



**HAL**  
open science

# Les maladies transmises par les tiques : pathogènes émergents et outils innovants appliqués à l'épidémiologie vectorielle et humaine

Pierre Boyer

► **To cite this version:**

Pierre Boyer. Les maladies transmises par les tiques : pathogènes émergents et outils innovants appliqués à l'épidémiologie vectorielle et humaine. Microbiologie et Parasitologie. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ030 . tel-03934806

**HAL Id: tel-03934806**

**<https://theses.hal.science/tel-03934806>**

Submitted on 11 Jan 2023

**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.



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et  
de la Santé (ED 414)

---

UR 7290 : virulence bactérienne précoce, groupe borréliose de Lyme

**Thèse présentée par :**

**Pierre BOYER**

Soutenue le 12 Octobre 2020

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

Discipline/S spécialité: Sciences de la Vie et de la Santé/Microbiologie

**LES MALADIES TRANSMISES PAR LES  
TIQUES : PATHOGÈNES ÉMERGENTS ET OUTILS  
INNOVANTS APPLIQUÉS À L'ÉPIDÉMIOLOGIE  
VECTORIELLE ET HUMAINE.**

**Thèse dirigée par :**

Mme. BOULANGER Nathalie  
M. JAULHAC Benoît

Docteur, université de Strasbourg  
Professeur, université de Strasbourg

**Rapporteurs :**

M. DURON Olivier  
M. BOULOUIS Henri Jean  
M. CAUMES Éric

Chargé de recherche, CNRS Montpellier  
Professeur, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Paris  
Professeur, Faculté de Médecine de la Sorbonne, Paris

**Examineur interne :**

Mme BLANDIN Stéphanie

Docteur, université de Strasbourg

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Merci au Docteur Olivier Duron et aux Professeurs Éric Caumes et Henri-Jean Boulouis d'avoir accepté d'être les rapporteurs externes et au Dre Stéphanie Blandin d'en être l'examineur interne. Merci également au Pre Laurence Sabatier d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Je tiens ensuite à remercier Nathalie Boulanger et Benoît Jaulhac d'avoir encadré ce travail de thèse. Je souhaite au plus haut point poursuivre ces travaux initiés depuis mon arrivée en master dans l'équipe.

Merci au Dr. Gilles Prévost, directeur de l'UR 7290 de m'accueillir dans cette unité de recherche que nous aurons à cœur de voir perdurer et grandir.

Nous passons des heures et des journées entières à l'institut de bactériologie ou au Plateau Technique de Microbiologie. Je tiens à remercier tous ceux qui font de ces heures passées un vrai bonheur. La « team cantine » (Émilie, Christelle, Antoine, François) et tous mes collègues du laboratoire de bactério (Fred, Emmanuelle, Valérie, Céline). La team « pause café » (Molis, Ulie et Galette). Merci également aux technicien.nes du PTM en particulier au secteur HAP !

Merci aux CNR girls (Lisa, Marine, Laurence et Filiz) pour votre aide et votre bonne humeur. Merci également à Cathy Barthel, ton sérieux, ta rigueur et ta gentillesse font de toi une personne précieuse.

Un merci particulier à Antoine C et Julie D pour leur aide dans la relecture de ce manuscrit.

*À mes parents, merci pour votre soutien*

*À Tiphaine, avec tout mon amour*

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I :</b>	<b>3</b>
<b>TIQUES ET MALADIES A TIQUES</b>	<b>3</b>
<b>LES TIQUES (ACARI : IXODIDA)</b> .....	<b>4</b>
I. TAXONOMIE.....	4
A. Les Argasidae.....	6
B. Les Ixodidae .....	8
II. BIOLOGIE .....	9
A. Développement .....	9
B. Repas sanguin.....	12
C. Reproduction .....	12
III. ÉCOLOGIE .....	13
A. Les tiques dans l'environnement.....	13
B. Spécificité d'hôtes .....	14
IV. PRINCIPALES ESPECES D'INTERET EN EUROPE.....	15
A. Le genre <i>Ixodes</i> .....	15
B. Le complexe <i>Ixodes ricinus</i> .....	15
C. Autres <i>Ixodes</i> spp. en Europe.....	21
V. LES AUTRES ESPECES DE TIQUES D'INTERET EN EUROPE .....	25
<b>TIQUES, MICROORGANISMES ET MALADIES</b> .....	<b>29</b>
I. TIQUES ET MICROORGANISMES .....	29
II. LES MICROORGANISMES TRANSMIS PAR LES TIQUES A L'ORIGINE DE MALADIES.....	33
<b>REVUE DE LA LITTERATURE : OTHER IXODES-BORNE DISEASES</b> .....	<b>41</b>
<b>PARTIE II :</b>	<b>42</b>
<b>IDENTIFICATION DE L'ESPÈCE DE TIQUE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF</b>	<b>42</b>
<b>IDENTIFIER LES TIQUES : POURQUOI ET COMMENT ?</b> .....	<b>92</b>

I. INTERET DE L'IDENTIFICATION DES TIQUES.....	94
A. Notion de compétence vectorielle.....	94
B. Modification des aires de répartition des tiques.....	97
II. COMMENT IDENTIFIER LES TIQUES ? .....	100
A. Identification morphologique.....	100
B. Identification moléculaire de l'espèce de tique.....	102
C. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	103
<b>ARTICLE N°1 : IDENTIFICATION OF CLOSELY RELATED <i>IXODES</i> SPECIES BY PROTEIN PROFILING WITH MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY .....</b>	<b>109</b>
<b><u>PARTIE III :</u></b>	<b>111</b>
<b><u>MALADIES VECTORIELLES A TIQUES ET ÉMERGENCE, L'EXEMPLE DE DEUX MICROORGANISMES : <i>N. MIKURENSIS</i> ET <i>B. MIYAMOTOI</i></u></b>	<b>111</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>134</b>
I. LES MVT SONT-ELLES EMERGENTES ? .....	134
II. À LA RECHERCHE DES MICROORGANISMES EMERGENTS DANS LES SYNDROMES FEBRILES APRES PIQURE DE TIQUE .....	137
<b>ARTICLE N° 2 : ASSESSMENT OF <i>BORRELIA MIYAMOTOI</i> IN FEBRILE PATIENTS AND TICKS IN ALSACE, AN ENDEMIC AREA FOR LYME BORRELIOSIS IN FRANCE .....</b>	<b>139</b>
<b>ARTICLE N°3 : THE EMERGING TICK BORNE PATHOGEN <i>NEOEHRlichia MIKURENSIS</i> : FIRST FRENCH CASE SERIES AND VECTOR EPIDEMIOLOGY. ....</b>	<b>147</b>
<b><u>PARTIE IV :</u></b>	<b>148</b>
<b><u>VERS UNE APPROCHE PROTÉOMIQUE POUR LE DIAGNOSTIC SYNDROMIQUE DES SYNDROMES FÉBRILES APRES PIQÛRE DE TIQUE</u></b>	<b>148</b>
<b>CONTEXTE DE L'ETUDE .....</b>	<b>168</b>
<b>ÉTUDE PRELIMINAIRE.....</b>	<b>170</b>
I. MATERIELS ET METHODES .....	170
A. Nature des échantillons .....	170
B. Identification des protéines des échantillons.....	170
II. RESULTATS.....	173
A. Analyse des tiques sauvages .....	173
B. Analyse des biopsies cutanées.....	174

III. DISCUSSION .....	177
A. Choix de la matrice .....	177
B. Choix des marqueurs protéiques .....	177
C. Perspectives .....	178
<b><u>PARTIE V :</u></b>	<b>179</b>
<b><u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b>179</b>
<b>IDENTIFICATION DES TIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE .....</b>	<b>180</b>
I. ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS PREANALYTIQUES .....	180
A. Influence de la conservation de l'échantillon.....	180
B. Choix des parties du corps à inclure.....	181
C. Standardisation de la préparation de l'échantillon .....	181
D. Choix du spectromètre de masse.....	182
II. DIFFERENCIATION D'ESPECES PHYLOGENETIQUEMENT PROCHES PAR MALDI-TOF.	182
III. ÉTUDE DES PROTEINES/PEPTIDES COMPOSANT LE SPECTRE DE MASSE .....	183
<b>RECHERCHE DE MICROORGANISMES EMERGENTS .....</b>	<b>184</b>
I. LES AGENTS RESPONSABLES DE SYNDROMES FEBRILES APRES PIQURE DE TIQUE .....	184
II. PERSPECTIVES .....	184
A. Autres tableaux cliniques à investiguer.....	185
B. Approche non supervisée pour le diagnostic des syndromes fébriles après piqûre de tique.....	185
C. Perspective ancillaire : étude du réservoir de <i>N. mikurensis</i> .....	186
<b>AMELIORATION DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES SYNDROMES FEBRILES APRES PIQURE DE TIQUES.....</b>	<b>187</b>
I. AMELIORATION A COURT ET MOYEN TERMES.....	187
A. Amélioration à court terme (Janvier 2021) .....	187
B. Amélioration à moyen terme .....	187
II. AMELIORATION A PLUS LONG TERME .....	187
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>189</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>191</b>

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Taxonomie des tiques d'après Boulanger et McCoy, (2018) .....	5
Figure 2 : Anatomie externe d'une tique molle adulte femelle (Argasidae) (d'après Estrada-Peña <i>et al.</i> , (2017)) .....	6
Figure 3 : Anatomie externe d'une tique dure femelle (Ixodidae) d'après (Estrada-Peña <i>et al.</i> , (2017)).....	8
Figure 4 : Cycle d'une tique Ixodidae à trois hôtes (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013)) .....	10
Figure 5 : Cycle d'une tique Ixodidae à deux hôtes (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013)) .....	10
Figure 6 : Cycle d'une tique Ixodidae à un hôte (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013)) ...	11
Figure 7 : Cycle d'une tique Argasidae (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013)).....	11
Figure 8 : Les trois stases de la tique <i>I. ricinus</i> (de gauche à droite : femelle, nymphe et larve) (crédit photo N. Boulanger).....	18
Figure 9 : Femelle <i>I. persulcatus</i> (Crédit photo : Bristol University Tick ID) .....	19
Figure 10 : Différences entre <i>I. inopinatus</i> (A) et <i>I. ricinus</i> (B) d'après Chitimia-Dobler <i>et al.</i> , (2019). .....	20
Figure 11 : <i>I. hexagonus</i> femelle (A) et male (B) (crédit photo : Bristol University Tick ID) 21	
Figure 12 : <i>I. uriae</i> male (crédit photo : Bristol University Tick ID) .....	22
Figure 13 : <i>I. acuminatus</i> femelle (crédit photo : Bristol University Tick ID) .....	24
Figure 14 : <i>I. vespertilionis</i> femelle ((crédit photo : Bristol University Tick ID).....	25
Figure 15 : Les différents microorganismes interagissant avec les tiques (d'après Duvallet <i>et al.</i> , (2018)).....	30
Figure 16 : Histoire naturelle de la borréliose de Lyme en l'absence de traitement bien conduit d'après (Boyer <i>et al.</i> , 2019b).....	32
Figure 17 : Différents rôles pouvant être pris par une tique.....	93
Figure 18 : Principe du MALDI-TOF d'après (Croxatto <i>et al.</i> , 2012).....	105
Figure 19 : Spectre de masse des 4 pattes d' <i>I. hexagonus</i> .....	105
Figure 20 : Stratégie de création, validation d'une base de données et d'utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des tiques (d'après Yssouf <i>et al.</i> , (2016)).....	108



Figure 21 : Résumé des différentes phases permettant de mettre au point un diagnostic multiplexé des syndromes fébriles après piqûre de tique.....	169
Figure 22 : Banques de données utilisées en fonction des matrices testées. ....	172
Figure 23 : Nombre de protéines et peptides identifiés par microorganisme dans les tiques <i>I. ricinus</i> .....	173
Figure 24 : Résumé des axes de recherche et des perspectives développés dans cette thèse.	190

# TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des Argasidae selon les 3 grandes écoles (d'après Durden <i>et al.</i> , (2013)).....	7
Tableau 2 : Principales espèces de tiques hors genre <i>Ixodes</i> d'après (Estrada-Peña <i>et al.</i> , (2017)); * Peuvent piquer l'homme s'il est proche des nids des oiseaux hôtes ** pour le virus TBE et <i>Dermacentor</i> et <i>Haemaphysalis</i> les données initiales proviennent d'un article princeps non-vérifiable .....	28
Tableau 3 : Microorganismes transmis par les tiques et maladies associées (d'après de la Fuente <i>et al.</i> , (2008)).....	40
Tableau 4 : Compétence vectorielle de différentes espèces de tique pour les espèces du complexe <i>B. burgdorferi</i> s.l (d'après Eisen, (2020)).....	96
Tableau 5 : Liste des pathogènes, hôte et vecteur associés, ainsi que le nombre d'entrées utilisées (Janvier 2018).....	171
Tableau 6 : Peptides identifiés dans des biopsies murines artificiellement infectées par inoculation bactérienne et dont les protéines ont été attribuées à <i>A. phagocytophilum</i> .....	174
Tableau 7 : Protéines identifiées dans les biopsies murines artificiellement infectée par inoculation et attribuées à <i>Babesia</i> spp. (R1 et R2 correspondent au deux répliquats) .....	175
Tableau 8 : Protéines identifiées à partir de peptides uniques dans des biopsies cutanées de souris infectées par des tiques sauvages.....	176

