg Infect Dis* **18**: 1636–1639.
- Little, E.A.H., Anderson, J.F., Stafford, K.C., Eisen, L., Eisen, R.J., and Molaei, G. (2019) Predicting spatiotemporal patterns of Lyme disease incidence from passively collected surveillance data for *Borrelia burgdorferi sensu lato*-infected *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*.
- Little, S.E. (2010) Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* **40**: 1121–1140.
- Lo, N., Beninati, T., Sasser, D., Bouman, E. a. P., Santagati, S., Gern, L., et al. (2006) Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Microbiology* **8**: 1280–1287.
- Loewenich, F.D. von, Geißdörfer, W., Disqué, C., Matten, J., Schett, G., Sakka, S.G., and Bogdan, C. (2010) Detection of “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” in Two Patients with Severe Febrile Illnesses: Evidence for a European Sequence Variant. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 2630–2635.
- Lommano, E., Bertaiola, L., Dupasquier, C., and Gern, L. (2012) Infections and co-infections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4606–4612.
- Lommano, E., Dvořák, C., Vallotton, L., Jenni, L., and Gern, L. (2014) Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks and Tick-borne Diseases* **5**: 871–882.
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M., and Azad, A.F. (2002) Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second Rickettsia. *J Med Entomol* **39**: 809–813.
- Machado-Ferreira, E., Dietrich, G., Hojgaard, A., Levin, M., Piesman, J., Zeidner, N.S., and Soares, C.A.G. (2011) *Coxiella* Symbionts in the Cayenne Tick *Amblyomma cajennense*. *Microb Ecol* **62**: 134–142.
- Maggi, R.G., Ericson, M., Mascarelli, P.E., Bradley, J.M., and Breitschwerdt, E.B. (2013) *Bartonella henselae* bacteremia in a mother and son potentially associated with tick exposure. *Parasites & Vectors* **6**: 101.
- Majerus, M.E.N., Hinrich, J., Schulenburg, G.V.D., and Zakharov, I.A. (2000) Multiple causes of male-killing in a single sample of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) from Moscow. *Heredity* **84**: 605–609.
- Majerus, T.M.O., Schulenburg, J.H.G.V.D., Majerus, M.E.N., and Hurst, G.D.D. (1999) Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Insect Molecular Biology* **8**: 551–555.
- Mans, B.J., Featherston, J., Kvas, M., Pillay, K.-A., de Klerk, D.G., Pienaar, R., et al. (2019) Argasid and ixodid systematics: Implications for soft tick evolution and systematics, with a new argasid species list. *Ticks and Tick-borne Diseases* **10**: 219–240.
- Mans, B.J., Klerk, D. de, Pienaar, R., Castro, M.H. de, and Latif, A.A. (2012) The Mitochondrial Genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and *Argas africanus* (Ixodoidea: Argasidae): Estimation of Divergence Dates for the Major Tick Lineages and Reconstruction of Ancestral Blood-Feeding Characters. *PLOS ONE* **7**: e49461.

- Mans, B.J., Klerk, D. de, Pienaar, R., and Latif, A.A. (2011) Nuttalliella namaqua: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. *PLOS ONE* **6**: e23675.
- Materna, J., Daniel, M., and Danielová, V. (2005) Altitudinal distribution limit of the tick Ixodes ricinus shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* **13**: 24–28.
- Materna, J., Daniel, M., Metelka, L., and Harčarik, J. (2008) The vertical distribution, density and the development of the tick Ixodes ricinus in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonoše Mts., Czech Republic). *International Journal of Medical Microbiology* **298**: 25–37.
- Maurin, M. and Gyuranecz, M. (2016) Tularaemia: clinical aspects in Europe. *The Lancet Infectious Diseases* **16**: 113–124.
- McArdle, A.J., Turkova, A., and Cunnington, A.J. (2018) When do co-infections matter? *Curr Opin Infect Dis* **31**: 209–215.
- McCoy, K.D. and Boulanger, N. (2016) Tiques et maladies à tiques: Biologie, écologie évolutive, épidémiologie, IRD Éditions.
- McCoy, K.D. and Tirard, C. (2002) Reproductive Strategies of the Seabird Tick Ixodes uriae (Acari: Ixodidae). *The Journal of Parasitology* **88**: 813–816.
- Mediannikov, O., Subramanian, G., Sekeyova, Z., Bell-Sakyi, L., and Raoult, D. (2012) Isolation of Arsenophonus nasoniae from Ixodes ricinus ticks in Slovakia. *Ticks and Tick-borne Diseases* **3**: 367–370.
- Medlock, J.M., Hansford, K.M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J.-C., et al. (2013) Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe. *Parasites & Vectors* **6**: 1.
- Meer-Scherrer, L., Adelson, M., Mordechai, E., Lottaz, B., and Tilton, R. (2004) Babesia microti Infection in Europe. *Curr Microbiol* **48**: 435–437.
- Mehlhorn, H. (2001) Encyclopedic Reference of Parasitology: Biology, Structure, Function, Springer Science & Business Media.
- Meiners, T., Hammer, B., Göbel, U.B., and Kahl, O. (2006) Determining the tick scutal index allows assessment of tick feeding duration and estimation of infection risk with Borrelia burgdorferi sensu lato in a person bitten by an Ixodes ricinus nymph. *International Journal of Medical Microbiology* **296**: 103–107.
- Mejlon, H.A. and Jaenson, T.G.T. (1997) Questing behaviour of Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodidae). **8**.
- Menchaca, A.C., Visi, D.K., Strey, O.F., Teel, P.D., Kalinowski, K., Allen, M.S., and Williamson, P.C. (2013) Preliminary Assessment of Microbiome Changes Following Blood-Feeding and Survivorship in the Amblyomma americanum Nymph-to-Adult Transition using Semiconductor Sequencing. *PLOS ONE* **8**: e67129.
- Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., et al. (2014) High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 103.
- Moniuszko, A., Dunaj, J., Świącicka, I., Zambrowski, G., Chmielewska-Badora, J., Żukiewicz-Sobczak, W., et al. (2014) Co-infections with Borrelia species, Anaplasma phagocytophilum and Babesia spp. in patients with tick-borne encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**: 1835–1841.

- Moran, N.A., McCutcheon, J.P., and Nakabachi, A. (2008) Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**: 165–190.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., et al. (2009) A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* **139**: 1268–1278.
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., and Failloux, A.-B. (2012) The Native Wolbachia Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **6**: e1989.
- Moutailler, S., Moro, C.V., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., et al. (2016) Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **10**: e0004539.
- Nakao, R., Abe, T., Nijhof, A.M., Yamamoto, S., Jongejan, F., Ikemura, T., and Sugimoto, C. (2013) A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. *The ISME Journal* **7**: 1003–1015.
- Narasimhan, S. and Fikrig, E. (2015) Tick microbiome: the force within. *Trends in Parasitology* **31**: 315–323.
- Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y.O., Heisig, J., Pan, J., et al. (2014) Gut Microbiota of the Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. *Cell Host & Microbe* **15**: 58–71.
- Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linløkken, A., Wilson, R., and Rudi, K. (2014) Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology & Motility* **26**: 1155–1162.
- Nava, S. (2009) An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci* **Volume**: 2857.
- Needham, G.R., Rosell, R., and Greenwald, L. (1990) Ultrastructure of type-I salivary-gland acini in four species of ticks and the influence of hydration states on the type-I acini of *Amblyomma americanum*. *Exp Appl Acarol* **10**: 83–104.
- Neelakanta, G., Sultana, H., Fish, D., Anderson, J.F., and Fikrig, E. (2010) *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J Clin Invest* **120**: 3179–3190.
- Nieto, N.C. and Foley, J.E. (2008) Meta-Analysis of Coinfection and Coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Humans, Domestic Animals, Wildlife, and *Ixodes ricinus*-Complex Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **9**: 93–102.
- Obiegala, A., Pfeffer, M., Pfister, K., Tiedemann, T., Thiel, C., Balling, A., et al. (2014) *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasites & Vectors* **7**: 563.
- Obiegala, A. and Silaghi, C. (2018) *Candidatus Neoehrlichia Mikurensis*—Recent Insights and Future Perspectives on Clinical Cases, Vectors, and Reservoirs in Europe. *Curr Clin Micro Rpt* **5**: 1–9.
- Ohnishi, J., Piesman, J., and Silva, A.M. de (2001) Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *PNAS* **98**: 670–675.
- Oliver, J.H. (1989) Biology and Systematics of Ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics* **20**: 397–430.
- Olivieri, E., Epis, S., Castelli, M., Varotto Boccazzi, I., Romeo, C., Desirò, A., et al. (2019) Tissue tropism and metabolic pathways of *Midichloria mitochondrii* suggest tissue-specific

- functions in the symbiosis with *Ixodes ricinus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* **10**: 1070–1077.
- Oteo, J.A. and Portillo, A. (2012) Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases* **3**: 271–278.
- Parola, P., Beati, L., Cambon, M., and Raoult, D. (1998) First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**: 95–100.
- Parola, P. and Raoult, D. (2001) Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* **7**: 80–83.
- Peñalver, E., Arillo, A., Delclòs, X., Peris, D., Grimaldi, D.A., Anderson, S.R., et al. (2017) Ticks parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. *Nature Communications* **8**: 1924.
- Pérez-Eid, C. (2007) Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire, Lavoisier.
- Perlman Steve J, Hunter Martha S, and Zchori-Fein Einat (2006) The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 2097–2106.
- Perret, J.-L., Guerin, P.M., Diehl, P.A., Vlimant, M., and Gern, L. (2003) Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Experimental Biology* **206**: 1809–1815.
- Petersen, J.M., Mead, P.S., and Schriefer, M.E. (2009) *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res* **40**: 1.
- Piesman, J. (1991) Experimental Acquisition of the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by Larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) During Partial Blood Meals. *Journal of Medical Entomology* **28**: 259–262.
- Piesman, J. and Eisen, L. (2008) Prevention of Tick-Borne Diseases. *Annual Review of Entomology* **53**: 323–343.
- Piesman, J. and Schneider, B.S. (2002) Dynamic Changes in Lyme Disease Spirochetes During Transmission by Nymphal Ticks. *Exp Appl Acarol* **28**: 141–145.
- Plantard, O., Bouju-Albert, A., Malard, M.-A., Hermouet, A., Capron, G., and Verheyden, H. (2012) Detection of *Wolbachia* in the Tick *Ixodes ricinus* is Due to the Presence of the Hymenoptera Endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLOS ONE* **7**: e30692.
- Platonov, A.E., Karan, L.S., Kolyasnikova, N.M., Makhneva, N.A., Toporkova, M.G., Maleev, V.V., et al. (2011) Humans Infected with Relapsing Fever Spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis* **17**: 1816–1823.
- Poinar, G. (2015) Spirochete-like cells in a Dominican amber *Amblyomma* tick (Arachnida: Ixodidae). *Historical Biology* **27**: 565–570.
- Poinar, G. and Brown, A.E. (2003) A new genus of hard ticks in Cretaceous Burmese amber (Acari: Ixodida: Ixodidae). *Syst Parasitol* **54**: 199–205.
- Pollet, T., Sprong, H., Lejal, E., Krawczyk, A.I., Moutailler, S., Cosson, J.-F., et al. (2020) The scale affects our view on the identification and distribution of microbial communities in ticks. *Parasites Vectors* **13**: 36.
- Portillo, A., Palomar, A.M., Toro, M. de, Santibáñez, S., Santibáñez, P., and Oteo, J.A. (2019) Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: To investigate the vectors for diagnosis. *PLOS ONE* **14**: e0213384.
- Qiu, Y., Nakao, R., Ohnuma, A., Kawamori, F., and Sugimoto, C. (2014) Microbial Population Analysis of the Salivary Glands of Ticks; A Possible Strategy for the Surveillance of Bacterial Pathogens. *PLOS ONE* **9**: e103961.

- Qviller, L., Viljugrein, H., Loe, L.E., Meisingset, E.L., and Mysterud, A. (2016) The influence of red deer space use on the distribution of *Ixodes ricinus* ticks in the landscape. *Parasites & Vectors* **9**: 545.
- Raileanu, C., Moutailler, S., Pavel, I., Porea, D., Mihalca, A.D., Savuta, G., and Vayssier-Taussat, M. (2017) *Borrelia* Diversity and Co-infection with Other Tick Borne Pathogens in Ticks. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 36.
- Randolph, S.E. (2009) Tick-borne disease systems emerge from the shadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology* **136**: 1403–1413.
- Randolph, S.E. (1998) Ticks are not Insects: Consequences of Contrasting Vector Biology for Transmission Potential. *Parasitology Today* **14**: 186–192.
- Randolph, S.E. (2011) Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis* **2**: 179–182.
- Rauter, C. and Hartung, T. (2005) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7203–7216.
- Regan, J., Matthias, J., Green-Murphy, A., Stanek, D., Bertholf, M., Pritt, B.S., et al. (2013) A Confirmed *Ehrlichia ewingii* Infection Likely Acquired Through Platelet Transfusion. *Clin Infect Dis* **56**: e105-107.
- Reis, C., Cote, M., Rhun, D.L., Lecuelle, B., Levin, M.L., Vayssier-Taussat, M., and Bonnet, S.I. (2011) Vector Competence of the Tick *Ixodes ricinus* for Transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **5**: e1186.
- René-Martellet, M., Minard, G., Massot, R., Tran Van, V., Valiente Moro, C., Chabanne, L., and Mavingui, P. (2017) Bacterial microbiota associated with *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) ticks from France, Senegal and Arizona. *Parasites & Vectors* **10**: 416.
- Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A., and Muller, C.P. (2010) Prevalence and Seasonality of Tick-Borne Pathogens in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2923–2931.
- Reye, A.L., Stegny, V., Mishaeva, N.P., Velhin, S., Hübschen, J.M., Ignatyev, G., and Muller, C.P. (2013) Prevalence of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* Ticks from Different Geographical Locations in Belarus. *PLOS ONE* **8**: e54476.
- Richter, D., Schlee, D.B., and Matuschka, F.-R. (2003) Relapsing Fever–Like Spirochetes Infecting European Vector Tick of Lyme Disease Agent. *Emerg Infect Dis* **9**: 697–701.
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., et al. (2013) Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* **341**: 1241214.
- Rizzoli, A., Hauffe, H.C., Carpi, G., Vourc'h, G.I., Neteler, M., and Rosà, R. (2011) Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance* **16**: 19906.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., et al. (2014) *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front Public Health* **2**:
- Roest, H.I.J., Bossers, A., Zijderfeld, F.G. van, and Rebel, J.M.L. (2013) Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *Veterinary Quarterly* **33**: 148–160.
- Rollend, L., Fish, D., and Childs, J.E. (2013) Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: A summary of the literature and recent observations. *Ticks and Tick-borne Diseases* **4**: 46–51.

- Rosenberg, R. (2018) Vital Signs: Trends in Reported Vectorborne Disease Cases — United States and Territories, 2004–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **67**:.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Mokráček, A., Piskunová, N., Růžek, D., Mallatová, N., and Grubhoffer, L. (2008) Detection of *Borrelia bissettii* in Cardiac Valve Tissue of a Patient with Endocarditis and Aortic Valve Stenosis in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 3540–3543.
- Ruiz-López, M.J., Chaskelson, S., Gompper, M.E., and Eggert, L.S. (2012) Multiple Paternity In the American Dog Tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *para* **98**: 498–501.
- Ruzić-Sabljić, E., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Jurca, T., Logar, M., Pikelj-Pecnik, A., and Strle, F. (2002) Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* **114**: 544–550.
- Ryan, E.T. (2013) The Intestinal Pathobiome: Its Reality and Consequences Among Infants and Young Children in Resource-Limited Settings. *J Infect Dis* **208**: 1732–1733.
- Rynkiewicz, E.C., Hemmerich, C., Rusch, D.B., Fuqua, C., and Clay, K. (2015) Concordance of bacterial communities of two tick species and blood of their shared rodent host. *Molecular Ecology* **24**: 2566–2579.
- Sacchi, L., Bigliardi, E., Corona, S., Beninati, T., Lo, N., and Franceschi, A. (2004) A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue and Cell* **36**: 43–53.
- Sahney, S. and Benton, M.J. (2008) Recovery from the most profound mass extinction of all time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 759–765.
- Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Calus, S.T., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., et al. (2014) Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology* **12**: 87.
- Sanada-Morimura, S., Matsumura, M., and Noda, H. (2013) Male Killing Caused by a *Spiroplasma* Symbiont in the Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus*. *J Hered* **104**: 821–829.
- Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E.A.P., Sacchi, L., Fabbi, M., and Lo, N. (2006) ‘Candidatus *Midichloria mitochondrii*’, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**: 2535–2540.
- Sato, K., Takano, A., Konnai, S., Nakao, M., Ito, T., Koyama, K., et al. (2014) Human Infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan. *Emerg Infect Dis* **20**: 1391–1393.
- Schicht, S., Junge, S., Schnieder, T., and Strube, C. (2011) Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and Coinfection with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in the Hard Tick *Ixodes ricinus* in the City of Hanover (Germany). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**: 1595–1597.
- Schouls, L.M., Pol, I.V.D., Rijpkema, S.G.T., and Schot, C.S. (1999) Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 2215–2222.
- Schwan, T.G. and Piesman, J. (2000) Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme Disease-Associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of Infection in Ticks and Mice. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 382–388.
- Scoles, G.A., Papero, M., Beati, L., and Fish, D. (2001) A Relapsing Fever Group Spirochete Transmitted by *Ixodes scapularis* Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **1**: 21–34.
- Sertour, N., Cotté, V., Garnier, M., Malandrin, L., Ferquel, E., and Choumet, V. (2018) Infection Kinetics and Tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Mouse After

- Natural (via Ticks) or Artificial (Needle) Infection Depends on the Bacterial Strain. *Frontiers in Microbiology* **9**.
- Silaghi, C., Beck, R., Oteo, J.A., Pfeffer, M., and Sprong, H. (2016) Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Exp Appl Acarol* **68**: 279–297.
- Silaghi, C., Skuballa, J., Thiel, C., Pfister, K., Petney, T., Pfäffle, M., et al. (2012) The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) – A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks and Tick-borne Diseases* **3**: 49–54.
- Šimo, L., Slovák, M., Park, Y., and Žitňan, D. (2009) Identification of a complex peptidergic neuroendocrine network in the hard tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *Cell Tissue Res* **335**: 639–655.
- Šimo, L., Žitňan, D., and Park, Y. (2012) Neural control of salivary glands in ixodid ticks. *Journal of Insect Physiology* **58**: 459–466.
- Simon, J.-C., Marchesi, J.R., Mougél, C., and Selosse, M.-A. (2019) Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* **7**: 5.
- Sinkins, S.P. (2004) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**: 723–729.
- Skotarczak, B., Wodecka, B., and Cichocka, A. (2002) Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med* **9**: 25–28.
- Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J., and Raghavan, R. (2015) A *Coxiella*-Like Endosymbiont Is a Potential Vitamin Source for the Lone Star Tick. *Genome Biol Evol* **7**: 831–838.
- Sonenshine, D.E. (1991) *Biology of ticks*, New York: Oxford University Press.
- Sonenshine, D.E. and Roe, R.M. (2014) *Biology of Ticks*, OUP USA.
- Sperling, J.L., Silva-Brandão, K.L., Brandão, M.M., Lloyd, V.K., Dang, S., Davis, C.S., et al. (2017) Comparison of bacterial 16S rRNA variable regions for microbiome surveys of ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* **8**: 453–461.
- Sprong, H., Wielinga, P.R., Fonville, M., Reusken, C., Brandenburg, A.H., Borgsteede, F., et al. (2009) *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasites & Vectors* **2**: 41.
- Stanek, G., Wormser, G.P., Gray, J., and Strle, F. (2012) Lyme borreliosis. *The Lancet* **379**: 461–473.
- States, S.L., Huang, C.I., Davis, S., Tufts, D.M., and Diuk-Wasser, M.A. (2017) Co-feeding transmission facilitates strain coexistence in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Epidemics* **19**: 33–42.
- Steiner, F.E., Pinger, R.R., Vann, C.N., Grindle, N., Civitello, D., Clay, K., and Fuqua, C. (2008) Infection and Co-infection Rates of *Anaplasma phagocytophilum* Variants, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, and the Rickettsial Endosymbiont in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from Sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin. *J Med Entomol* **45**: 289–297.
- Strle, F. and Stanek, G. (2009) Clinical Manifestations and Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Lyme Borreliosis* **37**: 51–110.
- Strnad, M., Hönig, V., Růžek, D., Grubhoffer, L., and Rego, R.O.M. (2017) Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks. *Applied and Environmental Microbiology* **83**: e00609-17.
- Stuen, S., Granquist, E.G., and Silaghi, C. (2013) *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* **3**.

- Sukumaran, B., Narasimhan, S., Anderson, J.F., DePonte, K., Marcantonio, N., Krishnan, M.N., et al. (2006) An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *Journal of Experimental Medicine* **203**: 1507–1517.
- Swei, A. and Kwan, J.Y. (2017) Tick microbiome and pathogen acquisition altered by host blood meal. *The ISME Journal* **11**: 813–816.
- Sytykiewicz, H., Karbowiak, G., Hapunik, J., Szepechcinski, A., Supergan-Marwicz, M., Golawska, S., et al. (2012) Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **19**:
- Takken, W., van Vliet, A.J.H., Verhulst, N.O., Jacobs, F.H.H., Gassner, F., Hartemink, N., et al. (2016) Acarological Risk of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Infections Across Space and Time in The Netherlands. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **17**: 99–107.
- Tärnvik, A. and Chu, M.C. (2007) New Approaches to Diagnosis and Therapy of Tularemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1105**: 378–404.
- Taylor, K.R., Takano, A., Konnai, S., Shimozuru, M., Kawabata, H., and Tsubota, T. (2012) *Borrelia miyamotoi* Infections among Wild Rodents Show Age and Month Independence and Correlation with *Ixodes persulcatus* Larval Attachment in Hokkaido, Japan. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **13**: 92–97.
- Telford, S.R. (2009) Status of the “East side hypothesis” (transovarial interference) twenty five years later. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1166**: 144.
- Telford, S.R. and Wormser, G.P. (2010) *Bartonella* spp. Transmission by Ticks Not Established. *Emerg Infect Dis* **16**: 379–384.
- Thapa, S., Zhang, Y., and Allen, M.S. (2019) Effects of temperature on bacterial microbiome composition in *Ixodes scapularis* ticks. *MicrobiologyOpen* **8**: e00719.
- Tijssse-Klasen, E., Sprong, H., and Pandak, N. (2013) Co-infection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* species in ticks and in an erythema migrans patient. *Parasites & Vectors* **6**: 347.
- Tinsley, M.C. and Majerus, M.E.N. (2006) A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology* **132**: 757–765.
- Tomassone, L., Portillo, A., Nováková, M., de Sousa, R., and Oteo, J.A. (2018) Neglected aspects of tick-borne rickettsioses. *Parasites & Vectors* **11**: 263.
- Trout Fryxell, R.T. and DeBruyn, J.M. (2016) The Microbiome of Ehrlichia-Infected and Uninfected Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *PLOS ONE* **11**: e0146651.
- Van Treuren, W., Ponnusamy, L., Brinkerhoff, R.J., Gonzalez, A., Parobek, C.M., Juliano, J.J., et al. (2015) Variation in the Microbiota of *Ixodes* Ticks with Regard to Geography, Species, and Sex. *Appl Environ Microbiol* **81**: 6200–6209.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., et al. (2014) Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol* **4**:
- Vayssier-Taussat, M., Kazimirova, M., Hubalek, Z., Hornok, S., Farkas, R., Cosson, J.-F., et al. (2015) Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the ‘one pathogen–one disease’ vision to the pathobiome paradigm. *Future Microbiology* **10**: 2033–2043.
- Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Féménia, F., Raymond, P., Croce, O., La Scola, B., et al. (2016) Identification of Novel Zoonotic Activity of *Bartonella* spp., France. *Emerg Infect Dis* **22**: 457–462.

- Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., et al. (2013) Next Generation Sequencing Uncovers Unexpected Bacterial Pathogens in Ticks in Western Europe. *PLOS ONE* **8**: e81439.
- des Vignes, F., Piesman, J., Heffernan, R., Schulze, T.L., Stafford III, K.C., and Fish, D. (2001) Effect of Tick Removal on Transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* Nymphs. *J Infect Dis* **183**: 773–778.
- Voordouw, M.J. (2015) Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* **142**: 290–302.
- Výrosteková, V. (1994) [Transstadial transmission of *Francisella tularensis* by *Ixodes ricinus* ticks infected during the nymphal stage]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* **43**: 166–170.
- Waladde, S.M. and Rice, M.J. (1982) CHAPTER 3 - The Sensory Basis of Tick Feeding Behaviour. In *Physiology of Ticks*. Obenchain, F.D. and Galun, R. (eds). Pergamon, pp. 71–118.
- Wass, L., Grankvist, A., Bell-Sakyi, L., Bergström, M., Ulfhammer, E., Lingblom, C., and Wennerås, C. (2019) Cultivation of the causative agent of human neoehrlichiosis from clinical isolates identifies vascular endothelium as a target of infection. *Emerging Microbes & Infections* **8**: 413–425.
- Welc-Falęciak, R., Siński, E., Kowalec, M., Zajkowska, J., and Pancewicz, S.A. (2014) Asymptomatic “Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*” Infections in Immunocompetent Humans. *Journal of Clinical Microbiology* **52**: 3072–3074.
- Welc-Falęciak, R., Werszko, J., Cydzik, K., Bajer, A., Michalik, J., and Behnke, J.M. (2013) Co-Infection and Genetic Diversity of Tick-Borne Pathogens in Roe Deer from Poland. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **13**: 277–288.
- Weygoldt, P. (1998) REVIEW Evolution and systematics of the Chelicerata. *Exp Appl Acarol* **22**: 63–79.
- Whitman, T.J., Richards, A.L., Paddock, C.D., Tamminga, C.L., Sniezek, P.J., Jiang, J., et al. (2007) *Rickettsia parkeri* Infection after Tick Bite, Virginia. *Emerg Infect Dis* **13**: 334–336.
- Wielinga, P.R., Fonville, M., Sprong, H., Gaasenbeek, C., Borgsteede, F., and Giessen, J.W.B. van der (2008) Persistent Detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in The Netherlands During a 5-Year Surveillance: 2003–2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **9**: 119–122.
- Wielinga, P.R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., Boer, A. de, Vries, A. de, Dimmers, W., et al. (2006) Longitudinal Analysis of Tick Densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* Infections of *Ixodes ricinus* Ticks in Different Habitat Areas in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7594–7601.
- Williams-Newkirk, A.J., Rowe, L.A., Mixson-Hayden, T.R., and Dasch, G.A. (2014) Characterization of the Bacterial Communities of Life Stages of Free Living Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *PLoS ONE* **9**: e102130.
- Wittwer, M., Altpeter, E., Pilo, P., Gygli, S.M., Beuret, C., Foucault, F., et al. (2018) Population Genomics of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* and its Implication on the Eco-Epidemiology of Tularemia in Switzerland. *Front Cell Infect Microbiol* **8**.
- Woldehiwet, Z. (2006) *Anaplasma phagocytophilum* in Ruminants in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1078**: 446–460.
- Xie, J., Butler, S., Sanchez, G., and Mateos, M. (2014) Male killing *Spiroplasma* protects *Drosophila melanogaster* against two parasitoid wasps. *Heredity* **112**: 399–408.

- Yabsley, M.J. and Shock, B.C. (2013) Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **2**: 18–31.
- Zhong, J., Jasinskas, A., and Barbour, A.G. (2007) Antibiotic Treatment of the Tick Vector *Amblyomma americanum* Reduced Reproductive Fitness. *PLOS ONE* **2**: e405.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., and Gray, J.S. (2003) Babesia divergens, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clin Microbiol Rev* **16**: 622–636.
- Zolnik, C.P., Prill, R.J., Falco, R.C., Daniels, T.J., and Kolokotronis, S.-O. (2016) Microbiome changes through ontogeny of a tick pathogen vector. *Molecular Ecology* **25**: 4963–4977.
- Zug, R. and Hammerstein, P. (2012) Still a Host of Hosts for Wolbachia: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. *PLOS ONE* **7**: e38544.

ANNEXES

Les agents pathogènes transmis par la tique *Ixodes ricinus* : quoi de neuf ?

M. VAYSSIER-TAUSSAT¹, E. LEJAL², T. POLLET²

RÉSUMÉ

En Europe, les tiques sont les premiers vecteurs d'agents pathogènes pour l'Homme et l'animal. De fait, elles représentent un enjeu important en termes de santé publique et vétérinaire. D'autant plus que les maladies à tiques connaissent actuellement une recrudescence, pouvant être due à plusieurs facteurs (gestion des espaces agricoles et forestiers, changements globaux, meilleures connaissances dans le domaine médical, augmentation des pratiques à risques, etc.). *Ixodes ricinus* est l'espèce de tiques la plus répandue en Europe occidentale et capable de transmettre la plus grande diversité d'agents pathogènes, aussi bien des bactéries que des virus ou des parasites. Elle constitue donc un problème de santé publique et vétérinaire important. Ainsi, les nouvelles connaissances quant à sa distribution, aux agents pathogènes qu'elle véhicule ou au risque de piqûre à un endroit donné, sont autant d'informations cruciales pour améliorer les systèmes de lutte contre les maladies à tiques qui passent en premier lieu par la prévention du risque lié à la piqûre de tique.

MOTS-CLÉS : *Ixodes ricinus*, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Neohhrlichia*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Babesia*, Tick-borne encephalitis virus (TBEV).

I. - INTRODUCTION

De nombreux arthropodes hématophages sont susceptibles de véhiculer des bactéries, des virus ou des parasites qui sont transmissibles à des vertébrés et peuvent être à l'origine de maladies, exclusivement humaines ou non. Mis à part les insectes, notamment les moustiques qui occupent une place prépondérante dans cette propagation, les acariens, et plus particulièrement les tiques, sont également impliqués. Parmi les trois familles de tiques recensées à ce jour, celles des Ixodidae (ou tiques dures) revêt une position particulièrement importante en termes de santé humaine et vétérinaire. Cette famille compte près de 700 espèces réparties dans une dizaine de genres, dont le genre *Ixodes*, qui présente une vaste répartition géographique, susceptible d'évolution spatio-temporelle en fonction des changements climatiques et environnementaux. *Ixodes ricinus* est l'espèce de

Ixodes la plus répandue en Europe occidentale où elle est largement distribuée, l'objectif de cette revue est d'inventorier les agents infectieux qu'elle peut transmettre à la lumière des connaissances récentes.

II. - DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DE *IXODES RICINUS*

La localisation de *I. ricinus* est principalement déterminée par son aptitude à survivre dans un environnement donné. Sensible à la dessiccation, *I. ricinus* réside avant tout dans les zones où les précipita-

¹ INRAE, Département Santé Animale, Nouzilly, France.