# LISTE DES ABREVIATIONS

ADNr	ADN ribosomique
CCHF	Crimean-Congo hemorrhagic fever (fièvre hémorragique de Crimée-Congo)
CCHFv	Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo
CNR	Centre National de Référence
COI	Cytochrome c Oxidase sous-unité I
EM	érythème migrant
GlpQ	Glycerophosphodiester phosphodiesterase
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IPHC	Institut Pluridisciplinaire Hubert CURIEN
ITS	Internal Transcribed Spacer
LC-SRM	Liquid Chromatography-Selected Reaction Monitoring
LSMBO	Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
MeSH	Medical Subject Heading
MVT	Maladies vectorielles à tiques
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OspC	Outer surface protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
RompB	<i>Rickettsial</i> Outer-Membrane Protein B
TBE	Tick Borne Encephalitis (Encéphalite à tiques)
TBEv	Virus de l'encéphalite à tiques
TIBOLA	Tick Borne LymphAdénopathy
TOF	time of flight
UR7290	Unité de Recherche 7290

# INTRODUCTION

Les tiques sont des arthropodes ectoparasites strictement hémato-phages, elles ont une répartition mondiale (Guglielmone et Robbins, 2018). Elles sont particulièrement craintes par l'homme, car lors de leur repas sanguin, elles peuvent transmettre des microorganismes pouvant présenter un caractère pathogène pour l'homme et les animaux. On parle de maladies vectorielles à tiques (MVT). Les tiques présentent la plus grande diversité d'agents infectieux transmissibles aux vertébrés. Elles sont reconnues comme les plus importants arthropodes vecteurs pour la médecine humaine et vétérinaire, devant les moustiques (Dantas-Torres *et al.*, 2012). De plus, la répartition de certaines espèces de tiques se modifie par l'influence de facteurs locaux et globaux modifiant ainsi les zones à risque de contracter une MVT (Kilpatrick et Randolph, 2012; Ogden, 2013).

Les tiques peuvent également provoquer par leur seul repas sanguin des réactions immunitaires allant de la simple allergie à des formes plus graves telles que des paralysies ou chocs anaphylactiques (Sonenshine et Roe, 2013). Lorsqu'elles infestent le bétail, elles sont à l'origine d'une baisse des rendements agricoles (diminution de la production laitière, avortement, perte de poids...). Les pertes économiques mondiales et les surcoûts dus aux maladies transmises par les tiques et/ou aux infestations graves de tiques dans les cheptels sont estimés à des milliards de dollars par an (Jongejan et Uilenberg, 2004).

La diversité des espèces de tiques, des agents infectieux qu'elles peuvent transmettre et des hôtes offre de nombreuses pistes de recherche pour améliorer la compréhension, la prise en charge et le contrôle des MVT. Ce travail de thèse contribue à améliorer la connaissance des espèces de tique et des microorganismes qu'elles transmettent. Il s'articule autour de deux axes principaux et un axe encore en cours de développement.

Le premier concerne l'étude des tiques vectrices par la mise au point d'une méthode rapide et fiable permettant **l'identification** au niveau de l'espèce, des tiques. Ce premier point est fondamental, car il permet de connaître le statut vecteur ou non vecteur d'une tique pour un microorganisme donné, les tiques pouvant être collectées dans la nature, sur un animal ou retirée d'un patient. Une fois la tique identifiée, une recherche ciblée et pertinente de microorganismes susceptibles d'être transmis par cette tique pourra être entreprise ce qui permettra de mesurer le risque d'exposition aux MVT établi de campagnes de collecte de tiques et de planifier d'éventuelles mesures de contrôle. L'identification de la tique permet également permettre d'orienter la surveillance des patients se présentant avec une piqûre de tique.

Le deuxième axe de recherche concerne **l'épidémiologie vectorielle et l'implication en clinique humaine** de deux microorganismes pathogènes décrits comme **émergents** : *Borrelia miyamotoi* et *Neohrlichia mikurensis*. Il n'existe à l'heure actuelle que très peu de données dans la littérature sur ces deux microorganismes, mais ces derniers semblent être à l'origine de syndromes fébriles en lien avec une piqûre de tique. En France, avant nos travaux, aucune cohorte de patients fébriles après piqûre de tique n'avait été testée. Il n'existait que peu de données sur le taux de portage de ces deux microorganismes par les tiques. Nous avons cherché à connaître leur implication respective dans l'étiologie de ces syndromes.

Enfin, le dernier axe de recherche est une étude préliminaire concernant le **diagnostic syndromique des manifestations fébriles après piqûre de tique**. En effet, une étiologie infectieuse est suspectée chez un patient présentant un tel syndrome et différents microorganismes transmis par les tiques peuvent en être à l'origine. Une documentation microbiologique est fondamentale pour proposer un traitement et/ou un suivi adapté en fonction du microorganisme responsable. Pourtant ce dernier n'est pas souvent identifié. Dans ce contexte, une détection simultanée à partir d'un seul prélèvement de plusieurs microorganismes transmis par les tiques et décrits comme à l'origine de syndromes fébriles, constituerait une approche diagnostique innovante et intéressante. Nous avons donc opté pour une approche par protéomique, dont les résultats préliminaires seront présentés dans cette thèse.

**PARTIE I :**  
**TIQUES ET MALADIES A TIQUES**

# LES TIQUES (ACARI : IXODIDA)

---

Les tiques sont certainement avec les moustiques les arthropodes les plus étudiés. En effet, ils peuvent transmettre de nombreux microorganismes d'importance pour la médecine humaine et vétérinaire. Dans l'hémisphère Nord, la maladie de Lyme ou borréliose de Lyme est la maladie à transmission vectorielle la plus fréquente de l'hémisphère Nord (Dantas-Torres *et al.*, 2012). En Europe de l'Ouest, elle est majoritairement transmise par *Ixodes ricinus*. Cette dernière est également vectrice d'autres microorganismes potentiellement pathogènes.

Après avoir présenté quelques notions de base de taxonomie, de morphologie, de biologie et d'écologie, nous détaillerons les espèces apparentées à *I. ricinus*. En effet, nous nous sommes intéressés particulièrement à ces tiques et aux microorganismes qu'elles peuvent transmettre.

## I. TAXONOMIE

Les tiques appartiennent au phylum des arthropodes, au sous-phylum des Chelicerates, à la classe des Arachnides et à la sous-classe des Acariens. La sous-classe des Acariens comprend plusieurs superordres, les Acariformes, les Opilioacariformes et les Parasitiformes. C'est dans ce dernier superordre que se trouve l'ordre des Ixodida, qui représente ce que l'on appelle de façon vernaculaire les tiques (Figure 1). Cet ordre comprend environ 900 espèces à travers le monde qui font partie de trois familles : les Argasidae (ou tiques molles), les Ixodidae (ou tiques dures) et les Nuttalliellidae (qui ne comprend qu'une seule espèce *Nuttalliella namaqua*) (Guglielmone *et al.*, 2010).

Si la systématique des tiques est relativement stable à l'échelle des différentes familles, elle est en pleine évolution aux échelles inférieures (genre et espèce), particulièrement depuis l'avènement de la biologie moléculaire. Malgré l'essor de la biologie moléculaire, l'analyse morphologique des tiques constitue encore la pierre angulaire de la systématique des tiques et permet leur identification.

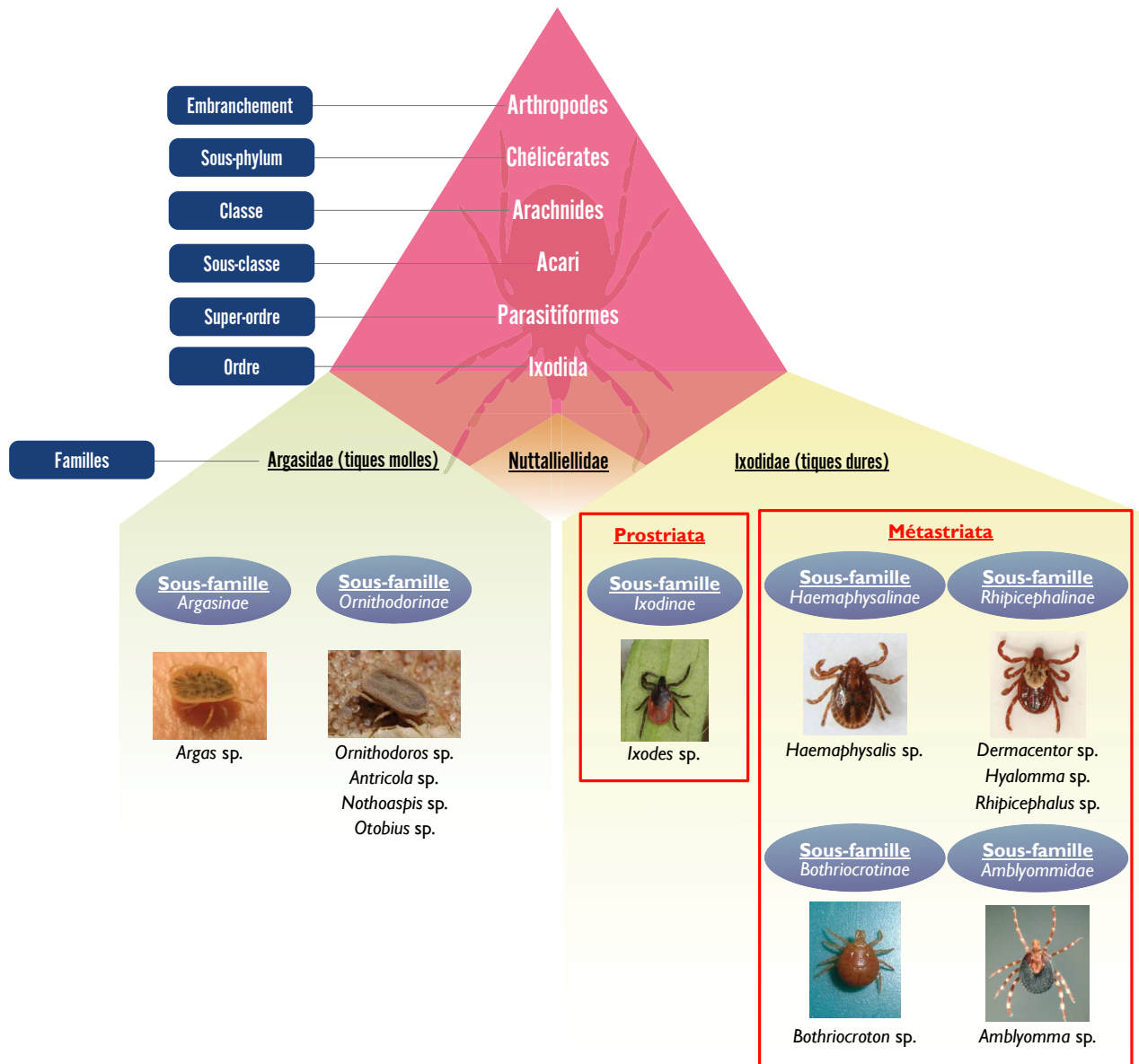


Figure 1 : Taxonomie des tiques d'après Boulanger et McCoy, (2018)



## A. Les Argasidae

Les tiques Argasidae, aussi appelées tiques molles, comprennent 193 espèces. La systématique de cette famille à l'échelle du genre n'est pas établie et diffère selon les auteurs (Guglielmone *et al.*, 2010). Il existe 3 grandes écoles sur la classification des Argasidae, l'école russe, l'école américaine et Klompen-Oliver (Durden *et al.*, 2013) (Tableau 1).

L'école américaine, corroborée par les travaux de Guglielmone *et al.*, (2010) a développé un système de classification qui inclut la morphologie et le séquençage de fragments de gènes mitochondriaux (en particulier l'ADNr 16S). Dans ce système de classification, les Argasidae sont divisés en 5 genres : *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* et *Otobius*. Cependant, la position taxonomique de certaines espèces pourrait être révisée en fonction de la reconnaissance des genres *Carios* et *Alectorobius* dont l'existence fait actuellement débat (Boulanger et McCoy, 2018).

Le terme de tique molle (*soft tick* en anglais) fait référence au tégument non chitinisé qui recouvre le corps aplati de la tique. Ce tégument est rugueux ce qui lui donne un aspect texturé, marqué de sillons. Il est à noter que les larves possèdent une petite partie de leur tégument dorsal chitinisé, c'est le pseudoscutum. Une caractéristique des nymphes et adultes Argasidae est la position ventrale du capitulum, à l'intérieur d'une cavité le camérostome. Les larves, elles, possèdent le capitulum en position terminale comme les Ixodidae.

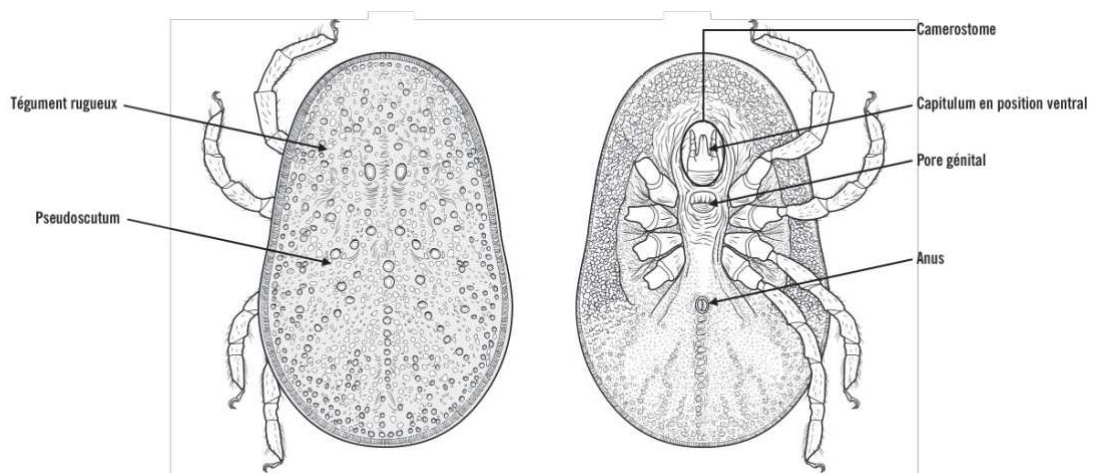


Figure 2 : Anatomie externe d'une tique molle adulte femelle (Argasidae) (d'après Estrada-Peña *et al.*, (2017))

Ecole Russe	Ecole Américaine	Ecole de Klompen et Oliver
<b>Sous-famille Argasinae</b>	<b>Sous-famille Argasinae</b>	<b>Sous-famille Argasinae</b>
Tribu <sup>1</sup> des <i>Argasini</i>	Genre <i>Argas</i>	Genre <i>Argas</i>
Genre <i>Argas</i>	Sous-genres <i>Argas</i> , <i>Persicargas</i> , <i>Microargas</i> , <i>Carios</i> , <i>Chiropterargas</i> , <i>Secretargas</i> , <i>Ogadenus</i>	Sous-genre <i>Arges</i> (incorporant <i>Persicargas</i> , <i>Secretargas</i> , <i>Ogadenus</i> , <i>Proknekalia</i> , <i>Alveonasmus</i> )
Sous-genres <i>Argas</i> , <i>Persicargas</i> , <i>Carios</i> , <i>Chiropterargas</i> , <i>Secretargas</i>		
<b>Sous-famille Ornithodorinae</b>	<b>Sous-famille Ornithodorinae</b>	<b>Sous-famille Ornithodorinae</b>
Tribu des <i>Otobiini</i>	Genre <i>Otobius</i>	Genre <i>Otobius</i>
Genre <i>Otobius</i>	Genre <i>Ornithodoros</i>	Genre <i>Ornithodoros</i> (Incorporant <i>Ornithodoros</i> , <i>Pavlovskyella</i> , <i>Theriodoros</i> , <i>Ornamentum</i> , <i>Microargas</i> )
Genre <i>Alveonasmus</i>	Sous-genre <i>Proknekalia</i> , <i>Alveonasmus</i> , <i>Ornithodoros</i> , <i>Pavlovskyella</i> (incorporant <i>Theriodoros</i> ), <i>Ornamentum</i> , <i>Alectorobius</i> , <i>Reticulinasus</i> , <i>Subpamatus</i>	Genre <i>Carios</i> (Incorporant <i>Carios</i> , <i>Chiropterargas</i> , <i>Alectorobius</i> , <i>Subpamatus</i> , <i>Reticulinasus</i> , <i>Parantricola</i> , <i>Antricola</i> , <i>Nothoaspis</i> )
Sous-genres <i>Ogadenus</i> , <i>Proknekalia</i> , <i>Alveonasmus</i>	Genre <i>Nothoapsis</i>	
Tribu des <i>Ornithodorini</i>	Genre <i>Antricola</i>	
Genre <i>Ornithodoros</i>	Sous-genre <i>Parantricola</i> , <i>Antricola</i>	
Sous-genre <i>Ornithodoros</i> , <i>Pavlovskyella</i> , <i>Theriodoros</i> , <i>Ornamentum</i> , <i>Alectorobius</i> , <i>Reticulinasus</i> , <i>Subpamatus</i>		
Genre <i>Antricola</i>		
Sous-genres <i>Parantricola</i> , <i>Antricola</i>		

Tableau 1 : Classification des Argasidae selon les 3 grandes écoles (d'après Durden *et al.*, (2013))<sup>1</sup> Rang taxonomique supérieur au genre et inférieur à la famille

## B. Les Ixodidae

Si la taxonomie des Argasidae demeure incertaine, celle des Ixodidae semble plus figée même si certains auteurs sont en désaccord sur l'existence de certains genres. Selon Guglielmone *et al.*, (2010), les Ixodidae englobent près de 702 espèces dans les genres suivants : *Amblyomma* (130 espèces), *Anomalohimalaya* (3 espèces), *Bothriocroton* (7 espèces), *Cosmiomma* (1 espèce), *Cornupalpatum* (1 espèce), *Compluriscutula* (1 espèce), *Dermacentor* (34 espèces), *Haemaphysalis* (166 espèces), *Hyalomma* (27 espèces), *Ixodes* (243 espèces), *Margaropus* (3 espèces), *Nosomma* (2 espèces), *Rhipicentor* (2 espèces) et *Rhipicephalus* (82 espèces). Il convient de noter que cinq espèces appartenant précédemment au genre *Boophilus* ont été incorporées dans le genre *Rhipicephalus* (sous-genre *Boophilus*) en 2001 (Beati et Keirans, 2001).

D'un point de vue morphologique (Figure 3), les Ixodidae présentent les caractéristiques suivantes : (i) un capitulum situé à l'avant, visible du dessus ; (ii) derrière le capitulum, un bouclier dur, le scutum ; (iii) un dimorphisme sexuel distinct. Le dos du mâle adulte Ixodidae est entièrement recouvert par le scutum, mais la larve, la nymphe et la femelle adulte ont un scutum qui ne couvre que la partie antérieure de l'abdomen dorsal (Farkas *et al.*, 2013).

Parmi ces genres, deux groupes s'opposent par une particularité anatomique : la position du sillon périanal par rapport à l'anus. Le sillon périanal passe en avant de l'anus pour les Prostriata et par l'arrière pour les Metastriata. Les Prostriata ne comprennent que le genre *Ixodes* et les Metastriata tous les autres genres.

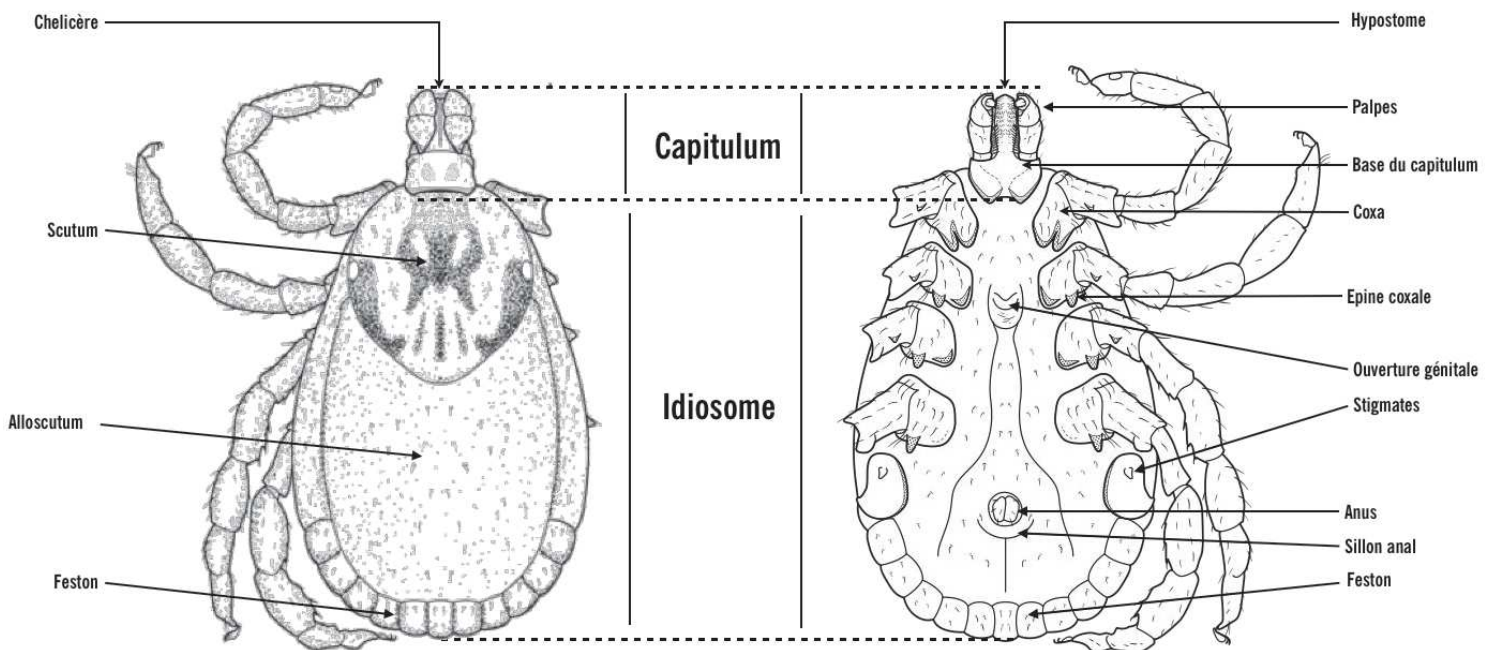


Figure 3 : Anatomie externe d'une tique dure femelle (Ixodidae) d'après (Estrada-Peña *et al.*, (2017))

## II. BIOLOGIE

### A. Développement

Le développement des tiques se déroule en trois stases<sup>1</sup> qui suivent l'éclosion de l'œuf. Il s'agit de la larve, la nymphe (cette stase peut contenir plusieurs stades<sup>2</sup> nymphaux chez les Argasidae) et l'adulte. Les caractéristiques sexuelles évidentes, telles que le pore génital, ne sont visibles qu'à la stase adulte (Sonenshine et Roe, 2013). Les tiques sont des ectoparasites hématophages, qui prennent un repas sanguin pour passer d'une stase ou stade à l'autre en réalisant une mue.

Chez la plupart des espèces, chaque stade trouve un hôte, se nourrit, se détache et mue au stade suivant. Chez quelques espèces d'Ixodidae, les larves et/ou les nymphes restent et muent en adultes sur le même hôte : on parle alors de tiques monophasiques ou diphasiques (Sonenshine et Roe, 2013). Les différents cycles sont synthétisés sur les Figures 4 à 7.

L'une des caractéristiques les plus remarquables des tiques est leur long cycle de vie. La plupart des espèces de tiques Ixodidae ont une durée de vie d'au moins un an ; beaucoup vivent deux ou même trois ans. Le cycle de vie des tiques Argasidae est généralement beaucoup plus long (jusqu'à 20 ans dans certains cas), car il existe plusieurs stades nymphaux, chacun nécessitant un repas sanguin distinct. Ces tiques sont particulièrement adaptées aux longues périodes de jeûne entre les repas sanguins. Leur longévité exceptionnelle perpétue également les agents pathogènes qu'elles transportent (par exemple, les *Borrelia* de fièvres récurrentes) (Apanaskevich et Oliver, 2013; Sonenshine et Roe, 2013; McCoy et Boulanger, 2015).

---

<sup>1</sup> Stase « Formes qu'[un arthropode] acquiert successivement par ses mues, au cours de son ontogenèse post-embryonnaire, à condition que ces formes se distinguent les unes des autres, d'une mue à la suivante par des caractères de surface qui soient précis [...] » (Grandjean, 1969). Pour les tiques les stases sont la larve, la nymphe et l'adulte.