² UMR BIPAR, Laboratoire de santé animale, INRA, ANSES, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France.

tions sont d'intensité modérée à élevée, et elle est majoritairement trouvée dans des biotopes offrant une végétation abondante permettant de maintenir l'humidité nécessaire à sa survie, mais aussi d'abriter et de nourrir ses hôtes (1-3). Ainsi, les principaux facteurs impactant sa distribution sont des facteurs climatiques (température, précipitation, couvert neigeux...), anthropogéniques (gestion de l'utilisation des terres ainsi que de la faune et de la flore), écologiques et géographiques (structure et connectivité des habitats, orientation des montagnes, dispersion des hôtes) (3).

La répartition de *I. ricinus* connaît actuellement une expansion à la fois vers le nord de l'Europe, mais aussi en altitude dans les zones montagneuses (4-6). Parmi l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer sa propagation, le changement climatique a notamment été incriminé. En effet, dans ces contrées, l'augmentation globale des températures saisonnières et annuelles, associée à d'importantes précipitations, permettent d'accroître la période d'activité de *I. ricinus* et la période de végétation, créant ainsi un environnement favorable à son développement et à celui de ses hôtes, dans des espaces qui n'étaient autrefois pas ou peu colonisables (3, 7).

III. - CYCLE DE VIE ET COMPORTEMENT DE *I. RICINUS*

Le cycle de vie de *I. ricinus* est divisé en deux phases : 1) la phase libre, pendant laquelle ont lieu les étapes de ponte, d'incubation des œufs et de métamorphose ; 2) la phase parasitaire, au cours de laquelle la tique effectue son repas sanguin sur l'hôte. *I. ricinus* est une tique exophile, c'est-à-dire évoluant dans l'environnement extérieur au cours de la phase libre, par opposition aux tiques endophiles qui se développent au sein d'environnements abrités, à proximité de leurs hôtes comme les nids et les terriers. *I. ricinus* passe la majorité de sa vie en phase libre à la recherche d'un hôte. Étant particulièrement sensible à la dessiccation, elle évolue idéalement dans un environnement humide (> 80 % d'humidité relative) dont les températures sont comprises entre 5 et 25° C. Il est toutefois important de noter que ces seuils de températures d'activité peuvent varier en fonction des sous-populations de *I. ricinus* séparées géographiquement (8). De même, selon les régions, elle va présenter une activité saisonnière qui peut être bimodale (deux pics d'activité généralement au printemps et en automne) ou unimodale (un pic d'activité au printemps). Les adultes et les nymphes sont principalement actifs au printemps et à l'automne, tandis que les larves sont essentiellement retrouvées au début de l'été. L'activité de *I. ricinus* est influencée par différents facteurs abiotiques tels que la température, l'humidité, l'ensoleillement ou encore la photopériode qui jouent un rôle clé dans sa survie. De ce

fait, elle est très peu active en été et en hiver. Durant la saison hivernale, elle peut notamment entrer en diapause, réduisant ainsi son métabolisme à un niveau minimal (9).

Le cycle de vie de *I. ricinus*, représenté sur la figure 1, est triphasique, impliquant trois hôtes différents entre chaque stade. Pour trouver ses hôtes, la tique va se positionner au sommet de la végétation, et tendre sa première paire de pattes sur lesquelles se trouve l'organe de Haller lui permettant de capter le passage d'un hôte et ainsi de s'agripper à lui. Ce mode de chasse, dit « à l'affût », représente un risque accru de déshydratation pour la tique qui doit effectuer des voyages fréquents entre la surface de la végétation et le sol pour se réhydrater. Au cours de leur vie, les tiques sont de moins en moins sensibles à la dessiccation. En effet, les adultes présentent des capacités de stockage de l'eau plus importantes du fait de leur plus grande taille ainsi que de leur plus faible ratio surface/volume. De plus, leurs réserves énergétiques augmentent en même temps que leur taille, ce qui semble contribuer à leur survie (10). Ainsi, elles se positionnent de plus en plus haut sur la végétation pour chasser, ce qui a une influence sur le spectre d'hôte accessible en fonction des stades (11). En effet, *I. ricinus* est télotrope, c'est-à-dire qu'elle est apte à infester un large spectre d'hôtes (plus de 300 espèces différentes, dont l'Homme). Elle aura toutefois un hôte préférentiel en fonction de son stade de développement. En effet, les larves se nourrissent principalement sur des petits mammifères, des oiseaux et des lézards (leur repas sanguin dure 2 à 3 jours) et les nymphes, sur des mammifères plus gros (leur repas dure 5 à 6 jours). Une fois leur repas terminé, les larves et les nymphes se décrochent de l'hôte et retournent librement dans l'environnement où elles pourront se métamorphoser. Chez les femelles, le gorgement dure 8 à 10 jours et a lieu principalement sur des grands mammifères (ongulés). Ce dernier repas sanguin s'effectue après ou en même temps que l'accouplement avec les mâles qui ne sont pas hématophages. Cette étape de gorgement est divisée en deux phases, une lente, au cours de laquelle la tique grossit peu, et une rapide pendant laquelle elle peut atteindre jusqu'à 100 fois son poids initial dans le cas des tiques dites dures (12). Chez les femelles, l'initiation de cette phase rapide, et donc *in fine* la complétion du repas sanguin, n'est permise que si la fécondation a eu lieu. Une fois gorgées à réplétion et fécondées, les femelles se laissent tomber dans l'environnement où elles peuvent pondre 2 000 à 3 000 œufs (= oviposition), après quoi elles meurent. Les larves issues de l'éclosion des œufs recommencent alors un nouveau cycle (13). La complétion de ce cycle de vie dure 2 à 3 ans dans la nature. Le taux de survie moyen, du début à la fin de ce cycle, est de 0,1 % : à partir de 2 000 œufs, survivraient 100 larves puis 10 nymphes et enfin un mâle et une femelle (14).

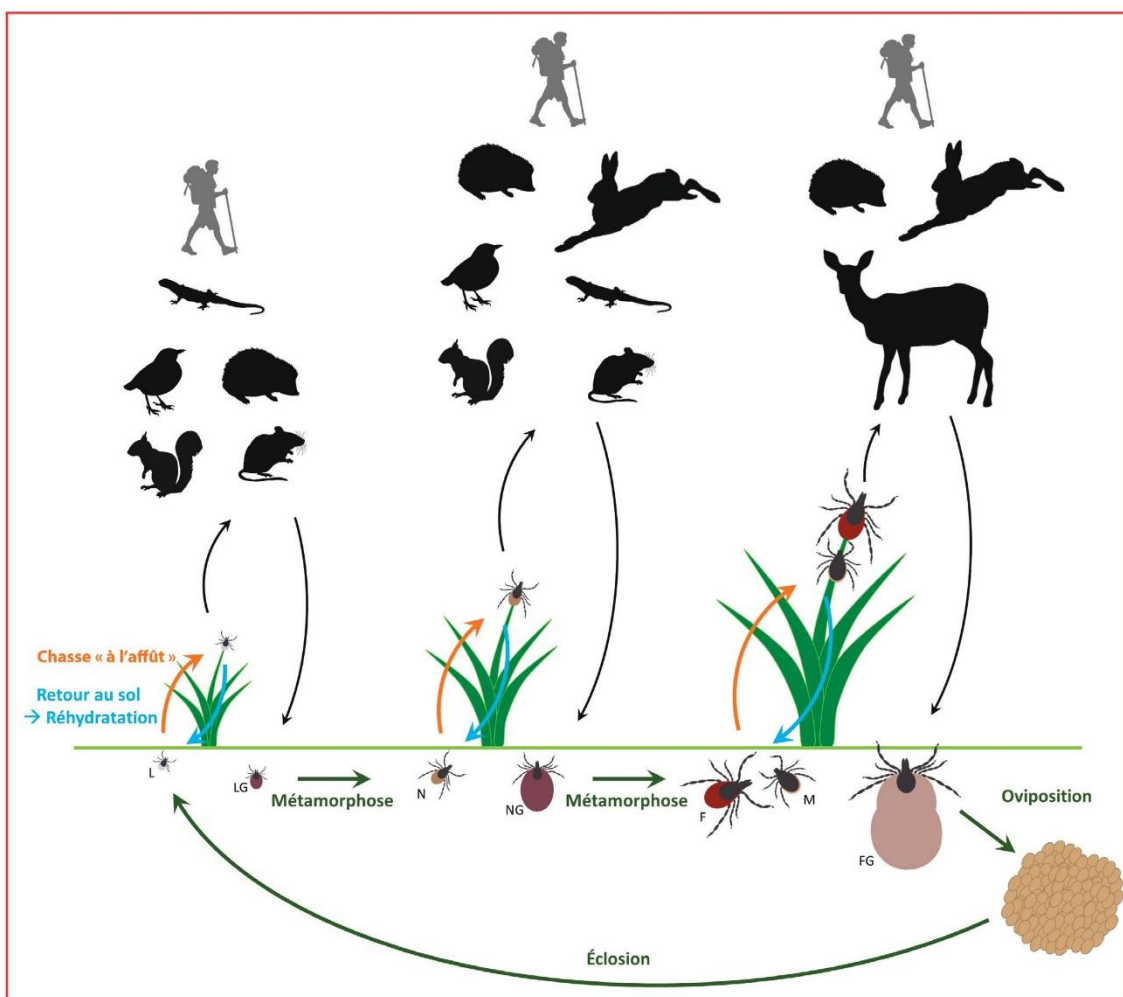


Fig. 1 - Cycle de vie de la tique *I. ricinus*.

L : larve ; LG : larve gorgée ; N : nymphe ; NG : nymphe gorgée ; F : femelle ; M : mâle ; FG : femelle gorgée.

IV. - IMPORTANCE EN SANTÉ HUMAINE ET ANIMALE

Les tiques sont des parasites qui peuvent impacter la santé de leur hôte, directement ou indirectement. Parmi les effets directs de la piqûre de tique, on compte : la spoliation sanguine (principalement observée avec les tiques tropicales prenant un repas sanguin supérieur à 2 mL), qui peut conduire à l'anémie, voire à la mort de l'animal en cas d'infestation par un grand nombre de tiques (15) ; les blessures cutanées (dilacération de la peau, insertion des pièces buccales et création du micro-hématome) auxquelles pourront potentiellement s'ajouter des surinfections cutanées ; des paralysies dues à la présence d'une toxine dans la salive de tique, principalement observées chez les animaux et rarement chez l'Homme, dont la propagation dans l'ensemble du

corps peut conduire au décès par arrêt respiratoire (16) ; enfin, des réactions allergiques susceptibles d'induire un choc anaphylactique (17, 18) ainsi que des allergies croisées à la viande rouge et à certains anticorps utilisés en médecine humaine, et qui sont consécutives à la reconnaissance d'un sucre présent dans le tube digestif de la tique (19, 20).

Les effets indirects des tiques sur la santé humaine ou animale sont ceux qui découlent de leur transmission d'agents pathogènes. En effet, du fait de leur mode de vie hématophages, les tiques peuvent ingérer, lors des repas sanguins, des agents pathogènes circulant chez leurs hôtes ou transmis directement par une tique partageant la même poche de sang (phénomène de co-repas) (21, 22). De plus, certains agents pathogènes peuvent également être acquis verticalement, par transmission de la femelle infectée

aux larves. Lors de leur repas sanguin, les tiques infectées sont susceptibles de transmettre ces agents pathogènes à leur nouvel hôte. L'injection concomitante des agents pathogènes et des substances immunosuppressives contenues dans la salive facilite leur transmission de la tique à l'hôte ainsi que leur dissémination dans l'hôte vertébré. Ainsi, les tiques assurent un rôle de vecteurs actifs en permettant la circulation et la retransmission de nombreux agents pathogènes (23). En santé humaine, ces arthropodes sont, à l'échelle mondiale, les deuxièmes vecteurs d'agents pathogènes après les moustiques (24, 25).

En ce qui concerne *I. ricinus*, il semble que cette espèce soit impliquée dans des cas d'allergies (20, 26), mais elle a surtout un impact indirect sur la santé humaine et vétérinaire. En effet, son large spectre d'hôtes lui offre la possibilité d'entrer en contact avec une grande variété d'agents pathogènes (bactéries, parasites et virus) lors de son repas sanguin. Sa large répartition géographique, sa forte densité et sa grande affinité pour l'homme font de *I. ricinus* le vecteur d'agents pathogènes le plus important en Europe (7).

V. - AGENTS PATHOGÈNES VECTORISÉS PAR *I. RICINUS*

A) Les agents responsables de la maladie de Lyme : *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.)

Le complexe *Borrelia burgdorferi* s.l. est constitué d'une vingtaine d'espèces, parmi lesquelles les agents de la maladie de Lyme. Cette boréliose cause un syndrome inflammatoire multi-systémique consécutif à la réponse immunitaire de l'hôte à l'encontre des bactéries transmises lors de la piqûre par les tiques du genre *Ixodes*, dont *I. ricinus*. Cliniquement, on peut observer trois formes successives : 1) la forme localisée survenant dans les 3 à 30 jours suivant la piqûre, qui est caractérisée par une inflammation cutanée, ronde à ovale, dont la taille grossit progressivement (= érythème migrant) ; 2) la forme disséminée précoce se manifestant dans les 6 mois après la piqûre et qui se traduit par des symptômes généraux (myalgies, fatigue, fièvre...) ou par d'autres signes cliniques (rhumatologiques, neurologiques, dermatologiques, etc.) ; 3) la forme disséminée tardive, apparaissant plus de 6 mois après la piqûre, pouvant se manifester sous différentes formes (acrodermatite chronique atrophante, atteintes neurologiques tardives...) (27).

En Europe, cinq espèces du complexe *B. burgdorferi* s.l. sont actuellement reconnues comme responsables de cette maladie : *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia spielmannii*, *Borrelia bavariensis*. Les deux espèces fréquemment incriminées sont *B. garinii* et *B. afzelii* (28, 29). Bien que ces espèces soient toutes susceptibles de provoquer un érythème migrant, elles sont souvent

associées à des manifestations cliniques particulières. Ainsi, *B. burgdorferi sensu stricto* est principalement associée à des atteintes articulaires ou neurologiques ; *B. garinii* à des cas de neuroborréliose et *B. afzelii* à des manifestations cutanées tardives (29, 30). Par ailleurs, trois autres espèces, *Borrelia bissettii*, *Borrelia lusitaniae* et *Borrelia valaisiana*, ont été occasionnellement détectées chez des patients, mais leur pathogénicité n'est pas avérée (31-34).

Ces *Borrelia* peuvent circuler chez de nombreux hôtes vertébrés (rongeurs, lagomorphes, insectivores, oiseaux, reptiles...) communément présents dans nos régions et qui constituent des réservoirs pour ces bactéries. Chaque espèce de *Borrelia* présente cependant une certaine spécificité d'hôte qui semble être notamment médiée par la réponse immunitaire innée de ce dernier, mise en place via la voie du complément (35). Par ailleurs, il existe également des hôtes totalement incompétents, comme les cervidés (36), qui jouent néanmoins un rôle dans l'écologie de cette maladie puisqu'ils permettent le renouvellement de la population de tiques en nourrissant les femelles adultes. De plus, ils pourraient également assurer la circulation des *Borrelia* d'une tique à l'autre en cas de phénomènes de co-repas, mais cette hypothèse est controversée (37).