<sup>2</sup> Un stade correspond à une forme entre deux mues, sans que ces formes se distinguent nécessairement. (Grandjean, 1969) précise « une stase est toujours un stade mais rien n'oblige un stade à être une stase »

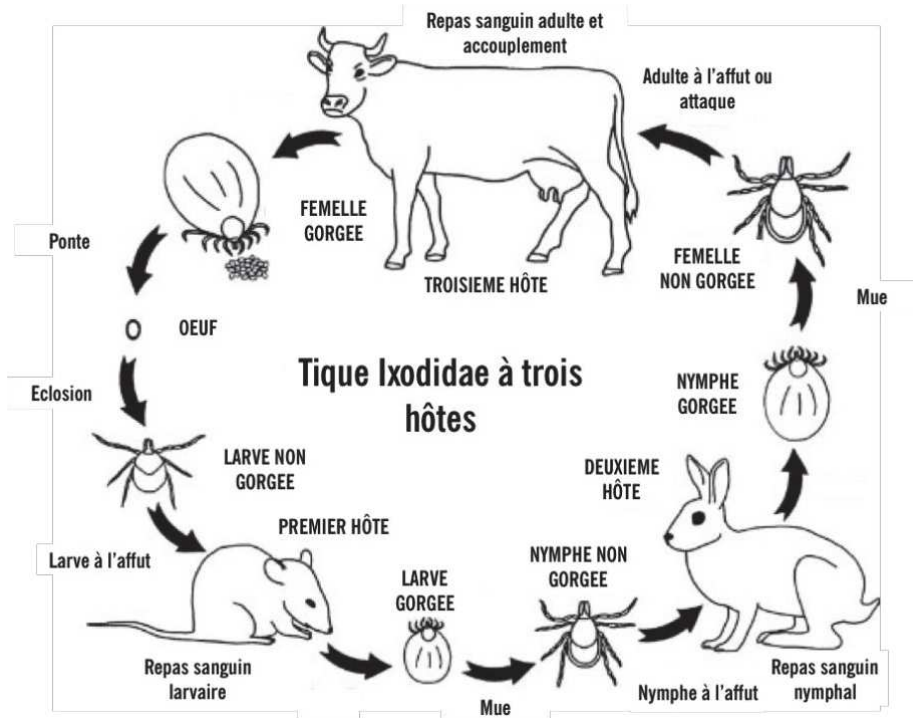


Figure 4 : Cycle d'une tique Ixodidae à trois hôtes (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013))

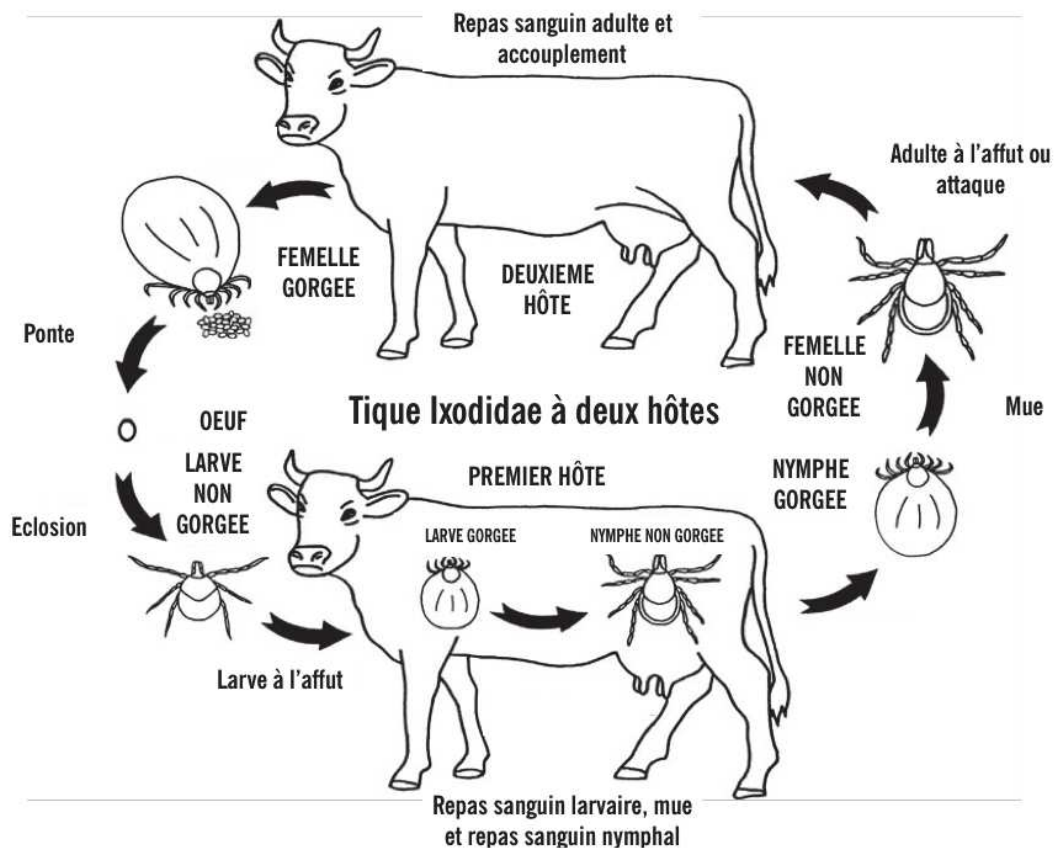


Figure 5 : Cycle d'une tique Ixodidae à deux hôtes (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013))



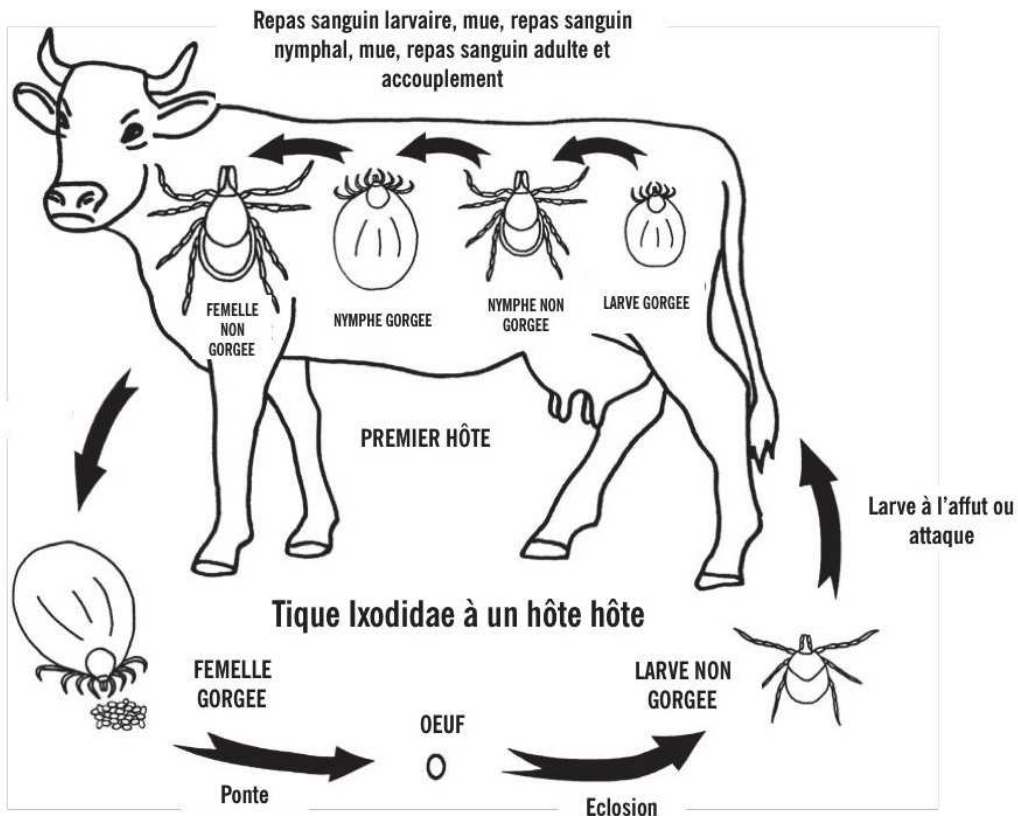


Figure 6 : Cycle d'une tique Ixodidae à un hôte (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013))

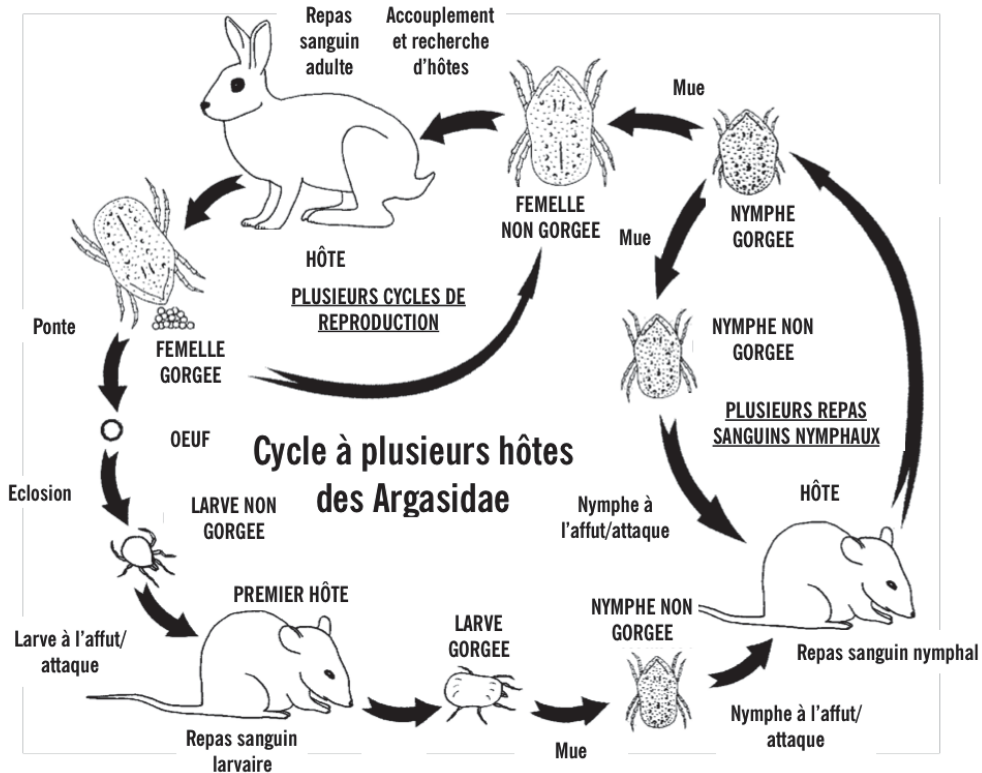


Figure 7 : Cycle d'une tique Argasidae (d'après Apanaskevich et Oliver, (2013))

## B. Repas sanguin

Pour se nourrir, les tiques réalisent une piqûre telmophage (dilatation des tissus et formation d'une poche de sang) très longue en comparaison des autres arthropodes piqueurs (plusieurs minutes, heures ou même jours) et le volume de sang ingéré est important. Lorsqu'elles piquent leurs hôtes, les tiques insèrent leurs chélicères, coupant et déchirant la couche cornée, l'épiderme cellulaire et les couches externes du derme, puis s'incrute avec leur hypostome qui sert de véritable ancre.

Chez les tiques Argasidae, le repas sanguin est rapide (quelques minutes ou quelques heures, bien qu'il puisse être plus long [plusieurs jours] pour les larves), la tique multiplie environ 5 à 10 fois son poids corporel. Pour concentrer le repas sanguin, un liquide aqueux clair et incolore est excrété par les glandes coxales de la tique pendant ou peu après la fin du repas sanguin. Enfin, la tique gorgée quitte son hôte pour chercher un abri dans un microenvironnement approprié où elle pourra digérer son repas (Sonenshine et Roe, 2013).

Les tiques Ixodidae se fixent et sécrètent (à partir de leurs glandes salivaires) de grandes quantités d'une substance qui leur permettent de se fixer solidement à l'hôte : le ciment. Ceci leur permet de prolonger leur période d'alimentation sur plusieurs jours. Ces tiques se nourrissent lentement, et une nouvelle cuticule est synthétisée pour accueillir l'énorme repas de sang (les tiques dures peuvent multiplier leur poids par 100). L'excès d'eau est également extrait vers l'hémolymphe et les glandes salivaires, et est sécrété à nouveau dans l'hôte.

Pour réussir le repas sanguin, les tiques ont développé différents mécanismes par l'intermédiaire de leur salive qui inhibent l'hémostase de l'hôte. Les tiques doivent également maintenir le flux sanguin et prévenir ou minimiser la douleur, l'inflammation, les démangeaisons et le rejet immunitaire de l'hôte vertébré (Francischetti *et al.*, 2009).

## C. Reproduction

Les tiques présentent plusieurs stratégies différentes pour réguler leur activité de reproduction.

Chez les tiques Argasidae, la gamétogenèse commence pendant la dernière mue nymphale et les adultes sont directement sexuellement matures. Les tiques Argasidae femelles pondent quelques centaines d'œufs après chaque repas, mais sont capables de plusieurs cycles d'alimentation, d'accouplement et de ponte. Dans la plupart des cas, la reproduction coïncide avec les périodes où les hôtes sont disponibles, et les conditions environnementales favorables ce qui favorise une expansion rapide de la population de tiques (Sonenshine et Roe, 2013).

Chez les Ixodidae Prostriata, la gamétogenèse est initiée pendant la période d'entrée en mue par la nymphe. Lorsque les adultes émergent des exuvies nymphales, l'accouplement peut avoir directement lieu.

Chez les Ixodidae Metastrata, les adultes qui viennent de muer sont sexuellement immatures. La gamétogenèse est initiée pendant le repas sanguin, et l'accouplement ne se produit que lorsque la tique se nourrit sur un hôte vertébré. La copulation et l'insémination induisent de profonds changements chez les femelles Metastrata, notamment un gorgement rapide et la synthèse des substances nécessaires à la production des œufs (Sonenshine et Roe, 2013). La ponte n'a lieu qu'après l'accouplement, le gorgement et la chute de la tique de son hôte. Les femelles accouplées pondent des milliers d'œufs (entre 2 000 et 10 000) en une seule ponte, et la femelle meurt ensuite. Les mâles, eux, peuvent se nourrir et s'accoupler plusieurs fois.

### **III. ÉCOLOGIE**

La plupart des tiques Argasidae sont nidicoles (endophiles) et vivent dans des nids, des terriers, des grottes ou tout autre abri utilisés par leurs hôtes. Elles peuvent aussi se cacher à proximité.

La plupart des tiques Ixodidae sont exophiles c'est-à-dire qu'elles vivent dans des environnements ouverts tels que les forêts, les broussailles, les savanes, les prairies... Elles s'abritent dans la litière de feuilles, dans la végétation en décomposition (humus) ou s'enterrent dans le sable ou sous le gravier et les pierres.

#### **A. Les tiques dans l'environnement**

Les espèces exophiles vivent sur la végétation et se placent à l'affût sur la partie émergente de la végétation (par exemple, les brins d'herbe ou les tiges ligneuses le long des routes ou des sentiers dans les prairies et les bois), où elles attendent le passage d'un hôte. Cette stratégie est liée à leur besoin de limiter la perte d'eau par évaporation. Ainsi dans un microclimat humide, elles peuvent reconstituer leur eau corporelle. Elles peuvent également réaliser plusieurs cycles de réhydratation au niveau du sol avant de se poster de nouveau à l'affût, cette stratégie est particulièrement employée par *Ixodes ricinus* (Sonenshine et Roe, 2013; McCoy et Boulanger, 2015).

Certaines tiques sont attirées par le CO<sub>2</sub>, l'ammoniac et d'autres substances odorantes. Elles sortent de leur abri et cherchent activement leurs hôtes : cette stratégie est appelée stratégie de chasse. Par exemple, *Hyalomma dromedarii* est cachée dans le sable ou sous des pierres, et est stimulée par l'arrivée de ses hôtes principaux, les chameaux.



Dans de nombreuses régions tempérées avec un climat continental, les tiques cessent leur activité (c'est le phénomène de diapause) et passent l'hiver dans la végétation en décomposition, les fissures et crevasses du sol où elles peuvent s'abriter du gel. Les individus survivants émergent au printemps suivant pour reprendre leur recherche d'hôte. En climat océanique, elles sont actives toute l'année (Farkas *et al.*, 2013; Sonenshine et Roe, 2013).

Les tiques nidicoles (endophiles) présentent des comportements très différents de ceux des espèces non nidicoles. La plupart sont des tiques Argasidae, mais certaines appartiennent aux Ixodidae Prostriata. Elles s'abritent dans les nids et terriers de leurs hôtes préférentiels ou à proximité. Elles y sont exposées à une plus grande humidité et à des conditions environnementales moins extrêmes que les tiques exophiles.

## **B. Spécificité d'hôtes**

La plupart des tiques sont spécifiques d'hôtes, à des degrés divers de spécificité. Certaines parasitent néanmoins un large éventail d'hôtes, ces tiques sont les plus à même de piquer l'homme. Par exemple les tiques appartenant au complexe d'espèces *I. ricinus* se nourrissent facilement sur des lézards, des oiseaux, des petits mammifères et sur des hôtes plus grands comme les moutons, les suidés et les cervidés. Plus de 300 espèces de vertébrés ont été rapportées comme hôte d'*I. ricinus* (Gern et Humair, 2002).

Néanmoins, beaucoup sont inféodées à un groupe spécifique de vertébrés (par exemple, les tiques *Argas vespertilionis* qui se nourrissent uniquement sur chauves-souris, ou les Ixodidae comme *Rhipicephalus microplus* qui se nourrit uniquement sur de grands ruminants). La plupart des espèces nidicoles ont une grande spécificité d'hôte.

## **IV. PRINCIPALES ESPECES D'INTERET EN EUROPE**

Une quarantaine d'espèces de tiques sont présentes sur le territoire français métropolitain, et près de 70 espèces sont répertoriées en Europe et sur le pourtour méditerranéen. Le genre *Ixodes* sera particulièrement détaillé dans cette partie, puisque le travail d'identification présenté dans cette thèse y fait référence. Les autres espèces d'intérêt seront présentées sous forme d'un tableau (Tableau 2)

### **A. Le genre *Ixodes***

C'est le genre de la famille des Ixodidae qui contient le plus d'espèces (près de 250). La distribution des espèces du genre *Ixodes* est ubiquitaire : elles sont présentes sur tous les continents, y compris l'Antarctique (Guglielmone et Robbins, 2018).

Les espèces les plus importantes sur le plan médical et vétérinaire font partie d'un complexe d'espèce, le complexe *I. ricinus* (aussi appelé par certains auteurs complexe *I. persulcatus* ou *I. ricinus/persulcatus*). Les espèces composants ce complexe sont : *I. scapularis* et *I. pacificus* en Amérique du Nord, *I. ricinus* en Europe, en Asie occidentale et sur la côte méditerranéenne de l'Afrique du Nord et *I. persulcatus* en Europe du Nord-Est et en Asie du Nord.

En Eurasie, compte tenu de leur rôle de vecteurs de pathogènes zoonotiques parmi les hôtes naturels, d'autres espèces sont importantes sur le plan médical et épidémiologique. Il s'agit de *I. hexagonus* (présent uniquement en Europe), *I. frontalis*, *I. trianguliceps* et *I. uriae* (Guglielmone et Robbins, 2018). Parmi toutes les espèces d'*Ixodes*, environ 80 % parasitent les mammifères et 20 % les oiseaux (Farkas *et al.*, 2013).

Parmi les espèces de ce genre, les deux types de comportements de recherche d'hôtes sont représentés (le comportement endophile et le comportement exophile). Les tiques endophiles restent près ou dans le nid ou terrier de leur hôte et ne s'attachent à celui-ci qu'à son arrivée. Il est donc moins probable que ces tiques piquent l'homme. *A contrario*, les tiques exophiles recherchent des hôtes en grim pant sur la végétation en attendant leur passage, elles sont dites à l'affût de l'hôte.

### **B. Le complexe *Ixodes ricinus***

Au sein du genre *Ixodes*, Keirans *et al.* (1999) ont défini le complexe *I. ricinus* basé sur des critères morphologiques. Ce complexe présente une importance majeure sur le plan médical. En effet, il comprend les vecteurs de plusieurs agents infectieux zoonotiques, notamment ceux qui causent l'encéphalite à tiques, la maladie de Lyme, l'anaplasmose granulocytaire humaine et la babésiose humaine. Keirans *et al.* (1999) ont postulé que ce groupe était monophylétique du fait de la similitude morphologique des membres du complexe *I. ricinus* et du fait également de la capacité de ces

membres à transmettre les bactéries du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl). Pour les auteurs, cela implique que la compétence vectorielle de ces tiques n'a pas évolué en une fois (Xu *et al.*, 2003). Cependant, les données de séquençage de l'ADNr 16S mitochondrial pour 11 espèces de ce complexe, analysées par Xu *et al.*, (2003) montre que ce groupe est paraphylétique, c'est-à-dire qu'il ne contient pas tous les descendants d'un ancêtre commun (Aubert, 2015) mais qu'il contient 4 clades. Cela tend à prouver que l'acquisition de la capacité à transmettre les agents de la borréliose chez les espèces d'*Ixodes* peut avoir des origines multiples. Cette dernière hypothèse semble plus robuste puisque des espèces du complexe *ricinus* sont présentes dans des régions où aucune espèce du complexe *B. burgdorferi* sl n'a été décrite. *A contrario*, certaines espèces ne faisant pas partie du complexe sont connues pour être vectrice de *B. burgdorferi* sl (par exemple *I. hexagonus* (Eisen, 2020)).

Le groupe *I. ricinus* contenait initialement 14 espèces (Keirans *et al.*, 1999) : *I. affinis*, *I. jellisolli*, *I. pacificus*, *I. scapularis*, *I. pararicinus*, *I. gibbosus*, *I. hyatti*, *I. kashmiricus*, *I. kazakstani*, *I. nipponensis*, *I. nuttallianus*, *I. pavlovskyi*, *I. persulcatus*, et *I. ricinus*. Trois ont été ajoutées suite à l'analyse de Xu *et al.*, 2003 il s'agit de : *I. muris*, *I. minor* et *I. granulatus*. *I. inopinatus*, décrite en 2014, est une espèce de tique phylogénétiquement proche d'*I. ricinus* (Estrada-Peña *et al.*, 2014). Parmi ces espèces, *I. affinis*, *I. jellisolli*, *I. hyatti*, *I. nuttallianus* et *I. minor* n'ont pas été rapportées comme piquant l'homme (Guglielmone et Robbins, 2018).

Seules 4 sont présentes sur le territoire européen, il s'agit d'*I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. gibbosus*, *I. inopinatus*. En Amérique du Sud : *I. pararicinus* et *I. affinis* sont décrites. *I. jellisolli* est présente en Californie. *Ixodes pacificus* et *I. scapularis* sont les deux vecteurs majeurs des bactéries du complexe *B. burgdorferi* sl respectivement sur la côte Ouest et Est de l'Amérique du Nord. *I. muris* est décrite au Canada et sur la côte Est des États-Unis et *I. minor* dans les forêts tempérées de conifères de Floride. *I. hyatti* et *I. nuttallianus* sont décrites au Népal, au Sud de la Chine et au Tibet. *I. kashmiricus* est présente au Kashmir et au Kirghizstan. *I. pavlovskyi* et *I. nipponensis* sont présents sur la partie orientale de la Russie et au Japon. Enfin, *I. granulatus* est présent en Asie du Sud-Est et en Australie (Keirans *et al.*, 1999; Guglielmone *et al.*, 2014; Guglielmone et Robbins, 2018).

## 1. *Ixodes ricinus*

*I. ricinus* est sans aucun doute l'espèce de tique européenne la plus connue et la plus étudiée. C'est l'espèce la plus commune en Europe de l'Ouest et l'une des plus largement répandues. C'est également une espèce vectrice de nombreux agents infectieux en Europe (Petney *et al.*, 2012).

*I. ricinus* est une espèce de tique qui évolue classiquement en trois stases (espèce triphasique) (Figure 8). Son cycle de vie dure de 2 à 3 ans, mais dans certaines régions où les conditions climatiques le permettent, elle est active toute l'année et son cycle de vie est plus court (Dantas-Torres et Otranto, 2013a). *I. ricinus* peut présenter un schéma temporel unimodal ou bimodal de saisonnalité (un ou deux pics d'activité pendant l'année). Cependant, dans la plupart des régions tempérées, elle présente un schéma bimodal avec des adultes et des nymphes atteignant un pic de présence au printemps et à l'automne. Quant aux larves, elles émergent au début de l'été (Dantas-Torres et Otranto, 2013a). Dans certaines régions, *I. ricinus* peut également présenter un schéma saisonnier différent, comme dans le sud de l'Italie, où les tiques peuvent être présentes toute l'année, avec des pics de population au printemps, en automne et même en hiver (Dantas-Torres et Otranto, 2013a).

Très schématiquement, les larves et les nymphes se nourrissent généralement sur des petits mammifères, d'oiseaux et de lézards, tandis que les adultes préfèrent les grands mammifères, comme les bovins et les cerfs (Medlock *et al.*, 2013). Cependant, toutes les stases peuvent coexister sur un seul hôte. Plus de 300 espèces de vertébrés ont été rapportées comme hôte d'*I. ricinus* (Gern et Humair, 2002).

*I. ricinus* est une espèce de tique exophile, que l'on trouve couramment dans les forêts mixtes de feuillus et de conifères et dans les forêts. Cette espèce est sensible aux conditions climatiques et dépend d'un microclimat humide. Elle ne tolère pas une chaleur excessive et la dessiccation (Pérez-Eid, 2007). Ainsi, *I. ricinus* a besoin d'une humidité relative d'au moins 80 % pour survivre pendant la période hors de son hôte. Sa répartition est donc limitée aux zones de précipitations modérées à fortes avec une végétation qui conserve une humidité élevée (Medlock *et al.*, 2013).