Au cours de la piqûre, les *Borrelia* peuvent être transmises de la tique infectée à l'hôte par l'intermédiaire de la salive. En effet, chez la tique infectée, il est établi que les *Borrelia* sont initialement fixées aux cellules intestinales par l'intermédiaire d'une protéine de surface. La stimulation par le repas sanguin engendre un changement de son expression qui permet la libération des *Borrelia* et leur migration vers les glandes salivaires (38, 39), ce qui conduirait ainsi à un délai entre le début de la piqûre et la transmission des *Borrelia* à l'hôte. En effet, il est communément admis que le risque de transmission est faible pendant les premières 24 heures et augmente avec le temps au fur et à mesure que le gorgement progresse (40), ce délai variant en fonction de l'espèce concernée. Cependant, des études récentes sur des souris ont mis en évidence la présence de plusieurs espèces de groupe *B. burgdorferi* s.l. dans les glandes salivaires de femelles adultes non gorgées, ainsi que leur transmission en moins de 12 heures après la fixation des tiques sur des souris (41, 42).

D'après une méta-analyse regroupant plusieurs études européennes réalisées de 2010 à 2016, la prévalence de ces bactéries chez *I. ricinus* « à l'affût » est d'environ 12 % (43). Bien que leur transmission verticale chez cette tique ait été suspectée du fait de leur détection chez des larves par plusieurs études (44), cette éventualité est aujourd'hui remise en question car les spirochètes décelés à l'époque pourraient ne pas appartenir au complexe *B. burgdorferi* s.l. mais à une espèce de *Borrelia* alors inconnue : *Borrelia miyamotoi* (45).

1) *Borrelia miyamotoi*

Borrelia miyamotoi appartient au groupe de *Borrelia* responsable de fièvres récurrentes (*relapsing fever*). Ce groupe bactérien est à l'origine de manifestations cliniques souvent peu spécifiques : une fièvre élevée, des frissons, des courbatures, des céphalées et de l'asthénie. En absence de traitement, des récurrences peuvent être observées jusqu'à 10 ou 15 fois (27). Les *Borrelia* de ce groupe sont majoritairement transmises par des tiques molles, mais certaines espèces peuvent l'être par le pou de corps (*Pediculus humanus*) ou encore par des tiques dures, comme c'est le cas de *B. miyamotoi*. Cette espèce est présente en Asie, en Europe et en Amérique du Nord (46-49). En Europe, sa prévalence chez la tique *I. ricinus* oscillerait de 0 à 3 % (50-52). Isolée pour la première fois chez *Ixodes persulcatus* en 1995 (46), il faudra attendre une quinzaine d'années avant qu'elle ne soit considérée comme pathogène lors de sa détection chez plusieurs patients russes (53). Depuis, elle a été associée à plusieurs cas pathologiques humains, en Europe, en Asie et aux États-Unis (54-58).

Plusieurs études menées aux États-Unis, en Europe et au Japon ont permis de mettre en évidence la présence de *B. miyamotoi* chez différentes espèces de rongeurs qui pourraient lui servir de réservoirs (59-61). En effet, la compétence de deux espèces, *Myodes glareolus* (le campagnol roussâtre) et *Apodemus flavicollis* (le mulot à collier), dans la transmission de *B. miyamotoi* à des tiques non infectées a été démontrée expérimentalement (62). Par ailleurs, des tiques infectées ont également été isolées sur des oiseaux circulant aux États-Unis et en Europe (63, 64).

L'étude de cette bactérie chez *Ixodes scapularis*, la cousine américaine de *Ixodes ricinus*, a permis de mettre en évidence son transfert de la tique infectée à l'hôte en moins de 24 heures de gorgement (65) ; ce délai pourrait toutefois être encore plus court, cette même étude ayant détecté la bactérie dans les glandes salivaires de tiques non gorgées. Pour d'autres spirochètes du groupe des fièvres récurrentes circulant chez les tiques molles, telle que *Borrelia turicatae*, un délai de transmission de l'ordre de quelques secondes a même été rapporté (66). Il semble que *B. miyamotoi* puisse être également transmise de façon verticale à la descendance de la tique *I. scapularis* (47). Chez *I. ricinus*, un tel mécanisme n'a pas été mis en évidence ; cependant, il est potentiel comme précédemment évoqué (45).

2) *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum est une bactérie intracellulaire, ayant un tropisme pour les polynucléaires neutrophiles, qui peut être véhiculée par plusieurs tiques du genre *Ixodes*, dont *I. ricinus* (67). Elle est res-

ponsable de l'anaplasmose granulocytaire chez l'Homme et plusieurs espèces d'animaux domestiques tels que les chiens, les chats, les chevaux et les ruminants (68-72). Chez l'Homme, bien que cette infection puisse, dans de rares cas, être mortelle, elle génère communément des symptômes modérés, variables et non spécifiques comme de la fièvre, des frissons, des céphalées, des myalgies et des malaises (69). Les cas humains de cette maladie ont été déclarés en Europe, en Asie ainsi qu'en Amérique du Nord où ils sont plus fréquents et souvent plus graves (67). À l'inverse, les cas d'anaplasmose chez les ruminants n'ont été décrits qu'en Europe où la maladie serait responsable de fortes pertes économiques. En effet, l'infection déclenche chez ces animaux une diminution de la production de lait et des avortements (68, 73) ; par ailleurs, elle induit également une baisse des défenses du système immunitaire, ouvrant ainsi la voie aux infections secondaires communément observées en cas d'infection par *A. phagocytophilum* (68).

Le cycle de cette bactérie est complexe et encore mal compris. Ainsi, cette espèce est subdivisée en plusieurs écotypes qui semblent être engagés dans différents cycles épidémiologiques pouvant impliquer différents hôtes et vecteurs (67, 73). En Europe, *A. phagocytophilum* a été décelée chez une grande variété d'hôtes, notamment chez les ruminants sauvages et plus particulièrement chez le chevreuil et le cerf élaphe très fréquemment porteurs de cette bactérie (73). Cependant, selon plusieurs études, ces animaux ne constituent pas les réservoirs des variants impliqués dans les cas d'anaplasmose chez l'Homme (74-78). Les variants humains semblent plutôt circuler chez le hérisson et le sanglier (76, 79), mais leur système immunitaire éliminerait rapidement l'infection (79, 80). Ainsi les hôtes réservoirs permettant la circulation des variants humains en Europe ne sont pas encore clairement identifiés.

En ce qui concerne son mécanisme d'acquisition/transmission, lors du repas sur l'hôte infecté, *A. phagocytophilum* infecte en premier lieu les cellules du tube digestif des tiques. Chez la tique *I. scapularis*, il semble qu'elle puisse coloniser les glandes salivaires dans les 24 heures, grâce notamment à la protéine Salp16 (81). De là, elle peut être retransmise à un hôte sensible lors du prochain repas sanguin. Chez *I. scapularis*, la transmission de la tique infectée à l'hôte sensible peut se dérouler en moins de 24 heures (82). Par ailleurs, la transmission de cette bactérie par transfusion sanguine pourrait être également possible (83).

3) *Neoehrlichia mikurensis*

Neoehrlichia mikurensis est une bactérie strictement intracellulaire, appartenant à la famille des Anaplasmataceae. Considérée comme *Candidatus* depuis la

description de cette espèce et sa dénomination en 2004 (84), elle a récemment été cultivée pour la première fois (85).

Bien que découverte chez *I. ricinus* en 1999 (86), ce n'est qu'en 2010 que cette espèce a été associée à une infection chez un patient allemand immunodéprimé (87). Depuis, plusieurs cas de neoehrlichiose ont été rapportés à la fois en Europe et en Asie (88, 89). Principalement impliquée chez des malades immunodéficients en Europe, elle peut être aussi responsable de manifestations cliniques chez des patients immunocompétents (87, 88). D'un point de vue clinique, *N. mikurensis* cause un syndrome inflammatoire systémique chez les sujets infectés. Ceux qui sont immunodéprimés présentent une hyperthermie, des frissons et sueurs nocturnes, des douleurs musculaires ou articulaires localisées, ainsi que des thromboembolies (90). Les patients immunocompétents sont fébriles, se plaignent de maux de tête, d'un malaise général, et beaucoup manifestent des nausées, vomissements, myalgies et une raideur de la nuque (88). Par ailleurs, il semble que cette bactérie soit également responsable de néoehrlichiose chez le chien, mais cette pathologie a été peu décrite jusqu'ici (91, 92).

N. mikurensis a été fréquemment détectée chez plusieurs espèces de tiques appartenant au genre *Ixodes*, et plus particulièrement chez des individus de l'espèce *I. ricinus* échantillonnés dans l'environnement d'une vingtaine de pays européens (89, 93). Elle est également trouvée chez certains rongeurs tel que *Myodes glareolus*, mais aussi chez plusieurs espèces d'*Apodemus* ou de *Microtus*, qui constituent ses réservoirs dans l'environnement (62).

Bien que le mode de transmission de cette bactérie semble se faire *via* la piqûre de tique, tous les patients infectés n'en avaient pas forcément constaté. Ainsi l'éventualité d'une transmission par d'autres voies, y compris la transfusion sanguine, déjà observée avec d'autres *Anaplasmataceae* (83, 94), ne doit pas être négligée.

4) *Rickettsia helvetica* et *Rickettsia monacensis*

Les rickettsies sont des bactéries intracellulaires obligatoires et, en Europe, la plupart des rickettsioses sont propagées par les tiques. Les espèces *Rickettsia helvetica* et *Rickettsia monacensis* ont été fréquemment détectées dans plusieurs pays d'Europe chez *I. ricinus* (95). Des cas cliniques associant la présence de *R. monacensis* et des symptômes similaires à ceux de la fièvre boutonneuse ont été rapportés en Espagne, en Italie et en Croatie (95). Cette bactérie a également été récemment isolée en France, pour la première fois, chez des tiques *I. ricinus* « à l'affût » (96). Quant à *R. helvetica*, cette espèce est connue depuis de très

nombreuses années pour circuler chez les tiques *I. ricinus* (97). Elle a été incriminée dans plusieurs cas humains de rickettsiose en France, mais aussi en Suisse, en Italie et en Suède, les tableaux cliniques associés à l'infection étant variables : syndrome pseudogrippal accompagné ou non d'éruption cutanée, méningite ou même atteinte cardiaque (95).

L'ADN de ces bactéries a été mis en évidence chez plusieurs vertébrés (98) : celui de *R. helvetica* a déjà été rapporté chez le chevreuil, le sanglier, le hérisson, le chien, plusieurs espèces de passereaux, de lézards ainsi que de rongeurs, et celui de *R. monacensis* chez une espèce de lézard et chez le chien. Cependant, la persistance de l'infection et la transmission de ces rickettsies par la tique ont rarement été testées dans ces études, ne permettant pas l'identification de réservoirs vertébrés pour ces bactéries. En revanche, la transmission verticale de *R. helvetica* chez la tique *I. ricinus* (99) ainsi que la stabilité de la prévalence de cette rickettsie chez les tiques au cours des années et des taux d'infections similaires entre les larves, les nymphes et les adultes (100), sont des arguments identifiant cet arthropode comme son hôte réservoir.

5) *Bartonella henselae*

Les bactéries du genre *Bartonella* sont des bactéries intracellulaires facultatives circulant chez de nombreux mammifères et qui peuvent générer des maladies chez l'Homme et l'animal de compagnie. L'implication d'arthropodes hématophages dans leur transmission est reconnue pour quelques espèces, notamment pour *Bartonella henselae*, agent responsable chez l'Homme de la maladie des griffes du chat. Cette bactérie circule chez le chat, son hôte réservoir, qui est communément asymptomatique et dont la contamination s'effectue *via* les fèces de la puce *Ctenocephalides felis* (101). Chez l'Homme, la transmission de l'agent pathogène est réalisée plutôt par morsure ou griffure de chat infesté, et provoque communément l'apparition d'une papule érythémateuse accompagnée d'une lymphadénopathie. Des atteintes oculaires, hépatiques, spléniques et neurologiques peuvent également se manifester (102).

La détection de cet agent chez des tiques « à l'affût » et les soupçons de son implication dans plusieurs cas cliniques de patients exposés à des tiques ont conduit la communauté scientifique à s'interroger sur le rôle de ces arthropodes en tant que potentiels vecteurs de cette bactérie (103, 104). La compétence vectorielle de la tique *I. ricinus* pour l'agent *B. henselae* a été démontré *in vitro* (via un système de gorgement artificiel) mais pas *in vivo* (105). Néanmoins, sa compétence pour *B. birtlesii* (agent circulant chez les rongeurs) a été démontrée *in vivo* (106). Par ailleurs, plusieurs cas de bartonellose à

B. henselae chez des patients rapportant une piqûre de tique ont été mentionnés dans la littérature (107-109), bien que d'autres sources d'infections soient possibles. Ainsi, l'implication des tiques en tant que vecteurs de *Bartonella* n'est pas encore complètement établie, bien qu'elle soit fortement probable.

6) *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii est une bactérie intracellulaire, capable de produire des pseudospores qui lui confèrent une résistance assurant sa survie dans l'environnement où elle est largement répandue. Elle est d'ailleurs fréquemment retrouvée dans le sol (110) et sa présence a été détectée chez une grande variété d'espèces animales et plus particulièrement chez les ruminants qui l'excrètent en grande quantité lors de la mise bas (111).

Chez l'Homme, l'infection par cette bactérie est asymptomatique dans la plupart des cas (60 %). Néanmoins, elle peut être responsable de fièvre Q aiguë, dont les manifestations cliniques sont généralement modérées, mais certains patients infectés peuvent présenter une pneumonie atypique ou une hépatite granulomateuse. Les malades présentant une valvulopathie ou porteurs d'une prothèse vasculaire, les femmes enceintes ainsi que les personnes immunodéprimées représentent une population à risque d'infection chronique, dont la forme la plus fréquente est l'endocardite (111).

La contamination est réalisée principalement par l'inhalation d'aérosols ou de poussières infectées, mais plusieurs autres voies d'entrée de l'agent pathogène chez l'Homme sont possibles (112). Les piqûres de tiques, dont la compétence pour *C. burnetii* a été démontrée chez plusieurs espèces en laboratoire, sont notamment suspectées (113). De plus, *C. burnetii*, qui génère une infection systémique chez les tiques, a également été détectée dans leurs fèces. Ainsi, outre la piqûre, la contamination pourrait se faire *via* l'inhalation des excréments de tiques (113). L'importance des tiques dans l'épidémiologie de cette maladie reste cependant très controversée (113).

7) *Francisella tularensis*

Francisella tularensis est une bactérie intracellulaire facultative, responsable de la tularémie. Elle est principalement rencontrée dans l'hémisphère Nord et circule chez de nombreux mammifères terrestres et aquatique (principalement lagomorphes et rongeurs) (114). Deux sous-espèces, *tularensis* et *holarctica*, sont responsables de la plupart des cas humains respectivement sur les continents américain et eurasiatique. Le taux de létalité associé à la tularémie est de

5 % pour la sous-espèce *tularensis* et de 0,5 % pour *holarctica*. Très répandue dans l'environnement, *F. tularensis* peut être transmise à l'Homme par contact direct avec un animal infecté, ingestion d'aliment ou d'eau contaminé(e), inhalation d'aérosols infectieux ou encore par piqûre d'arthropode (115). Elle a d'ailleurs été détectée chez *I. ricinus* (116-118) et une étude slovaque a permis de montrer sa transmission trans-stadiale chez cette tique (119). En France, environ 20 % des cas semblent être consécutifs à une piqûre de tique (<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-transmissibles-de-l-animal-a-l-homme/tularémie/documents/rapport-synthese-bilan-de-10-années-de-surveillance-de-la-tularémie-chez-l-homme-en-france>), mais en Suisse, ce pourcentage s'élève à 33 % (120).