*Ixodes ricinus* est une espèce largement répandue dans la région paléarctique occidentale. Elle est présente du Royaume-Uni à l'Ouest jusqu'à la Turquie à l'Est, et du sud de la Finlande au Nord jusqu'au Sud de l'Italie et à certaines parties de l'Afrique du Nord au Sud (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Plusieurs données semblent corroborer qu'une modification de l'aire de répartition d'*I. ricinus* semble avoir lieu. En effet, cette espèce semble étendre son territoire vers le Nord d'une part et d'autre part en altitude dans les régions plus sèches (Jaenson et Lindgren, 2011; Jaenson *et al.*, 2012).

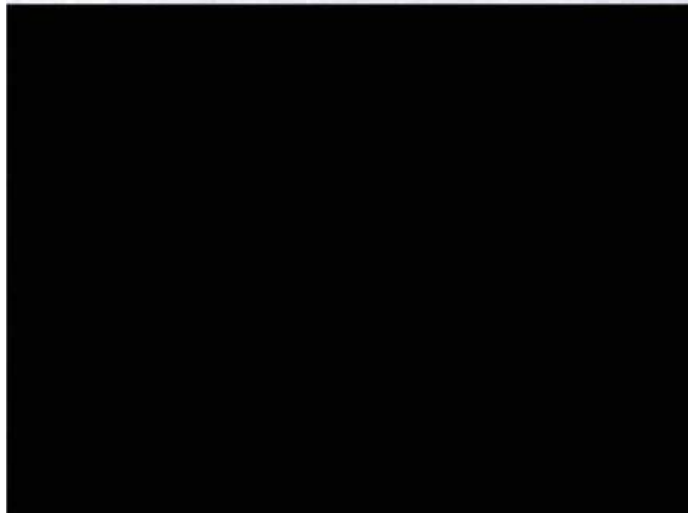


Figure 8 : Les trois stases de la tique *I. ricinus* (de gauche à droite : femelle, nymphe et larve) (crédit photo N. Boulanger)

## 2. *Ixodes persulcatus*

*I. persulcatus* est également une espèce de tique triphasique, qui se nourrit sur différentes espèces animales, allant des reptiles aux oiseaux en passant par les mammifères (Figure 9). Les larves et les nymphes se nourrissent préférentiellement sur de petits et moyens mammifères ainsi que sur des oiseaux. Les femelles parasitent plutôt les grands mammifères, tels que les cerfs, les bovins, les moutons ou les lièvres (Gray, 1998). Contrairement à *I. ricinus*, pour laquelle la stase nymphale constitue un risque plus important pour l'homme, les femelles adultes *I. persulcatus* piquent l'homme et les nymphes le piquent rarement (Estrada-Peña et Jongejan, 1999; Korenberg *et al.*, 2002).

*I. persulcatus* est une espèce de tique exophile, à l'affût sur la végétation. Tout comme *I. ricinus* pendant les phases libres, celle-ci est vulnérable à la dessiccation. *I. persulcatus* a besoin d'habitats avec une couverture végétale dense et un tapis de feuilles mortes, pour que l'humidité relative soit supérieure à 80 %, y compris pendant l'été (Gray, 1998). *I. persulcatus* est présente dans plusieurs écorégions, associée aux forêts de feuillus et d'épicéas et aux forêts mixtes (Guglielmone *et al.*, 2014). Plusieurs variations dans l'activité de cette espèce de tique ont été enregistrées (début de l'activité plus ou moins tôt dans l'année/fin d'activité plus ou moins tard) en fonction des conditions météorologiques et de végétation (Korenberg, 2000). L'activité des stases immatures atteint un pic à la fin du printemps ou au début de l'été, généralement 10 à 20 jours plus tard que celle des tiques adultes (Korenberg, 2000).

*I. persulcatus* est l'espèce de tique la plus commune en Europe du Nord-Est et en Asie du Nord. Elle a notamment été signalée en Chine, en Estonie, au Japon, en Corée, au Kirghizstan, en Lettonie, en Lituanie, en Pologne, en Russie, en Slovaquie et en Turquie. Elle est occasionnellement introduite en Europe occidentale et septentrionale par des oiseaux migrant au printemps (Petney *et al.*, 2012).

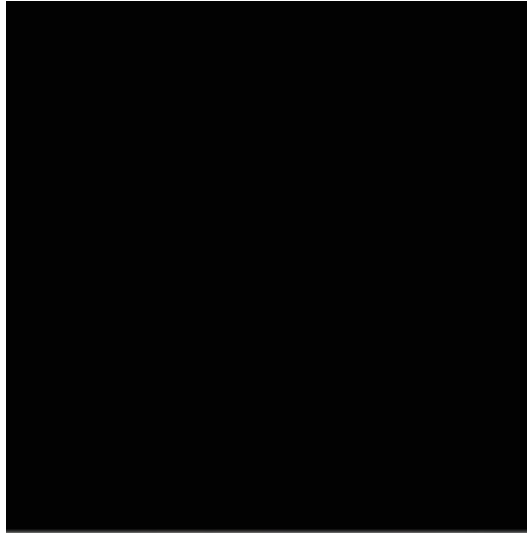


Figure 9 : Femelle *I. persulcatus* (Crédit photo : Bristol University Tick ID)

### 3. *Ixodes gibbosus*

*I. gibbosus* est une espèce relativement commune mais peu connue et jusqu'à présent signalée dans certaines parties du bassin méditerranéen. C'est une espèce proche d'*I. ricinus* et d'*I. persulcatus*, mais elle est distribuée dans des zones considérées comme trop chaudes et sèches pour *I. ricinus* qu'elle remplace dans plusieurs pays méditerranéens.

*I. gibbosus* est elle aussi une espèce de tique exophile triphasique. Son cycle semble plus court que celui d'*I. ricinus*, en raison de la température plus élevée des régions où elle est présente.

Cette espèce de tique est active pendant l'hiver et le printemps. Les bovins, les moutons, les chèvres, les chiens et les ongulés sauvages peuvent être parasités par cette espèce de tique. Des oiseaux passereaux ont été décrits comme hôtes des stases immatures. Elle a été trouvée sur l'homme, mais il n'existe actuellement aucune étude sur d'éventuels microorganismes transmis par cette espèce de tique (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

### 4. *Ixodes inopinatus*

*I. inopinatus* a été décrite à partir de spécimens collectés en Espagne, au Portugal, en Allemagne, au Maroc et en Tunisie, en 2014 (Estrada-Peña *et al.*, 2014). Elle n'a pas été officialisée comme membre du complexe *I. ricinus*, mais est très proche phylogénétiquement d'*I. ricinus* (Estrada-Peña *et al.*, 2014). Depuis sa description initiale, cette espèce a également été collectée régulièrement en Allemagne (Chitimia-Dobler *et al.*, 2018; Hauck *et al.*, 2019). Elle ne possède que peu de caractères morphologiques différents avec *I. ricinus* (Figure 10).

*I. inopinatus* est une espèce de tique exophile. Les seuls hôtes enregistrés pour les immatures sont les lézards de plusieurs espèces. Des adultes ont été trouvés sur des renards roux et sur des moutons (Estrada-Peña *et al.*, 2014).

Cette espèce de tique est triphasique et semble partager les mêmes écosystèmes qu'*I. ricinus* (Chitimia-Dobler *et al.*, 2017; Hauck *et al.*, 2019). Elle a également été trouvée porteuse de l'ADN de *B. burgdorferi* sl, *Rickettsia* spp et *Anaplasma phagocytophilum* (Hauck *et al.*, 2019). Elle est morphologiquement très semblable à *I. ricinus* (Figure 10).

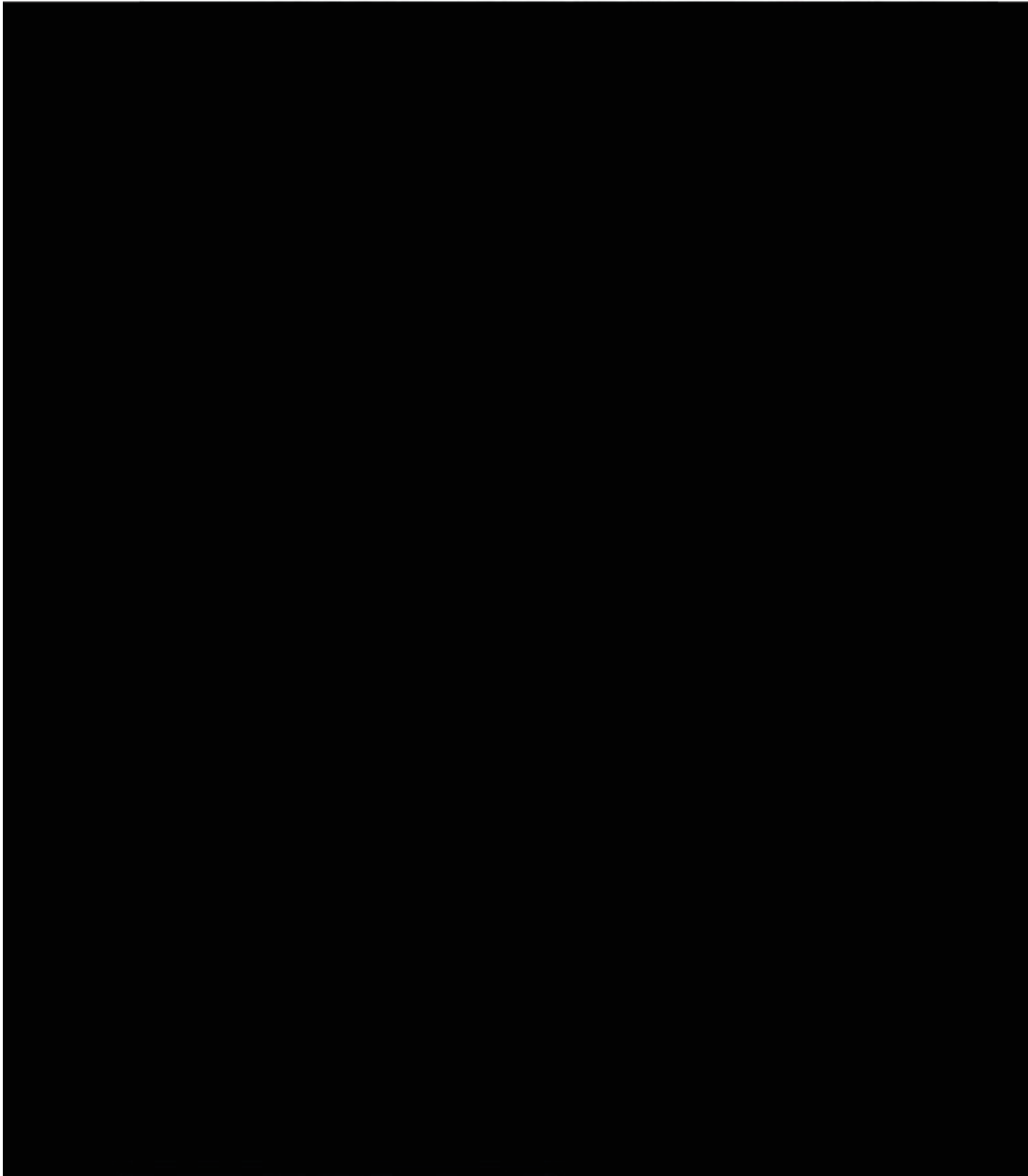


Figure 10 : Différences entre *I. inopinatus* (A) et *I. ricinus* (B) d'après Chitimia-Dobler *et al.*, (2019).

- En I, on note la large insertion de l'éperon coxal chez *I. inopinatus*.
- En II, la forme du sillon anal en V chez *I. inopinatus* et en U chez *I. ricinus* ainsi que la forme différente des stigmates.
- En III, une seule rangée de soies sur les marges latérales du conscutum chez *I. inopinatus* contre plusieurs chez *I. ricinus*.

## C. Autres *Ixodes* spp. en Europe

Parmi les espèces ne faisant pas partie du complexe *I. ricinus*, nous avons choisi de détailler les espèces que nous avons testé et inclus dans notre base de données d'identification par MALDI-TOF (cf. article n° 1 Boyer *et al.*, 2019a).

### 1. *Ixodes hexagonus*

*I. hexagonus* est une espèce endophile typique triphasique (Figure 11), avec un cycle de vie de 1 à 2 ans. C'est un parasite des hérissons (*Erinaceus* spp.), ses autres hôtes étant principalement des mammifères carnivores des familles *Canidae*, *Mustelidae* et *Felidae*. Cette espèce de tique a été signalée à plusieurs reprises chez l'homme (Estrada-Peña et Jongejan, 1999).

*I. hexagonus* est une espèce de tique présente dans toute l'Europe. On la trouve partout où se trouvent ses hôtes, à diverses altitudes (Harris et Thompson, 1978). Elle a été signalée en Europe occidentale, centrale et méridionale, y compris en Irlande, au Royaume-Uni, en Norvège, en Suède, en Pologne, au Portugal, en Espagne, en Italie, en Grèce, en Roumanie et en Ukraine (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Elle ne présente pas de saisonnalité, mais les femelles sont plus fréquemment observées en été (Pfäffle *et al.*, 2011). Les larves et les nymphes sont actives toute l'année, sans pic d'activité spécifique (Pfäffle *et al.*, 2011). Cette espèce a développé des adaptations spécifiques à son comportement endophile, la plupart des individus se détachant de leurs hôtes le soir et tôt le matin, augmentant ainsi les chances de rester dans le nid (Matuschka *et al.*, 1990). Elle peut se trouver en grand nombre sur des hôtes sensibles et provoquer une anémie (Harris et Thompson, 1978; Pfäffle *et al.*, 2011). Bien qu'elle soit majoritairement présente en grande quantité dans les terriers et nids de ses hôtes, elle peut être quand même collectée au drapeau<sup>1</sup> mais rarement (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

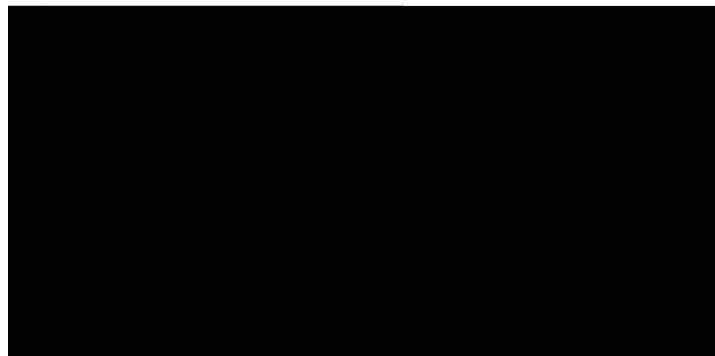


Figure 11 : *I. hexagonus* femelle (A) et male (B) (crédit photo : Bristol University Tick ID)

<sup>1</sup> La collecte au drapeau est la méthode la plus pratiquée pour collecter des tiques des tiques dites à l'affût. Cette méthode consiste à tirer un drap blanc d'1m<sup>2</sup> sur 10 m et comptabiliser les tiques qui s'y sont accrochées. Cette technique permet également d'estimer la densité en tique (nombre de tique/m<sup>2</sup>). Les autres méthodes pour collecter des tiques sont : la collecte sur animaux et les pièges à CO<sub>2</sub> (méthode utilisée pour les tiques ayant un comportement de recherche active de leur hôte).



## 2. *Ixodes uriae*

*I. uriae* est une espèce de tique triphasique (Figure 12). Toutes les stases se nourrissent sur des oiseaux de mer, y compris les familles des *Spheniscidae* (pingouins), des *Diomedeidae* (albatros) et des *Procellariidae* (pétrels) (Dietrich *et al.*, 2011). Il s'agit de l'espèce de tique la plus commune sur les oiseaux de mer (Mccoy *et al.*, 2001). On la trouve à proximité ou dans les zones de nidification de ces oiseaux de mer.

Cette espèce présente une tolérance thermique extrêmement large, allant de -30 à +40 °C (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

*I. uriae* a une distribution comprenant des zones tempérées froides et polaires, dans les régions afrotropicales, australasiennes, néarctiques, néotropicales et paléarctiques, y compris les îles de l'Océanie (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

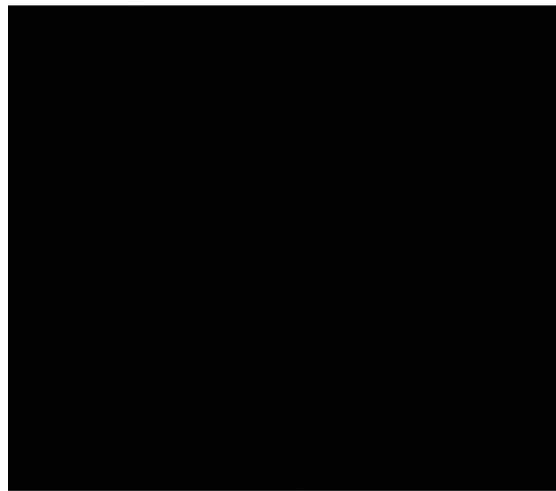


Figure 12 : *I. uriae* male (crédit photo : Bristol University Tick ID)

## 3. *Ixodes frontalis*

*I. frontalis* est une espèce de tique exophile, triphasique, dont le cycle de vie est d'un an dans son environnement naturel (Monks *et al.*, 2006). Toutes les stases de son cycle de vie infestent diverses espèces d'oiseaux (Heylen *et al.*, 2014). Il s'agit principalement de passereaux, mais aussi d'ansériformes, de fauconiformes, de galliformes et de strigiformes (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Cette espèce de tique a été signalée comme piquant les humains, mais cela semble très rare (Gilot *et al.*, 1997).

Elle se trouve principalement dans les nids d'oiseaux et la végétation de sous-bois (Obsomer *et al.*, 2013). En de rares occasions, elle peut être collectée au drapeau (Gilot *et al.*, 1997). Elle est présente dans une grande variété d'habitats, tels que les forêts de feuillus, les forêts mixtes sur les côtes atlantiques, les forêts alpines de conifères, les forêts mixtes et les hêtraies de plaines

(Guglielmone *et al.*, 2014). Elle peut être introduite dans différentes zones climatiques par la migration des oiseaux. Cependant, elle préfère les régions climatiques plus douces (Poupon *et al.*, 2006). L'activité maximale des tiques adultes se situe pendant les mois d'hiver, d'octobre à février, et pour les stases immatures, de mars à octobre (Agoulon *et al.*, 2019).

Cette espèce de tique est largement répandue en Europe, en Asie occidentale et en Afrique du Nord. Cependant, elle est plus commune en Europe du Sud et en Europe centrale (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

Comme cette espèce de tique est inféodée aux oiseaux, elle ne semble pas jouer un rôle majeur dans la transmission directe des microorganismes aux humains. Cependant, son importance réside dans le maintien des agents infectieux dans un cycle oiseau-tique-oiseau assurant la dissémination des microorganismes vectorisés par les tiques dans le monde par les oiseaux migrateurs. Elle est associée à différents arbovirus, notamment le virus de l'encéphalite à tiques. Différentes espèces de *Borrelia* ont été trouvées dans cette espèce de tique, notamment *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. turdi*. Sa compétence vectorielle pour ces bactéries n'est pas élucidée (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

#### 4. *Ixodes acuminatus*

*I. acuminatus* est une espèce de tique endophile à trois hôtes (Pérez-Eid, 2007) (Figure 13). On la trouve principalement sur les petits mammifères, y compris les insectivores et les rongeurs, mais elle peut également se nourrir sur des hôtes de taille moyenne, tels que les hérissons (Estrada-Peña *et al.*, 2017). L'homme peut être piqué (Guglielmone et Robbins, 2018). Bien qu'*I. acuminatus* soit une espèce nidicole, elle peut occasionnellement être prélevée dans la végétation au drapeau (Petney *et al.*, 2015).

Une étude réalisée en France a montré que *I. acuminatus* est limitée aux zones dans lesquelles la température moyenne en janvier n'est pas inférieure à 0 °C. Elle est donc absente de certaines régions comme l'est de la France, les Alpes du Nord et les Pyrénées centrales. On peut la trouver sur ses hôtes tout au long de l'année, mais l'activité maximale des nymphes et des adultes se situe au printemps et celle des larves en été (Guglielmone *et al.*, 2014). *I. acuminatus* a aussi été décrite en Allemagne dans des conditions climatiques où elle n'a pas été observée en France (Petney *et al.*, 2015). Plusieurs microorganismes potentiellement pathogènes ont été décrits chez *I. acuminatus*, cependant il n'existe pas de preuve de sa compétence vectorielle. Elle pourrait jouer un rôle dans le maintien des cycles de *B. afzelii* (Szekeress *et al.*, 2015).

La position d'*I. acuminatus* est actuellement discutée, puisqu'une espèce semblable à cette dernière, *I. redikorzevi*, est décrite. L'aire de répartition d'*I. acuminatus* est donc variable si

*I. redikorzevi* est considérée comme synonyme d'*I. acuminatus*. En effet, *I. redikorzevi* est décrite en Europe de l'Est, en Chine, en Méditerranée orientale et au Moyen-Orient (Petney *et al.*, 2015). *I. acuminatus* est distribuée en Europe tempérée et méditerranéenne, notamment en Belgique, en France, en Allemagne, dans le sud-ouest du Royaume-Uni, en Hongrie, en Italie, au Portugal et en Espagne (Petney *et al.*, 2015; Estrada-Peña *et al.*, 2017).

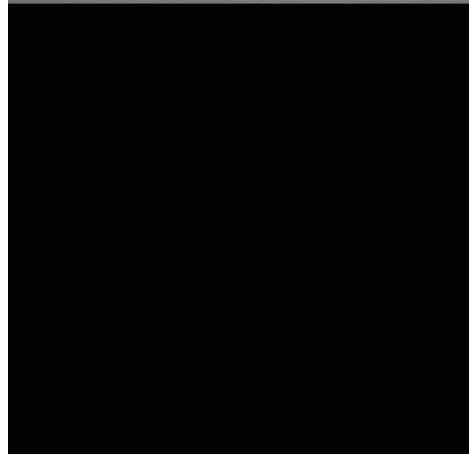


Figure 13 : *I. acuminatus* femelle (crédit photo : Bristol University Tick ID)

## 5. *Ixodes ventalloi*

*I. ventalloi* est une espèce de tique endophile, vivant dans le nid de son hôte principal le lièvre. Cette espèce est principalement un parasite du lièvre européen. Cependant, on peut aussi la trouver occasionnellement sur différents carnivores (belette, le lynx ibérique, le renard...) ainsi que sur des oiseaux et sur des hérissons. Elle a été décrite comme pouvant piquer l'homme (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

On trouve cette espèce dans la région paléarctique notamment en Afrique du Nord, dans la péninsule ibérique et dans le sud de la France. Elle a été signalée à Chypre, en France, au Royaume-Uni, en Italie, au Portugal et en Espagne (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

## 6. *Ixodes vespertilionis*

*I. vespertilionis* est une espèce endophile de tique à trois hôtes (Figure 14), qui parasite les chauves-souris. Son cycle de développement est très particulier puisqu'elle se nourrit exclusivement pendant les périodes d'hibernation des chauves-souris. Pendant la première moitié de l'hibernation des chauves-souris (octobre-janvier), on peut observer un nombre croissant de larves, nymphes et femelles en quête d'un repas sanguin (Arthur, 1956).

Les larves éclosent au début du mois d'avril, après 10 jours de maturation et peuvent se gorger en 10 jours avant la fin de l'hibernation des chauves-souris. Les nymphes interrompent leur développement et attendent que les chauves-souris retournent dans leurs grottes à partir d'octobre,

puis se nourrissent. Après une longue pause (5 mois), les adultes sortent en mars, et les femelles ont encore la possibilité de se nourrir (généralement pendant environ 16 jours) avant la fin de l'hibernation des chauves-souris (Estrada-Peña *et al.*, 2017). De façon accidentelle, *I. vespertilionis* peut piquer l'homme (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

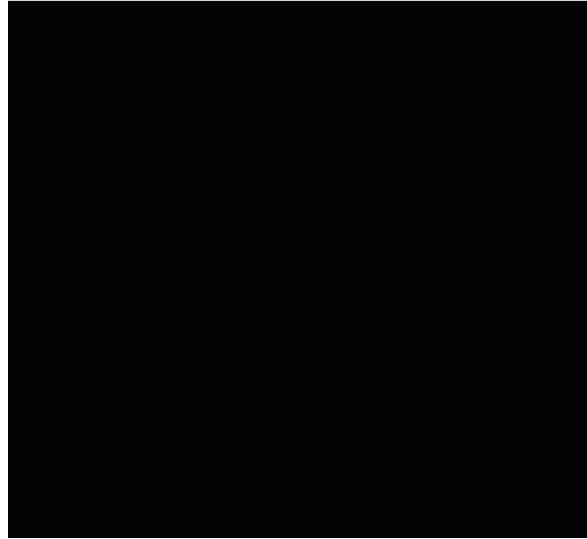


Figure 14 : *I. vespertilionis* femelle ((crédit photo : Bristol University Tick ID)

## **V. LES AUTRES ESPECES DE TIQUES D'INTERET EN EUROPE**

Aux côtés d'*I. ricinus*, d'autres espèces ont une importance en médecine vétérinaire ou humaine. Les espèces de tiques d'intérêt trouvées sur le continent Européen sont présentées dans le Tableau 2