Chez l'Homme, la tularémie se traduit initialement par l'apparition d'une fièvre élevée, accompagnée de frissons, fatigue, myalgies et céphalées. Elle évolue ensuite en différentes formes qui dépendent en général du mode de contamination. Les plus fréquentes sont les formes ulcéro-ganglionnaire et ganglionnaire, mais on observe aussi des formes oculoganglionnaire, oropharyngée, pulmonaire et typhoïdienne (121). En cas d'infection par piqûre de tique, la forme ulcéro-ganglionnaire, caractérisée par l'apparition d'un ulcère au niveau du site de piqûre, est la plus répandue (122).

8) *Babesia divergens*, *Babesia venatorum* et *Babesia microti*

Outre des bactéries, *I. ricinus* peut également transmettre, à l'Homme ainsi qu'aux animaux domestiques, des parasites du genre *Babesia* infectant les érythrocytes de leurs hôtes. Chez l'Homme, selon l'espèce de parasite impliquée et le statut immunitaire de la personne infectée, la babésiose peut être asymptomatique ou être responsable d'une maladie plus ou moins grave selon les cas et qui peut être létale. Provoquant des symptômes similaires à ceux de la malaria (frissons, fièvre, myalgies, anémie, fatigue, sueurs nocturnes), elle est parfois confondue avec cette dernière et donc sous-diagnostiquée. Principalement inoculées par les tiques du genre *Ixodes*, ces hématozoaires peuvent également être transmis par transfusion sanguine (123).

Chez les tiques, après ingestion des érythrocytes infectés, ces parasites établissent rapidement une infection systémique et infectent notamment les glandes salivaires et les ovaires des femelles. Les *Babesia* sont transmises verticalement et, par la suite, d'un stade à l'autre. L'initiation du repas sanguin est nécessaire pour permettre, dans les glandes salivaires, la différenciation des parasites en sporozoïtes qui seront transmis à l'hôte (124).

En Europe, *Babesia divergens* est la cause principale de babésiose humaine. Les cas observés sont généralement sévères, surtout chez les individus ayant subi une splénectomie (123). Vectorisée par la tique *I. ricinus*, chez qui elle peut être transmise verticalement (transmission transovarienne) (125), ce parasite est également responsable de babésioses chez les bovins. Chez ces animaux, l'infection peut entraîner une fièvre modérée ainsi qu'une anorexie évoluant souvent vers le rétablissement spontané de l'animal. Selon les individus, elle peut aussi avoir des conséquences plus sévères, engendrant fièvre élevée, anémie, anorexie, arrêt de la rumination, augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire pouvant conduire à la mort de l'animal (126).

I. ricinus est également capable de vectoriser l'espèce *Babesia venatorum*, qu'elle peut acquérir par transmission verticale, ou bien en se nourrissant sur le chevreuil qui semble constituer son hôte réservoir (127, 128). En Europe, cinq cas humains de babésiose dus à ce parasite ont été rapportés dans la littérature : tous étaient survenus chez des individus immunodéfectifs, mais sans caractère de gravité (123, 129).

L'espèce *Babesia microti* (principale cause de babésiose aux États-Unis) a été détectée dans plusieurs pays d'Europe chez des tiques *I. ricinus* « à l'affût » (130-137). Les capacités d'acquisition et de transmission de cet agent pathogène par *I. ricinus* ont été observées chez des rongeurs (hôtes réservoirs de cette espèce) en laboratoire (138). En Europe, l'implication de *B. microti* n'a été clairement établie que dans un seul cas de babésiose survenu en Allemagne chez un patient immunodéprimé ayant semble-t-il contracté l'infection lors d'une transfusion sanguine (139). L'implication de *B. microti* a été également fortement suspectée dans deux autres cas cliniques chez des individus immunocompétents, dont un mentionnait une piqûre de tique (140, 141), mais la présence du parasite dans les érythrocytes des patients n'a pas pu être identifiée.

B) Le virus de l'encéphalite à tiques et le louping ill

Le virus de l'encéphalite à tiques (*Tick-borne encephalitis virus* TBEV) est un *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Il circule principalement chez les petits mammifères comme les rongeurs et insectivores qui constituent des hôtes compétents permettant sa transmission aux tiques, ses principaux vecteurs. Il existe trois sous-types de TBEV : les variants sibérien et extrême-oriental retrouvés chez *I. persulcatus*, ainsi que le variant européen qui circule communément chez *I. ricinus*. Entre 2012 et 2016, 12 500 cas d'encéphalite à tiques ont été déclarés au centre européen de prévention des maladies (ECDC) par 25 pays, dont la majorité en République Tchèque, Lituanie, Allemagne, Suède et Pologne (142).

Chez l'Homme, la maladie est généralement divisée en deux phases. La première, qui correspond à la phase de virémie, se manifeste par un état pseudo-grippal. Après quelques jours d'amélioration, une seconde phase peut apparaître : l'atteinte du système nerveux central entraînant une méningoencéphalite qui peut être fatale. Selon les variants, le taux de létalité varie : 1 % pour le variant européen, 7 à 8 % pour le variant sibérien et 20 à 40 % pour le variant extrême-oriental (143). TBEV peut également se développer chez les animaux d'élevage tels que les chèvres, moutons et vaches, généralement asymptomatiques, qui l'excrètent dans le lait (144). Ainsi la consommation de produits laitiers non pasteurisés peut également constituer une voie de contamination par ce virus (145-147).

Le virus du *Louping ill* peut également être responsable de cas d'encéphalites. *Flavivirus* très proche du variant TBEV européen, il circule principalement en Grande-Bretagne et peut également être transmis par la tique *I. ricinus* ou bien *via* des produits laitiers contaminés (143).

VI. - CO-INFECTIONS

I. ricinus peut transmettre à l'Homme et aux animaux un grand nombre d'agents infectieux. Son cycle de vie, plus particulièrement : 1) ses multiples repas sanguins ; 2) sur une grande diversité d'hôtes, potentiellement porteurs de différents agents pathogènes (148-150) ; 3) souvent à proximité d'autres tiques, favorisant ainsi l'échange d'agents pathogènes par co-repas ainsi que ; 4) la transmission verticale de certains microorganismes de la femelle aux larves sont autant de caractéristiques qui contribuent à la survenue de co-infections chez ces tiques. En effet, la présence de co-infections chez *I. ricinus* a déjà été rapportée de nombreuses fois dans la littérature (51, 52, 61, 151-156). Le criblage d'un grand nombre d'agents pathogènes par Moutailler *et al.* (51) a d'ailleurs permis de mettre au jour la présence de co-infections chez environ 20 % des tiques *I. ricinus* adultes échantillonnées dans les Ardennes, impliquant jusqu'à cinq agents pathogènes distincts. Ce taux peut varier selon les études, en fonction notamment de la localisation, de la saison voire de l'année d'étude, du stade de tique étudié (les adultes étant plus co-infectés que les nymphes ou les larves), de l'état de gorgement des tiques, etc. L'utilisation de cette même technique sur près de mille nymphes *I. ricinus* échantillonnées mensuellement pendant trois années consécutives au sud-est de l'Île-de-France, a permis de mettre en évidence un taux de co-infection de 1,3 %, pouvant impliquer jusqu'à trois agents pathogènes distincts (157). Une association fréquemment observée chez celles-ci unit *B. garinii* et *B. valaisiana* (64, 155, 158, 159) qui partagent le même hôte réservoir (160).

L'existence de ces co-infections chez les tiques implique ainsi leur potentielle co-transmission lors de la piqûre. En effet, des cas de co-infections chez l'Homme, pouvant également être dus à de multiples événements de piqûre, ont été rapportés plusieurs fois dans la littérature (161-165). En Europe, plusieurs cas de co-infections à *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp. et *Babesia* spp. ont été observés chez des patients qui présentaient une encéphalite à tique (163). Aux Pays-Bas, une étude a permis de montrer, chez une cohorte d'environ 300 patients présentant un érythème migrant, une probabilité de co-infection à un autre agent pathogène circulant chez les tiques (*A. phagocytophilum*, *N. mikurenensis*, *B. divergens* ou *B. miyamotoi*) de 2,7 % (165). Une étude américaine a révélé que, parmi 310 patients nord-américains soupçonnés d'être infectés par un agent transmis par les tiques et pour lesquels le diagnostic de la maladie de Lyme, d'anaplasmose granulocytaire ou de babésiose était positif, 79 (soit près d'un quart) étaient co-infectés, dont 4 avec les trois bactéries responsables des maladies susdites (166). Les co-infections, et plus particulièrement celle concernant *B. burgdorferi*s.l. couplée à *Babesia* ou à *Anaplasma*, peuvent avoir un impact sur la durée et la sévérité de la maladie (161, 164).

En France, le diagnostic des maladies à tiques se limite presque uniquement à celui de la maladie de Lyme. Le développement d'outils diagnostiques, plus adaptés et permettant de détecter l'éventail d'agents pathogènes décrits précédemment, devrait être une priorité de santé publique d'autant plus que chez les individus co-infectés, la maladie peut être plus grave ou plus longue, voire se manifester par des symptômes inhabituels. Par exemple, dans l'étude de Krause *et al.* (161), les patients ayant une maladie de Lyme et une autre infection présentaient plus de symptômes de type pseudo-grippal que ceux atteints de la maladie de Lyme seule. Enfin, les co-infections peuvent affecter l'efficacité des traitements des maladies à tiques : à titre d'exemple, l'antibiothérapie prescrite pour la maladie de Lyme est inefficace contre les maladies parasitaires ou virales. Dans ce contexte, prendre en compte des maladies à tique en considérant la co-infection peut aider à améliorer le diagnostic et l'efficacité des traitements administrés.

VII. - CONCLUSION : OBSERVER, SURVEILLER ET PRÉVENIR TOUS ENSEMBLE

Pour combattre les maladies transmises par les tiques, il est primordial de bien connaître la biologie de ces arthropodes, les agents pathogènes qu'ils véhiculent et les conséquences de leur transmission sur la santé humaine et animale. Ces connaissances nécessitent des expertises multidisciplinaires et les maladies à tiques représentent un exemple typique de pathologies nécessitant une approche *One Health* (<http://www.onehealthinitiative.com>) pour mieux les appréhender et les combattre.

Par ailleurs, une information du public et des professionnels de santé des risques sanitaires liés aux tiques s'avère également essentielle dans ce combat. À ce titre, le projet « Citique » fait appel aux citoyens, jardiniers, randonneurs, promeneurs, forestiers, agriculteurs, vétérinaires, médecins... pour participer à l'effort de recherche dans la lutte contre les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent. Ce programme de recherche participative vise à massifier les informations disponibles sur la répartition géographique des piqûres de tiques et des agents pathogènes transportés en fonction des milieux, de la météorologie et des saisons. Ces renseignements précieux doivent permettre de disposer de données de plus en plus précises, « remontées du terrain », que les chercheurs ne pourraient pas acquérir seuls ; de mieux évaluer les risques (et les modéliser) selon le degré d'exposition aux diverses espèces de tiques et aux différents pathogènes et de mieux prévenir les risques auxquels les citoyens et les animaux domestiques ou d'élevage sont soumis. Il est très facile de prendre part à ces travaux, en téléchargeant gratuitement l'application smartphone *Signalement TIQUE*, lancée en 2017 en partenariat avec le ministère chargé de la santé, ou bien en se rendant sur le site internet www.citique.fr. Pour toute personne ou animal piqué, on peut y enregistrer la date, le lieu et les conditions de la piqûre. Il est aussi possible d'envoyer la tique piqueuse aux chercheurs et ainsi contribuer à alimenter la première « tiquothèque » publique nationale. Par ailleurs, l'application permet aux utilisateurs de recevoir une information sur les bons réflexes en cas de piqûre et de disposer d'un dispositif de suivi dans le temps. Cela permet d'améliorer la prévention collective des populations humaines et animales contre les tiques.

Quelques résultats notables (Figure 2) :

- Un tiers des piqûres signalées sont survenues dans des jardins privés, ce qui indique que le risque n'est pas uniquement lié aux promenades en forêt et que des moyens sont à mobiliser pour proposer des recommandations d'aménagement des jardins ou des parcs périurbains.
- La répartition géographique des tiques infectées est très inégale et les gestionnaires du risque doivent donc concentrer leurs efforts là où l'exposition des êtres humains et des animaux domestiques est la plus forte afin de mieux protéger les populations.
- Une dizaine d'agents pathogènes pour l'Homme et les animaux a été détectée dans les tiques piqueuses envoyées par les participants. Un cinquième des tiques analysées était infecté par un agent pathogène et, parmi elles, 5 % l'étaient par plusieurs agents pathogènes.

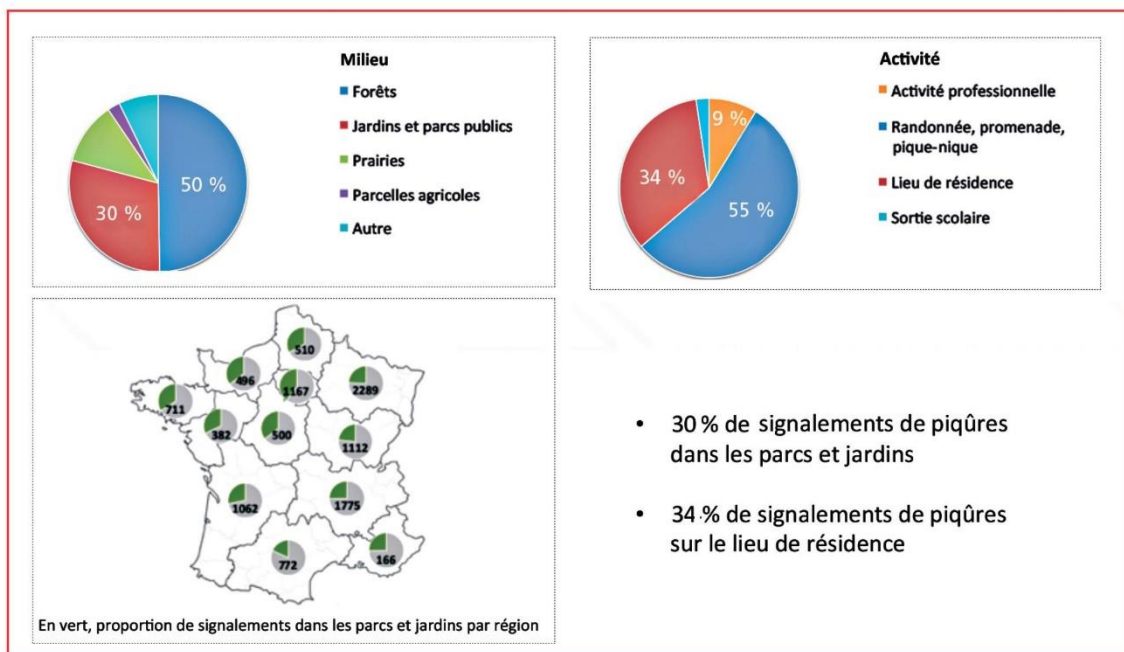


Fig. 2 - Signalement des piqûres de tiques en juillet 2017 et 2018 sur l'application *Signalement TIQUE*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Jaenson TG, Lindgren E. The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks Tick Borne Dis* 2011 ; 2 : 44-9.
- (2) Agoulon A, Malandrin L, Lepigeon F, Vénisse M, Bonnet S, Becker CA, et al. A Vegetation Index qualifying pasture edges is related to *Ixodes ricinus* density and to *Babesia divergens* seroprevalence in dairy cattle herds. *Vet Parasitol* 2012 ; 185 : 101-9.
- (3) Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George JC, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors* 2013 ; 6 : 1.
- (4) Materna J, Daniel M, Danielová V. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonoše Mts. (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* 2005 ; 13 : 24-8.
- (5) Materna J, Daniel M, Metelka L, Harčarik J. The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonoše Mts., Czech Republic). *Int J Med Microbiol* 2008 ; 298 : 25-37.
- (6) Jaenson TG, Jaenson DG, Eisen L, Petersson E, Lindgren E. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors* 2012 ; 5 : 8.
- (7) Léger E, Voure'h G, Vial L, Chevillon C, McCoy KD. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Exp Appl Acarol* 2013 ; 59 : 219-44.
- (8) Gilbert L, Aungier J, Tomkins JL. Climate of origin affects tick (*Ixodes ricinus*) host-seeking behavior in response to temperature: implications for resilience to climate change? *Ecol Evol* 2014 ; 4 : 1186-98.
- (9) Gray JS, Kahl O, Lane RS, Levin ML, Tsao JL. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick Borne Dis* 2016 ; 7 : 992-1003.
- (10) Herrmann C, Gern L. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *J Med Entomol* 2010 ; 47 : 1196-204.
- (11) Mejlom HA, Jaenson TG. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 1997 ; 21 : 747-54.
- (12) Sonenshine DE, Roc RM. Biology of Ticks. *Oxford University Press*, Oxford ; 2014 : 557 p.
- (13) McCoy KD, Boulanger N. Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive, épidémiologie. *IRD Editions*, Bondy ; 2016 : 346 p.
- (14) Randolph SE. Ticks are not insects: consequences of contrasting vector biology for transmission potential. *Parasitol Today* 1998 ; 14 : 186-92.
- (15) Gauthier-Clerc M, Clerquin Y, Handrich Y. Hyperinfestation by ticks *Ixodes uriae*: a possible cause of death in adult king penguins, a long-lived seabird. *Colon Waterbirds* 1998 ; 21 : 229-33.
- (16) Edlow JA, McGillicuddy DC. Tick paralysis. *Infect Dis Clin North Am* 2008 ; 22 : 397-413.
- (17) Hilger C, Bessot JC, Hutt N, Grigioni F, de Blay F, Pauli G, et al. IgE-mediated anaphylaxis caused by bites of the pigeon tick *Argas reflexus*: cloning and expression of the major allergen Arg r 1. *J Allergy Clin Immunol* 2005 ; 115 : 617-22.
- (18) Kleine-Tebbe J, Heinatz A, Gräser I, Dautel H, Hansen GN, Kespohl S, et al. Bites of the European pigeon tick (*Argas reflexus*): risk of IgE-mediated sensitizations and anaphylactic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2006 ; 117 : 190-5.
- (19) Commins SP, Platts-Mills TA. Tick bites and red meat allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013 ; 13 : 354-9.

- (20) Hamsten C, Starkhammar M, Tran TA, Johansson M, Bengtsson U, Ahlén G, et al. Identification of galactose- α -1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick *Ixodes ricinus*; possible relationship with red meat allergy. *Allergy* 2013 ; **68** : 549-52.
- (21) Randolph SE. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis* 2011 ; **2** : 179-82.
- (22) States SL, Huang CI, Davis S, Tufts DM, Diuk-Wasser MA. Co-feeding transmission facilitates strain coexistence in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Epidemics* 2017 ; **19** : 33-42.
- (23) Randolph SE. Tick-borne disease systems emerge from the shadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology* 2009 ; **136** : 1403-13.
- (24) de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* 2008 ; **13** : 6938-46.
- (25) Piesman J, Eisen L. Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol* 2008 ; **53** : 323-43.
- (26) Hamsten C, Tran TA, Starkhammar M, Brauner A, Commins SP, Platts-Mills TA, et al. Red meat allergy in Sweden: association with tick sensitization and B-negative blood groups. *J Allergy Clin Immunol* 2013 ; **132** : 1431-4.
- (27) Haute Autorité de Santé. Borréliose de Lyme et autres maladies vectorielles à tiques ; recommandation de bonne pratique, 2018. https://www.has-sante.fr/jcms/c_2857558/fr/borreliose-de-lyme-et-autres-maladies-vectorielles-a-tiques
- (28) Ruzić-Sabljic E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Jurca T, Logar M, Pikelj-Pecnik A, et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 2002 ; **11** : 544-50.
- (29) Strle F, Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 2009 ; **37** : 51-110.
- (30) Rizzoli A, Hauffe HC, Carpi G, Vourc'h GI, Neteler M, Rosà R. Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 2011 ; **16** : pii: 19906.
- (31) Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, et al. First isolation of *Borrelia lusitanae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 2004 ; **42** : 1316-8.
- (32) Diza E, Papa A, Vezyri E, Tsounis S, Milonas I, Antoniadis A. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis* 2004 ; **10** : 1692-3.
- (33) da Franca I, Santos L, Mesquita T, Collares-Pereira M, Baptista S, Vieira L, et al. Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitanae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wien Klin Wochenschr* 2005 ; **117** : 429-32.
- (34) Rudenko N, Golovchenko M, Mokráček A, Piskunová N, Růžek D, Mallatová N, et al. Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2008 ; **46** : 3540-3.
- (35) Kurtenbach K, Sewell HS, Ogden NH, Randolph SE, Nuttall PA. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun* 1998 ; **66** : 1248-51.
- (36) Jaenson TG, Tälleklint L. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. *J Med Entomol* 1992 ; **29** : 813-7.
- (37) Voordouw MJ. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* 2015 ; **142** : 290-302.
- (38) Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 2000 ; **38** : 382-8.
- (39) Piesman J, Schneider BS. Dynamic changes in Lyme disease spirochetes during transmission by nymphal ticks. *Exp Appl Acarol* 2002 ; **28** : 141-5.
- (40) Meiners T, Hammer B, Göbel UB, Kahl O. Determining the tick scutal index allows assessment of tick feeding duration and estimation of infection risk with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a person bitten by an *Ixodes ricinus* nymph. *Int J Med Microbiol* 2006 ; **296** : 103-7.
- (41) Sertour N, Cotté V, Garnier M, Malandrin L, Ferquel E, Choumet V. Infection kinetics and tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mouse after natural (via ticks) or artificial (needle) infection depends on the bacterial strain. *Front Microbiol* 2018 ; **9** : 1722.
- (42) Lejal E, Moutailler S, Šimo L, Vayssier-Taussat M, Pollet T. Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors* 2019 ; **12** : 152.
- (43) Strnad M, Hönig V, Růžek D, Grubhofer L, Rego RO. Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol* 2017 ; **83** : e00609-17.
- (44) Hubálek Z, Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res* 1998 ; **84** : 167-72.
- (45) Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis* 2013 ; **4** : 46-51.
- (46) Fukunaga M, Takahashi Y, Tsuruta Y, Matsushita O, Ralph D, McClelland M, et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 1995 ; **45** : 804-10.
- (47) Scoles GA, Papero M, Beati L, Fish D. A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001 ; **1** : 21-34.
- (48) Richter D, Schlee DB, Matuschka FR. Relapsing fever-like spirochete infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis* 2003 ; **9** : 697-701.
- (49) Fomenko NV, Livanova NN, Borgoiakov VI, Kozlova IV, Shulaykina IV, Pukhovskaya NM, et al. Detection of *Borrelia miyamotoi* in ticks *Ixodes persulcatus* from Russia. *Parazitologiya* 2010 ; **44** : 201-11.
- (50) Krause PJ, Fish D, Narasimhan S, Barbour AG. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin Microbiol Infect* 2015 ; **21** : 631-9.
- (51) Moutailler S, Valiente Moro C, Vaumourin E, Michelet L, Tran FH, Devillers E, et al. Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLoS Negl Trop Dis* 2016 ; **10** : e0004539.
- (52) Raileanu C, Moutailler S, Pavel I, Porea D, Mihalca AD, Savuta G, et al. *Borrelia* diversity and co-infection with other tick-borne pathogens in ticks. *Front Cell Infect Microbiol* 2017 ; **7** : 36.
- (53) Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis* 2011 ; **17** : 1816-23.
- (54) Hovius JW, Li X, Ramamoorthi N, van Dam AP, Barthold SW, van der Poll T, et al. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia garinii* alters the course of murine Lyme borreliosis. *FEBS Immunol Med Microbiol* 2007 ; **49** : 224-34.
- (55) Chowdri HR, Gugliotta JL, Berardi VP, Goethert HK, Molloy PJ, Sterling SL, et al. *Borrelia miyamotoi* infection presenting as human granulocytic anaplasmosis: a case report. *Ann Intern Med* 2013 ; **159** : 21-7.
- (56) Gugliotta JL, Goethert HK, Berardi VP, Telford SR. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N Engl J Med* 2013 ; **368** : 240-5.
- (57) Krause PJ, Narasimhan S, Wormser GP, Rollend L, Fikrig E, Lepore T, et al. Human *Borrelia miyamotoi* infection in the United States. *N Engl J Med* 2013 ; **368** : 291-3.
- (58) Sato K, Takano A, Konnai S, Nakao M, Ito T, Koyama K, et al. Human Infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan. *Emerg Infect Dis* 2014 ; **20** : 1391-3.

- (59) Barbour AG, Bunikis J, Travinsky B, Hoen AG, Diuk-Wasser MA, Fish D, *et al.* Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **81** : 1120-31.
- (60) Taylor KR, Takano A, Konnai S, Shimozuru M, Kawabata H, Tsubota T. *Borrelia miyamotoi* infections among wild rodents show age and month independence and correlation with *Ixodes persulcatus* larval attachment in Hokkaido, Japan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; **13** : 92-7.
- (61) Cosson JF, Michelet L, Chotte J, Le Naour E, Cote M, Devillers E, *et al.* Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit Vectors* 2014; **7** : 233.
- (62) Burri C, Schumann O, Schumann C, Gern L. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neohelminthospora mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis* 2014; **5** : 245-51.
- (63) Hamer SA, Hickling GJ, Keith R, Sidje JL, Walker ED, Tsao JI. Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia andersonii* in Michigan, U.S.A. *Parasit Vectors* 2012; **5** : 231.
- (64) Lommano E, Dvořák C, Vallotton L, Jenni L, Gern L. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks Tick Borne Dis* 2014; **5** : 871-82.
- (65) Breuner NE, Dolan MC, Replogle AJ, Sexton C, Hojgaard A, Boegler KA, *et al.* Transmission of *Borrelia miyamotoi* sensu lato relapsing fever group spirochetes in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* nymphs. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; **8** : 677-81.
- (66) Boyle WK, Wilder HK, Lawrence AM, Lopez JE. Transmission dynamics of *Borrelia turicatae* from the arthropod vector. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8** : e2767.
- (67) Dugat T, Lagréc AC, Maillard R, Boulouis HJ, Haddad N. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; **5** : 61.
- (68) Woldehiwet Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1078** : 446-60.
- (69) Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2008; **22** : 433-48.
- (70) Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; **40** : 1121-40.
- (71) Dziegiel B, Adaszek Ł, Kalinowski M, Winiarczyk S. Equine granulocytic anaplasmosis. *Res Vet Sci* 2013; **95** : 316-20.
- (72) Lagréc AC, Rouxel C, Kevin M, Dugat T, Girault G, Durand B, *et al.* Co-circulation of different *A. phagocytophilum* variants within cattle herds and possible reservoir role for cattle. *Parasit Vectors* 2018; **11** : 163.
- (73) Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; **3** : 31.
- (74) Chastagner A, Dugat T, Vourec'h G, Verheyden H, Legrand L, Bachy V, *et al.* Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Vet Res* 2014; **45** : 114.
- (75) Dugat T, Chastagner A, Lagréc AC, Petit E, Durand B, Thierry S, *et al.* A new multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. *Parasit Vectors* 2014; **7** : 439.
- (76) Huhn C, Winter C, Wolfsperger T, Wüppenhorn N, Smrdel KS, Skuballa J, *et al.* Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *PLoS One* 2014; **9** : e93725.
- (77) Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, van Leeuwen AD, Hengeveld P, Heylen D, *et al.* Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors* 2014; **7** : 365.
- (78) Jouglin M, Perez G, Butet A, Malandrin L, Bastian S. Low prevalence of zoonotic *Babesia* in small mammals and *Ixodes ricinus* in Brittany, France. *Vet Parasitol* 2017; **238** : 58-60.
- (79) Silaghi C, Skuballa J, Thiel C, Pfister K, Petney T, Pfäffle M, *et al.* The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) - A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis* 2012; **3** : 49-54.
- (80) Galindo RC, Ayllón N, Smrdel KS, Boadella M, Beltrán-Beck B, Mazariegos M, *et al.* Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasit Vectors* 2012; **5** : 181.
- (81) Sukumaran B, Narasimhan S, Anderson JF, DePonte K, Marcantonio N, Krishnan MN, *et al.* An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *J Exp Med* 2006; **203** : 1507-17.
- (82) des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford 3rd KC, Fish D. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001; **183** : 773-8.
- (83) Jereb M, Pecaver B, Tomazic J, Muzlovic I, Avsic-Zupanc T, Premru-Srsen T, *et al.* Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. *Emerg Infect Dis* 2012; **18** : 1354-7.
- (84) Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, Takahashi M, Misumi H, Suto C, *et al.* Ultrastructure and phylogenetic analysis of "Candidatus Neohelminthospora mikurensis" in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; **54** : 1837-43.
- (85) Wass L, Grankvist A, Bell-Sakyi L, Bergström M, Ulfhammer E, Lingblom C, *et al.* Cultivation of the causative agent of human neohelminthosis from clinical isolates identifies vascular endothelium as a target of infection. *Emerg Microbes Infect* 2019; **8** : 413-25.
- (86) Schouls LM, van de Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clinical Microbiol* 1999; **37** : 2215-22.
- (87) Loewenich FD von, Geißdörfer W, Disqué C, Matten J, Schett G, Sakka SG, *et al.* Detection of "Candidatus Neohelminthospora mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol* 2010; **48** : 2630-5.
- (88) Li H, Jiang JF, Liu W, Zheng YC, Huo QB, Tang K, *et al.* Human infection with *Candidatus Neohelminthospora mikurensis*, China. *Emerg Infect Dis* 2012; **18** : 1636-9.
- (89) Silaghi C, Beck R, Oteo JA, Pfeffer M, Sprong H. Neohelminthosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neohelminthospora mikurensis*. *Exp Appl Acarol* 2016; **68** : 279-97.
- (90) Grankvist A, Andersson PO, Mattsson M, Sender M, Vaht K, Höper L, *et al.* Infections with the tick-borne bacterium "Candidatus Neohelminthospora mikurensis" mimic noninfectious conditions in patients with B cell malignancies or autoimmune diseases. *Clin Infect Dis* 2014; **58** : 1716-22.
- (91) Dimiz PP, Schulz BS, Hartmann K, Breitschwerdt EB. "Candidatus Neohelminthospora mikurensis" infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol* 2011; **49** : 2059-62.
- (92) Hofmann-Lehmann R, Wagmann N, Meli ML, Riond B, Novacco M, Joekel D, *et al.* Detection of "Candidatus Neohelminthospora mikurensis" and other Anaplasmataceae and Rickettsiaceae in canidae in Switzerland and Mediterranean countries. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2016; **158** : 691-700.
- (93) Obiegala A, Silaghi C. *Candidatus Neohelminthospora Mikurensis* - recent insights and future perspectives on clinical cases, vectors, and reservoirs in Europe. *Curr Clin Microbiol Rep* 2018; **5** : 1-9.
- (94) Regan J, Matthias J, Green-Murphy A, Stanek D, Bertholf M, Pritt BS, *et al.* A confirmed *Ehrlichia ewingii* infection likely acquired through platelet transfusion. *Clin Infect Dis* 2013; **56** : e105-7.
- (95) Oteo JA, Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; **3** : 271-8.

- (96) Akl T, Bourgoïn G, Souq ML, Appolinaire J, Poirel MT, Gibert P, et al. Detection of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* in the French Pyrénées and first identification of *Rickettsia monacensis* in France. *Parasite* 2019 ; **26** : 20.
- (97) Parola P, Beati L, Cambon M, Raoult D. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998 ; **17** : 95-100.
- (98) Tomassone L, Portillo A, Nováková M, de Sousa R, Oteo JA. Neglected aspects of tick-borne rickettsioses. *Parasit Vectors* 2018 ; **11** : 263.
- (99) Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop* 1979 ; **36** : 357-67.
- (100) Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, et al. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors* 2009 ; **2** : 41.
- (101) Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 1996 ; **34** : 1952-6.
- (102) Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997 ; **10** : 203-19.
- (103) Angelakis E, Billeter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D. Potential for tick-borne bartonellosis. *Emerg Infect Dis* 2010 ; **16** : 385-91.
- (104) Telford 3rd SR, Wormser GP. *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. *Emerg Infect Dis* 2010 ; **16** : 379-84.
- (105) Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, et al. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* 2008 ; **14** : 1074-80.
- (106) Reis C, Cote M, Rhun DL, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011 ; **5** : e1186.
- (107) Angelakis E, Pulcini C, Waton J, Imbert P, Socolovschi C, Edouard S, et al. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after tick bite. *Clin Infect Dis* 2010 ; **50** : 549-51.
- (108) Maggi RG, Ericson M, Mascarelli PE, Bradley JM, Breitschwerdt EB. *Bartonella henselae* bacteremia in a mother and son potentially associated with tick exposure. *Parasit Vectors* 2013 ; **6** : 101.
- (109) Vayssier-Taussat M, Moutailler S, Féménia F, Raymond P, Croce O, La Scola B, et al. Identification of novel zoonotic activity of *Bartonella* spp., France. *Emerg Infect Dis* 2016 ; **22** : 457-62.
- (110) Kersh GJ, Wolfe TM, Fitzpatrick KA, Candee AJ, Oliver LD, Patterson NE, et al. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Appl Environ Microbiol* 2010 ; **76** : 4469-75.
- (111) Roest HI, Bossers A, van Zijderveld FG, Rebel JM. Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *Vet Q* 2013 ; **33** : 148-60.
- (112) Angelakis E, Raoult D. Q fever. *Vet Microbiol* 2010 ; **140** : 297-309.
- (113) Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The importance of ticks in Q fever transmission: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Parasitol* 2015 ; **31** : 536-52.
- (114) Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 2002 ; **15** : 631-46.
- (115) Maurin M, Gyurancz M. Tularemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect Dis* 2016 ; **16** : 113-24.
- (116) Franke J, Fritzsche J, Tomaso H, Straube E, Dorm W, Hildebrandt A. Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Appl Environ Microbiol* 2010 ; **76** : 6829-36.
- (117) Gyurancz M, Rigó K, Dán Á, Földvári G, Makrai L, Dénes B, et al. Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010 ; **11** : 1031-5.
- (118) Gehringer H, Schacht E, Maylaender N, Zeman E, Kaysser P, Oehme R, et al. Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis holarctica* in *Ixodes ricinus* ticks from south-western Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 2013 ; **4** : 93-100.
- (119) Výrosteková V. Transstadial transmission of *Francisella tularensis* by *Ixodes ricinus* ticks infected during the nymphal stage. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 1994 ; **43** : 166-70.
- (120) Wittwer M, Altpeter E, Pilo P, Gygli SM, Beuret C, Foucault F, et al. Population genomics of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* and its implication on the eco-epidemiology of tularemia in Switzerland. *Front Cell Infect Microbiol* 2018 ; **8** : 89.
- (121) Tärnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci* 2007 ; **1105** : 378-404.
- (122) Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res* 2009 ; **40** : 7.
- (123) Yabsley MJ, Shock BC. Natural history of zoonotic *Babesia*: role of wildlife reservoirs. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2013 ; **2** : 18-31.
- (124) Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* 2009 ; **40** : 37.
- (125) Bonnet S, Jouglin M, Malandrin L, Becker C, Agoulon A, L'Hostis M, et al. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology* 2007 ; **134** : 197-207.
- (126) Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* 2003 ; **16** : 622-36.
- (127) Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* 2007 ; **13** : 1208-10.
- (128) Bonnet S, Brisseau N, Hermouet A, Jouglin M, Chauvin A. Experimental *in vitro* transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. *Vet Res* 2009 ; **40** : 21.
- (129) Bläckberg J, Lazarevic VL, Hunfeld KP, Persson KE. Low-virulent *Babesia venatorum* infection masquerading as hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol* 2018 ; **97** : 731-3.
- (130) Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A. Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med* 2002 ; **9** : 25-8.
- (131) Wielinga PR, Fonville M, Sprong H, Gaasenbeek C, Borgsteede F, van der Giessen JW. Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008 ; **9** : 119-22.
- (132) Lempereur L, De Cat A, Caron Y, Madder M, Claerebout E, Saegerman C, et al. First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011 ; **11** : 125-30.
- (133) Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Müller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol* 2010 ; **76** : 2923-31.
- (134) Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, Velhin S, Hübschen JM, Ignatyev G, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS One* 2013 ; **8** : e54476.
- (135) Sytykiewicz H, Karbowski G, Hapunik J, Szepechiński A, Supergan-Marwicz M, Golawska S, et al. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. *Ann Agric Environ Med* 2012 ; **19** : 45-9.

- (136) Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, Maassen C, van der Giessen J, Takken W, *et al.* Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2013 ; **3** : 36.
- (137) Blaňarová L, Stanko M, Miklisová D, Víchová B, Mošanský L, Kraljik J, *et al.* Presence of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Babesia microti* in rodents and two tick species (*Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps*) in Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis* 2016 ; **7** : 319-26.
- (138) Gray J, von Stedingk LV, Gürtelschmid M, Granström M. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J Clin Microbiol* 2002 ; **40** : 1259-63.
- (139) Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, *et al.* First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 ; **26** : 595-601.
- (140) Meer-Scherrer L, Adelson M, Mordechaj E, Lottaz B, Tilton R. *Babesia microti* infection in Europe. *Curr Microbiol* 2004 ; **48** : 435-7.
- (141) Arsuaga M, Gonzalez LM, Lobo CA, de la Calle F, Bautista JM, Azcárate IG, *et al.* First report of *Babesia microti*-caused babesiosis in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016 **25** ; **16** : 677-9.
- (142) Beauté J, Spiteri G, Warns-Petit E, Zeller H. Tick-borne encephalitis in Europe, 2012 to 2016. *Euro Surveill* 2018 ; **23** : pii=1800201.
- (143) Hubálek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 2012 ; **111** : 9-36.
- (144) Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Sroka J, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 2010 ; **17** : 283-6.
- (145) Balogh Z, Ferenczi E, Szeles K, Stefanoff P, Gut W, Szomor KN, *et al.* Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *J Virol Methods* 2010 ; **163** : 481-5.
- (146) Caini S, Szomor K, Ferenczi E, Gáspár ÁS, Csohán Á, Krisztaovics K, *et al.* Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Euro Surveill* 2012 ; **17** : pii=20128.
- (147) Hudopisk N, Korva M, Janet E, Simečinger M, Grgič-Vitek M, Gubenšek J, *et al.* Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. *Emerg Infect Dis* 2013 ; **19** : 806-8.
- (148) Nieto NC, Foley JE. Meta-analysis of coinfection and coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans, domestic animals, wildlife, and *Ixodes ricinus*-complex ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009 ; **9** : 93-102.
- (149) Buffet JP, Marsot M, Vaumourin E, Gasqui P, Masségliá S, Marcheteau E, *et al.* Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012 ; **35** : 583-9.
- (150) Welc-Faleciak R, Werszko J, Cydzik K, Bajcar A, Michalik J, Behnke JM. Coinfection and genetic diversity of tick-borne pathogens in roe deer from Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013 ; **13** : 277-88.
- (151) Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Menach AL, Boulouis HJ, *et al.* Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res* 2005 ; **36** : 79-87.
- (152) Schicht S, Junge S, Schnieder T, Strube C. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the hard tick *Ixodes ricinus* in the city of Hanover (Germany). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011 ; **11** : 1595-7.
- (153) Andersson M, Bartkova S, Lindestad O, Råberg L. Co-infection with "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*" and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in southern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013 ; **13** : 438-42.
- (154) Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, Maassen C, van der Giessen J, Takken W, *et al.* Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2013 ; **3** : 36.
- (155) Herrmann C, Gern L, Voordouw MJ. Species co-occurrence patterns among Lyme borreliosis pathogens in the tick vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* 2013 ; **79** : 7273-80.
- (156) Castro LR, Gabrielli S, Iori A, Cancrini G. Molecular detection of *Rickettsia*, *Borrelia*, and *Babesia* species in *Ixodes ricinus* sampled in northeastern, central, and insular areas of Italy. *Exp Appl Acarol* 2015 ; **66** : 443-52.
- (157) Lejal E, Marsot M, Chalvet-Monfray K, Cosson J-F, Moutailler S, Vayssier-Tausat M, *et al.* A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest. *Parasites & Vectors* 2019 ; **12** (1) : 551.
- (158) Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 2005 ; **71** : 7203-16.
- (159) Gassner F, van Vliet AJ, Burgers SL, Jacobs F, Verbaarschot P, Hovius EK, *et al.* Geographic and temporal variations in population dynamics of *Ixodes ricinus* and associated *Borrelia* infections in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010 ; **11** : 523-32.
- (160) Hanincová K, Taragelová V, Koci J, Schäfer SM, Hails R, Ullmann AJ, *et al.* Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol* 2003 ; **69** : 2825-30.
- (161) Krause PJ, Telford 3rd SR, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, *et al.* Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA* 1996 ; **275** : 1657-60.
- (162) Tijssse-Klasen E, Sprong H, Pandak N. Co-infection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* species in ticks and in an erythema migrans patient. *Parasit Vectors* 2013 ; **6** : 347.
- (163) Moniuszko A, Dunaj J, Świącicka I, Zambrowski G, Chmielewska-Badora J, Żukiewicz-Sobczak W, *et al.* Co-infections with *Borrelia* species, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in patients with tick-borne encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014 ; **33** : 1835-41.
- (164) Diuk-Wasser MA, Vannier E, Krause PJ. Coinfection by *Ixodes* tick-borne pathogens: ecological, epidemiological, and clinical consequences. *Trends Parasitol* 2016 ; **32** : 30-42.
- (165) Jahfari S, Hofhuis A, Fonville M, van der Giessen J, van Pelt W, Sprong H. Molecular detection of tick-borne pathogens in humans with tick bites and erythema migrans, in the Netherlands. *PLoS Negl Trop Dis* 2016 ; **10** : e0005042.
- (166) Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, *et al.* Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2002 ; **34** : 1184-91.

ANNEXE 2 : Actualité web Ma Thèse en 3500 signes (Avril 2019)

Les tiques de la forêt de Sénart passées au crible des chercheurs

La tique *Ixodes ricinus* est le premier vecteur d'agents pathogènes pour l'homme et l'animal en Europe. Les chercheurs des unités BIPAR* et EPIA** se sont intéressés à l'activité de cette tique en forêt de Sénart et aux agents pathogènes qu'elle transporte. Grâce à des collectes régulières et aux techniques de criblage à haut débit et d'analyses statistiques, ils ont pu suivre l'évolution de sa présence et de celle des agents pathogènes qu'elle véhicule sur une période de trois années consécutives.



Prévention contre les tiques en forêt de Sénart. © Agence Phanie

Mots-clés : Santé animale, Santé humaine, Tiques, Agents pathogènes, Forêt péri-urbaine

***Ixodes ricinus* : un vecteur par nature**

Les tiques sont des arthropodes strictement hématophages qui présentent plusieurs stades de développement : larve, nymphe et adulte. Leurs repas sanguins sont indispensables à leur métamorphose et à leur reproduction. L'espèce *Ixodes ricinus* est capable de se nourrir sur une grande variété d'hôtes (plus de 300 espèces). Au cours de son repas sanguin, elle peut s'infecter par des agents pathogènes présents dans le sang ou dans le derme de l'animal sur lequel elle se nourrit. Ces microbes pourront potentiellement être retransmis à un nouvel hôte, dont l'homme ou l'animal domestique, lors d'un prochain repas sanguin.

Une surveillance nécessaire des tiques et de sa cohorte d'agents pathogènes

Plusieurs critères sont indispensables à la survie d'*Ixodes ricinus*. Tout d'abord un environnement doux et humide, c'est-à-dire des températures comprises entre 8 et 24°C associées à une humidité relative supérieure à 80%. Mais aussi la présence d'hôtes animaux sur lesquels elle va pouvoir prendre ses repas sanguins.

Avec ses 3 000 hectares de terrain abritant une large variété d'animaux, la forêt de Sénart constitue un environnement idéal pour *Ixodes ricinus*, et représente donc une zone à risque du fait de sa forte fréquentation humaine (3 millions de visiteurs par an). Les chercheurs des unités BIPAR* et EPIA** se sont ainsi intéressés aux tiques dans cette zone forestière péri-urbaine et aux agents pathogènes qu'elles véhiculent.

En Europe tempérée, *I. ricinus* est principalement active au printemps et à l'automne. De même, la disponibilité de ses hôtes peut également varier en fonction des saisons ou des années et ainsi avoir un impact sur la densité de tiques actives. Qu'en est-il de la présence des tiques en forêt de Sénart ? Et de la prévalence des agents pathogènes qu'elles transportent ? Existe-t-il des variations au cours des saisons ou des années ? C'est à ces questions que les chercheurs ont essayé de répondre.

Une étude de terrain et des outils de détection hypersensibles

Les chercheurs ont réalisé des collectes mensuelles de tiques pendant trois ans en forêt de Sénart (d'Avril 2014 à Mai 2017). Plus de 1 000 tiques ont été collectées. Les agents pathogènes qu'elles véhiculent ont ensuite été analysés par une méthode de criblage haut débit, la PCR en microfluidique. Cette méthode de détection très sensible permet de tester, en une seule fois, une quarantaine de tiques pour la présence de plus de 30 espèces d'agents pathogènes. Elle est basée sur la détection spécifique de séquences d'ADN propres à chaque microbe testé : bactéries ou parasites, connus ou suspectés de circuler chez les tiques.



Collecte des tiques par la méthode du drapeau. © Agence Phanie

Pour chasser, *Ixodes ricinus* se positionne le plus souvent au sommet de la végétation au sol et attend qu'un hôte passe pour s'agripper à lui. Le principe de la méthode du drapeau repose sur ce mode de chasse, qui est dit « à l'affût ». Le drapeau va mimer le passage d'un hôte et les tiques vont alors s'accrocher sur ce dernier, permettant aux chercheurs de les collecter.

Une dynamique à suivre

Les résultats révèlent que la dynamique des populations de tiques varie en fonction des saisons : le pic principal d'activité est observé au printemps. Il est suivi d'une forte diminution en été puis, parfois, d'une légère augmentation à l'automne avant de re-diminuer en hiver.

Les analyses ont permis de détecter l'ADN de différents agents pathogènes. L'analyse statistique du jeu de données obtenu a mis en évidence des différences de prévalence chez plusieurs agents pathogènes, en fonction des saisons ou encore des années. C'est notamment le cas des bactéries responsables de la maladie de Lyme, les borrélioses, qui ont été plus fréquemment détectées en automne au cours de la période de l'étude.

Ces résultats soulignent l'importance de réaliser un suivi régulier des populations de tiques et des agents pathogènes qu'elles véhiculent : le risque d'infection peut varier d'une saison à l'autre ou d'une année à l'autre. Cette approche de suivi dynamique, en participant à une meilleure compréhension de l'écologie des tiques et de leurs agents pathogènes, devrait permettre -à terme- de contribuer à améliorer les stratégies de prévention contre les maladies à tiques.

Ces recherches sont réalisées dans le cadre de deux métaprogrammes conduits par l'Inra : ACCAF et MEM***. Elles bénéficient d'un soutien financier de la région Île- de -France.

* BIPAR : Unité de **B**ioLOGIE Moléculaire et Immunologie **P**arasitaire

** EPIA : Unité d'**E**pidémiologie des maladies **a**nimales et zoonotiques

*** ACCAF : **A**daptation de l'**A**griculture et de la **F**orêt au **C**hangement **C**limatique

MEM : **M**éta-omiques des **E**cosystèmes **M**icrobiens

Encadré : Contacts

Contact(s) scientifique(s) :

Émilie LEJAL, BIPAR

Thomas POLLET, BIPAR

Karine CHALVET-MONFRAY, EPIA

Département(s) associé(s) : Santé animale

Centre(s) associé(s): Jouy-en-Josas, Auvergne-Rhône-Alpes

Encadré : En savoir plus



Émilie Lejal est rédactrice de cette actualité web. Les recherches qu'elle présente sont effectuées dans le cadre de la thèse de doctorat qu'elle prépare dans l'unité BIPAR*, au sein de l'équipe « Écologie des agents pathogènes vectorisés ». Elle s'intitule : « **Dynamique du pathobiome des tiques** ». Émilie Lejal est doctorante en troisième année de thèse à l'École doctorale Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ABIES) rattachée à l'Université Paris-Est.

Encadré : Ma thèse en 3 500 signes



Initiée en 2016, « **Ma thèse en 3 500 signes** » est une action destinée aux doctorants et jeunes docteurs ayant préparé leur thèse dans une unité du département Santé Animale de l'Inra.

Elle vise à développer les capacités des jeunes chercheurs à communiquer vers le grand public et s'intègre dans la formation par la recherche des doctorants. Ils sont accompagnés dans la rédaction d'une actualité web présentant leurs travaux de recherche en 3 500 signes (environ). Destinée au grand public, l'actualité est ensuite publiée sur le site web du département santé animale, avec le nom des jeunes chercheurs qui apparaissent comme rédacteurs.

ANNEXE 3 : Activités annexes et productions scientifiques

PUBLICATIONS

- Lejal E., Chiquet J., Estrada-Peña A., Aubert J., Robin S., Bailly X., Cougoul A., Gasqui P., Rue O., Midoux C., Mariadassou M., Cosson JF., Chalvet-Monfray K., Vayssier-Taussat M., Pollet T. **Temporal patterns in tick microbial communities : an insight into tick microbe interactions.** (in preparation).
- Lejal E., Estrada-Peña A., Marsot M., Cosson JF., Rué O., Mariadassou M., Midoux C., Vayssier-Taussat M. et Pollet T. **Taxon appearance from extraction and amplification steps demonstrates the value of multiple controls in tick microbiome analysis** (submitted to *Frontiers in Microbiology*).
- Vayssier-Taussat M., Lejal E., Pollet T. **Les agents pathogènes transmis par la tique *Ixodes ricinus* : Quoi de neuf ?** (published in *La Revue de Biologie Médicale*).
- Pollet, T., Sprong, H., Lejal, E., Krawczyk, A.I., Moutailler, S., Cosson, J.-F., Vayssier-Taussat, M., Estrada-Peña, A., 2020. **The scale affects our view on the identification and distribution of microbial communities in ticks.** *Parasites Vectors* 13, 36. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3908-7>
- Lejal, E., Marsot, M., Chalvet-Monfray, K., Cosson, J.-F., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M., Pollet, T., 2019. **A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest.** *Parasites & Vectors* 12, 551. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3799-7>
- Lejal, E., Moutailler, S., Šimo, L., Vayssier-Taussat, M., Pollet, T., 2019. **Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*.** *Parasites & Vectors* 12, 152. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3418-7>

COMMUNICATION & CONGRESS

→ **EIR-A congress 2018:** One Health – Lyon (France) - March 2018

→ **EIR-A congress 2017:** The stakes of breeding in our societies of tomorrow - Rennes (France) - March 2017

❖ Oral presentation

- **Lejal E. et al. – Tick or kit microbiota?**
 - **The 15th meeting of Tick and Tick-Borne-Disease group** - Montpellier (France) - May 2019
- **Lejal E. et al. – Dynamics of the tick pathobiome**
 - **13th International Symposium on Ticks and Tick-borne diseases - International congress** in Weimar (Germany) - March 2019
- **Lejal E. et al. - *Ixodes ricinus*: Pathogen and microbiome study**
 - **ENVA Doctoral, Post-doctoral and Master Days 2018** - Maisons-Alfort (France) - June 2018
- **Lejal E. et al. - Dynamics and co-occurrences of *Ixodes ricinus*-borne pathogens**
 - **The 14th meeting of Tick and Tick-Borne-Disease group** - Theix (France) - March 2018
 - **Pathobiome - International congress** in Ajaccio (France) - March 2018
- **Lejal E. et al. - A three-years study of the *Ixodes ricinus*-borne pathogen dynamics in the Senart forest (2017)**
 - **Final Conference on Neglected Vectors and Vector-Borne Disease, EurNegVec - International congress** in Chania (Create) – September 2017

- Lejal E. et Cosson J.F. - CiTique - A citizen research project to better understand tick-borne diseases (2017)
→ Research days of ENVA 2017 – Maisons-Alfort (France) – June 2017

❖ Poster presentation

- Lejal E. *et al.* - Temporal dynamics of tick microbial communities
→ Scientific and doctoral days of ANSES, JSDA 2018 – Maisons-Alfort (France) - December 2018
- Lejal E. *et al.* - Dynamics and co-occurrences of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in the Senart forest
→ ABIES Doctoral Days 2018 - Tomorrow's Agriculture – Paris (France) – June 2018
- Lejal E. *et al.* - A three-years study of the *Ixodes ricinus*-borne pathogen dynamics in the Senart forest (2017)
→ The 8th congress of the French speaking association of microbial Ecology, AFEM (22H) – *Microbiome: From natural environments to Humans* – Camaret-sur-Mer (France) – October 2017
→ Scientific and doctoral days of ANSES, JSDA 2017 – Maisons-Alfort (France) – October 2017

SCIENTIFIC MISSION

- Sep-Nov 2018 **Three months internship in the Faculty of Veterinary Medicine – Zaragoza (Spain)**
→ Training on microbiota analysis, under the supervising of Agustin Estrada-Peña
- July 2017 **Short Term Scientific Mission (COST - EurNegVec) at the National institute for public health and the environment – Bilthoven (Netherlands)**
→ Development of a collaborative project on tick microbiota with Aleksandra Krawczyk and Hein Sprong

HONORS, FELLOWSHIPS, SCHOLARSHIPS

- **Short-term mission grant from the MEDVETNET (Medical Veterinary Network) - 2018**
→ Mission in the Faculty of Veterinary Medicine of Zaragoza (Spain)
- **International Mission grants from the Métaprogramme MEM - 2018**
→ Mission in the Faculty of Veterinary Medicine of Zaragoza (Spain)
- **Support for EIR-A PhD student from DARESE INRA - 2018**
→ Mission in the Faculty of Veterinary Medicine of Zaragoza (Spain)
- **Award of the best poster from ABIES doctoral school - 2018**
→ Any international mobility
- **Short Term Scientific Mission grants from COST-EurNegVec - 2017**
→ Mission in the RIVM (Netherlands)
- **Student in the 6th promotion of the International Research School Agreenium (EIR-A, Agronomic Veterinary and forest institute of France) – From January 2017**

SCIENCE-SOCIETY INTERACTIONS

- Participation to the CiTique project - A citizen research project to better understand tick-borne diseases:
 - Scholar animation about ticks - Salon SCube, Massy (France) - November 2017
 - Pint of Science event - May 2018

- Science day: Prevention about ticks - La cité des Sciences et de l'Industrie, Paris (France) - October 2017
- School and public animation - "Et tac les tiques!" - Theix - March 2018
- Paris International Agricultural show:
 - March 2019 - INRA stand: The secret life of tick (<https://www.youtube.com/watch?v=FyMSS4GKRQc>)
 - March 2017 - ANSES stand: Prevention about ticks
- Written communication: INRA web news - "Ma Thèse en 3500 signes": "Les tiques de la forêt de Sénart passées au crible des chercheurs" (**Annexe 2**)

Abstract: Tick pathobiome dynamics, the example of *Ixodes ricinus*

In Europe, ticks are the primary vectors of pathogens for both humans and animals, and thus represent a serious issue in terms of public and veterinary health. *Ixodes ricinus*, the predominant tick species in Western Europe, is known to transmit the largest variety of pathogens, including *Borrelia burgdorferi* s.l., the Lyme disease agent. In addition to pathogens, ticks also carry a multitude of other microorganisms, which can influence the acquisition and / or transmission of pathogens, and thus affect the tick vector competence. This information led to take into account the concept of pathobiome, which aims to consider the pathogen in its biotic environment, including other microorganisms hosted by ticks. Moreover, these microbial communities constitute dynamic systems whose composition and diversity are likely to vary at different scales. On one hand at the scale of the tick, according to the tick species, the individual, the stage, or organs, and on the other hand at the temporal or spatial scale. In this context, the understanding of the different factors that can influence the vector competence of ticks, requires to consider first the notion of pathobiome, but also, the scale concept and the dynamic aspect of this system. In this context, my research project aimed to characterize the dynamics of the *I. ricinus* pathobiome. For this purpose, two scales were considered: the temporal scale and the tick organs. The first part of my thesis consisted to identify the dynamics of pathogens, on one hand, in ticks collected monthly for three consecutive years, and on the other hand, in two key organs: the digestive tract and salivary glands. We used a high-throughput screening technique, the microfluidic PCR. At the organ scale, the results led us to put into perspective previous postulates regarding the transmission mechanisms of certain pathogens, and more particularly the *Borrelia*. At the temporal scale, we characterized the dynamics of several pathogenic species belonging to the genera, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Babesia*, well known to circulate in *I. ricinus* ticks in the studied area. We also highlighted significant differences in prevalence for several of these pathogens depending on the season or years. Then, the microbiota of ticks collected for the temporal study was characterized by high-throughput sequencing of the 16S RNA gene. We also tried to identify potential interactions between the different members of these microbial communities using network analysis. After an in depth methodological development to remove potential contaminations, we showed that tick microbiota is highly dominated by several bacterial genera corresponding to common maternally inherited bacteria in different arthropod species (*Arsenophonus*, *Candidatus Midichloria*, *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Spiroplasma*). This study also allowed us to observe an effect according to the season at which the ticks were sampled, which appeared to be mainly due to microorganisms commonly found in the environment. Finally, we identified a large number of links between members of the microbiota, some of which involving several taxa of the *Rickettsia* genus, potentially pathogenic. All our results confirm that the pathobiome of ticks is a dynamic system, which must be studied at different scales.

Key words: *Ixodes ricinus*, Pathobiome, Microbiota, Dynamics, Temporal and organ scales

Résumé : La dynamique du Pathobiome des tiques, l'exemple d'*Ixodes ricinus*

En Europe, les tiques représentent les premiers vecteurs d'agents pathogènes pour l'homme et l'animal, et constituent ainsi un problème de santé publique et vétérinaire préoccupant. *Ixodes ricinus*, espèce de tique prédominante en Europe occidentale, est l'espèce capable de transmettre la plus grande variété d'agents pathogènes, dont les bactéries du complexe *Borrelia burgdorferi* s.l., agents de la maladie de Lyme. Outre les agents pathogènes, les tiques sont également porteuses d'une multitude d'autres micro-organismes, capables d'influencer l'acquisition et/ou la transmission des agents pathogènes. Ces informations ont ainsi conduit à prendre en compte le concept de pathobiome, qui vise à considérer les interactions entre l'agent pathogène et son environnement biotique, notamment les autres micro-organismes hébergés par les tiques. Par ailleurs, ces communautés microbiennes constituent des systèmes dynamiques dont la composition et la diversité sont susceptibles de varier, d'une part à l'échelle de la tique et d'autre part à l'échelle temporelle ou spatiale. Ainsi la compréhension des différents facteurs pouvant influencer sur la compétence vectorielle des tiques, nécessite, non seulement, de considérer la notion de pathobiome dans l'étude des tiques et des agents pathogènes qu'elles transmettent, mais aussi, de bien considérer cette notion d'échelle et l'aspect dynamique de ce système. Dans un tel contexte, mon projet de thèse visait à caractériser la dynamique du pathobiome de tiques *I. ricinus*. Pour cela deux échelles ont été considérées : l'échelle temporelle et les organes des tiques. La première partie de ma thèse consistait à identifier la dynamique des agents pathogènes d'une part dans des tiques collectées mensuellement pendant trois années consécutives et d'autre part dans deux organes clés : le tube digestif et les glandes salivaires. Pour cela, nous avons utilisé une technique de criblage haut-débit, la PCR microfluidique. À l'échelle des organes, les résultats obtenus nous ont conduit à remettre en perspective certains postulats établis quant aux mécanismes de transmission de certains agents pathogènes, et plus particulièrement les *Borrelia*. À l'échelle temporelle, nous avons pu caractériser la dynamique de plusieurs espèces pathogènes appartenant aux genres, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* et *Babesia*, bien connues pour circuler chez les tiques *I. ricinus* dans la zone étudiée. Nous avons aussi pu mettre en évidence, des différences de prévalences pour plusieurs de ces agents pathogènes en fonction des saisons ou encore des années d'échantillonnage. Par ailleurs, le microbiote des tiques de l'étude temporelle, a été caractérisé par séquençage haut débit du gène de l'ARN 16s et d'éventuelles interactions entre les différents membres de ces communautés microbiennes ont été recherchées à l'aide d'analyses de réseaux. Après une rigoureuse mise au point méthodologique pour s'affranchir des potentielles contaminations liées aux étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN, nous avons montré que le microbiote des tiques était largement dominé par plusieurs genres bactériens correspondant à des bactéries communément transmises verticalement chez différentes espèces d'arthropodes (*Arsenophonus*, *Candidatus Midichloria*, *Rickettsia*, *Wolbachia* et *Spiroplasma*). L'étude de l'ensemble du microbiote nous a également permis d'observer un effet de la saison à laquelle les tiques avaient été échantillonnées, qui semblait être principalement le fait de micro-organismes communément retrouvés dans l'environnement. Enfin, nous avons identifié un grand nombre de liens entre les membres du microbiote, dont certains impliquant plusieurs taxons du genre *Rickettsia*, potentiellement pathogènes. Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse, a permis de montrer que le pathobiome des tiques est un système dynamique, qu'il est nécessaire d'étudier à différentes échelles, pour en caractériser le fonctionnement.

Mots-clés : *Ixodes ricinus*, Pathobiome, Microbiote, Dynamique, Échelle temporelle, Organes