Espèce de tique	Particularité du cycle de développement	Mode de vie	Hôte préférentiel	Distribution	Pique l'homme	Principaux micro-organismes associés	Effet du repas sanguin
<b>Argasidae</b>							
<i>Argas persicus</i>	jusqu'à 4 stades nymphaux	endophile	Oiseaux domestiques galliformes, canard et oies	Mondiale	Oui (Rare)	<i>Borrelia anserina</i>	Paralyse du poulet
<i>Argas reflexus</i>	2 à 4 stades nymphaux	endophile	Pigeon	Mondiale (urbaine)	Oui	<i>Borrelia anserina</i>	Allergie/Choc anaphylactique
<i>Ornithodoros (Alectorobius) capensis</i>	-	endophile	Oiseaux	Mondiale	Oui (Rare)*	Virus soldado	-
<i>Ornithodoros (Alectorobius) coniceps</i>	3 à 6 stades nymphaux	endophile	Pigeons	Palearctique et Afrotropicale	Oui (Rare)*	Virus West Nile ?	Œdèmes, douleurs, frissons, fièvre
<i>Ornithodoros (Alectorobius) maritimus</i>	-	endophile	Oiseaux de mer	Europe occidentale et Afrique du nord-ouest	Oui (Rare)*	Virus soldado	-
<i>Ornithodoros erraticus</i> complexe	-	endophile	Divers vertébrés à sang chaud, dont les ongulés, des micromammifères carnivores et insectivores, les rongeurs	Péninsule ibérique, Afrique du Nord et de l'Ouest et Asie occidentale	Oui	<i>Borrelia</i> de fièvres récurrentes ( <i>B. hispanica</i> et <i>B. crocidurae</i> )	-

Espèce de tique	Particularité du cycle de développement	Mode de vie	Hôte préférentiel	Distribution	Pique l'homme	Principaux micro-organismes associés	Effet du repas sanguin
<b>Ixodidae</b>							
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Triphasique	exophile	Immatures : petits mammifères, lièvres, hérissons, oiseaux, lézards Adultes : ongulés sauvages et domestiques, en particulier de bovins, d'ovins et de caprins	Région paléartique	Oui	Virus TBE** et CCHF <i>Babesia</i> spp	Paralysie des ovins
<i>Haemaphysalis concinna</i>	Triphasique	exophile	Immatures : grande variété de petits et moyens mammifères et d'oiseaux Adultes : ongulés sauvages et domestiques, de carnivores, tels que les renards et les chiens, et d'insectivores de taille moyenne	Eurasie	Oui	Virus TBE** <i>Babesia</i> spp <i>R. sibirica sibirica</i>	-
<i>Hyalomma marginatum</i>	Diphonique	exophile	Immatures : petits mammifères (léporidés et insectivores) et oiseaux Adultes : grande variété de mammifères, principalement des ongulés sauvages et domestiques, en particulier des bovins	Sud du Paléarctique (aire de répartition en augmentation)/Saharo-Arabique	Oui	Virus CCHF <i>Rickettsia aeschlimannii</i> <i>Babesia</i> spp, <i>Theileria</i> spp	-
<i>Hyalomma anatolicum</i>	Di ou Triphasique (possibilité d'être monophonique)	endophile	Toutes les stades de développent sur des grands ongulés (bovins, chevaux, chameaux, moutons et chèvres)	Saharo-Arabique, Sud du Paléarctique, Sino-Japonaise, Oriental et Afrotropicale	Oui	Virus CCHF <i>Rickettsia aeschlimannii</i> <i>Babesia</i> spp, <i>Theileria</i> spp	-
<i>Hyalomma excavatum</i>	Di ou Triphasique	exophile	Immatures : petits mammifères (léporidés et insectivores) Adultes : grands ongulés, en particulier les bovins, puis les chevaux, les chameaux, les moutons et les chèvres	Saharo-Arabique	Oui	<i>Rickettsia sibirica mongolotimonae</i> <i>Babesia</i> spp, <i>Theileria</i> spp	-
<i>Hyalomma scupense</i>	Mono ou diphonique	endophile	Grands ongulés (bovins, chevaux)	De l'Europe occidentale à la Chine orientale, y compris l'Afrique du Nord	Oui	Virus CCHF <i>Babesia</i> spp, <i>Theileria</i> spp	-
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Triphasique	endophile	Chien, éventuellement rongeurs et oiseaux	Saharo-Arabique, Sud du Paléarctique	Oui	<i>R. conorii</i> <i>Babesia</i> spp, <i>Theileria</i> spp, <i>H. canis</i>	-
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Triphasique	incertain	Oiseaux, Lagomorphes, Canidés, Félinés et Mustélinés	Paléarctique	Oui	<i>R. massiliae</i> , <i>R. conorii</i> <i>Babesia</i> spp, <i>Theileria</i> spp	-

<i>Rhipicephalus bursa</i>	Diphasique	incertain	Moutons, chèvres, bovins, chevaux, ânes et ongulés sauvages	Région méditerranéenne	Oui	<i>Babesia</i> spp <i>Theileria</i> spp <i>R. aeshlimanii</i> , <i>R. conorii</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. massiliae</i> et <i>R. sibirica</i>	-
<i>Rhipicephalus annulatus</i>	Monophasique	incertain	Bovins, mouton dans une moindre mesure les ongulés sauvages	Sud paléarctique, Asie de Sud Est Saharo-arabique	Oui	<i>Babesia bigemina</i> et <i>B. bovis</i> <i>Anaplasma marginale</i> <i>Rickettsia africae</i>	Tique invasive
<i>Dermacentor marginatus</i>	Triphasique	endophile (larve et nymphe) exophile adultes	Immatures : les rongeurs et les insectivores de taille petite à moyenne (musaraignes, taupes et hérissons), ainsi que les lagomorphes  Adultes : ongulés et carnivores	Paléarctique	Oui (au niveau du cuir chevelu)	Virus TBE** et CCHF  Virus CCHF Virus de la fièvre de Omsk <i>Rickettsia sibirica</i> , <i>R. slovaca</i>	-
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Triphasique	endophile (larve et nymphe) exophile adultes	Immatures : insectivores (musaraignes, taupes), lagomorphes  Adultes : les ongulés, les carnivores (en particulier les chiens) et les insectivores et lagomorphes de taille moyenne	Paléarctique	Oui (au niveau du cuir chevelu)	Virus TBE** et CCHF  Virus CCHF Virus de la fièvre de Omsk <i>Rickettsia sibirica</i> , <i>R. raoultii</i>	-

Tableau 2 : Principales espèces de tiques hors genre *Ixodes* d'après (Estrada-Peña et al., (2017)). ; \* Peuvent piquer l'homme s'il est proche des nids des oiseaux hôtes \*\* pour le virus TBE et *Dermacentor* et *Haemaphysalis* les données initiales proviennent d'un article princeps non-vérifiable

# TIQUES, MICROORGANISMES ET MALADIES

---

## I. TIQUES ET MICROORGANISMES

Les tiques sont susceptibles d'héberger un grand nombre de microorganismes dont beaucoup appartiennent à des phyla qui contiennent des bactéries pathogènes (Moutailler *et al.*, 2016) (*Borrelia*, *Rickettsia*, *Francisella*...). Il est donc légitime de s'interroger sur la possibilité que ce microorganisme soit susceptible de provoquer une maladie. Cependant il ne faut pas oublier que tout microorganisme appartenant à ces phyla n'est premièrement pas nécessairement transmis et deuxièmement ne présente pas forcément un caractère pathogène (Kahl *et al.*, 2002).

Depuis les années 1990, de nombreuses études se sont attachées à décrire de nouveaux microorganismes (Tijssse-Klasen *et al.*, 2014) en se basant sur le séquençage de fragments plus ou moins longs de gènes servant à la description d'espèces bactériennes : par exemple l'ADN ribosomique 16S pour de nombreuses bactéries, *Rickettsial* Outer-Membrane Protein B (RompB) pour les bactéries du genre *Rickettsia*, le gène codant la Glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) pour les *Borrelia* des fièvres récurrentes, le gène codant la protéine chaperonne GroEL... Les bactéries fréquemment rencontrées chez les tiques sont les bactéries des genres *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Ehrlichia* et *Wolbachia* (Schouls *et al.*, 1999). Un nombre croissant d'espèces de *Rickettsia* est également décrit (Parola *et al.*, 2005).

Ces microorganismes détectés dans les tiques sont distincts des agents pathogènes connus, mais présentent une parenté phylogénétique avec ces derniers. Par exemple, certaines bactéries appartenant au genre *Francisella* sont des pathogènes bien connus responsables de maladies, comme *F. tularensis* (Kingry et Petersen, 2014), alors que d'autres sont des endosymbiotes de tiques molles comme *Ornithodoros moubata* (Duron *et al.*, 2018). De façon analogue, la majorité des espèces appartenant au complexe *B. burgdorferi* s1 n'ont jamais été décrites en pathologie humaine (Stanek *et al.*, 2012).

Les microorganismes détectés dans les tiques peuvent avoir différentes implications à la fois pour la santé humaine et pour la tique. Comme évoqué précédemment, il n'a pas été démontré pour certains qu'ils pouvaient causer des pathologies chez l'homme. Les microorganismes non pathogènes détectés par les méthodes moléculaires chez les tiques comprennent les endosymbiotes de tiques (Bonnet *et al.*, 2017), les bactéries commensales et l'ADN résiduel de repas sanguins antérieurs (Pichon *et al.*, 2005; Nakao *et al.*, 2013). D'autres microorganismes comme des champignons peuvent être pathogènes pour la tique. La Figure 15 illustre ce dernier point.



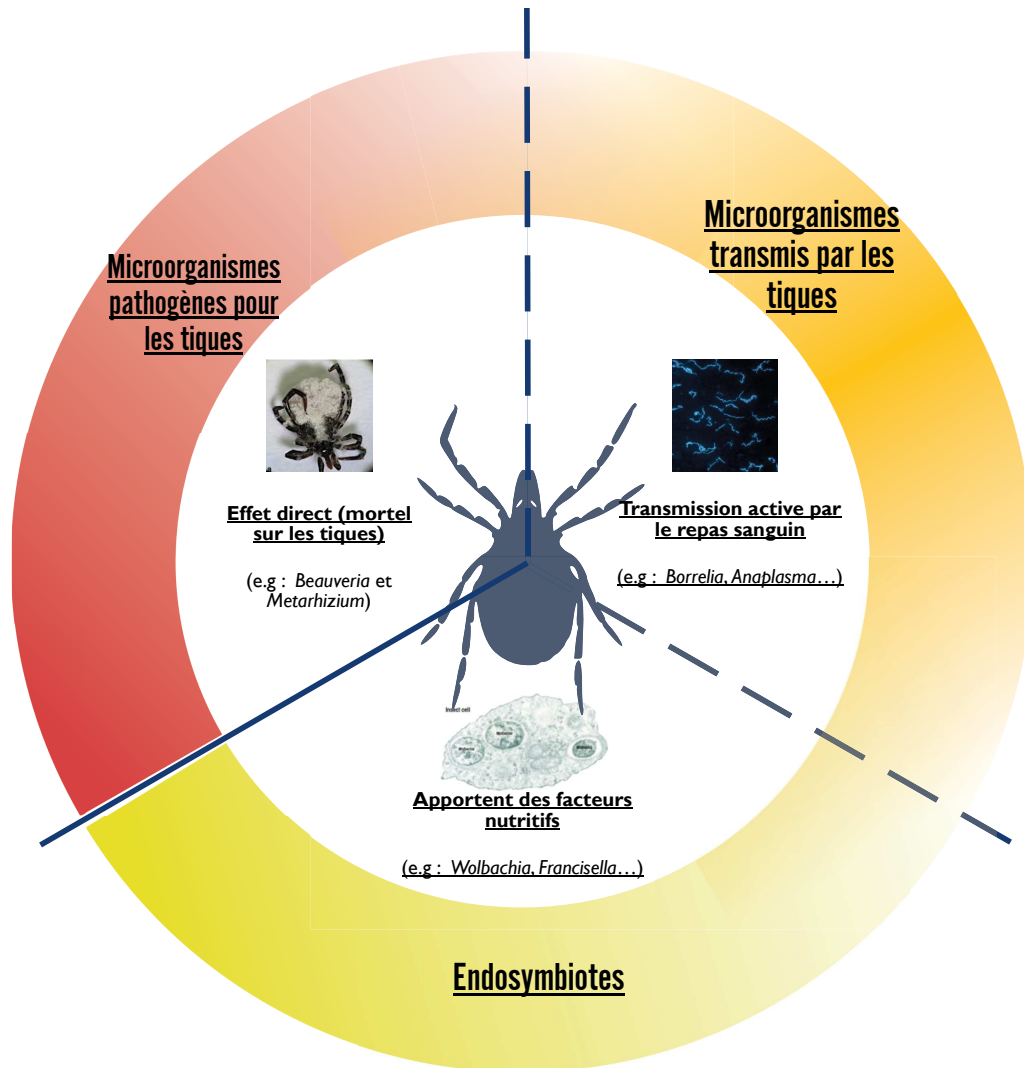


Figure 15 : Les différents microorganismes interagissant avec les tiques (d'après Duvallet *et al.*, (2018))

Ensuite, une gradation dans la pathogénicité entre les microorganismes peut être considérée. En effet, certains présentent un caractère opportuniste et sont pathogènes pour des patients présentant des comorbidités, particulièrement une immunodépression. C'est le cas de *B. miyamotoi* qui pour l'instant a principalement montré un pouvoir pathogène exacerbé chez l'immunodéprimé. En effet, si cette bactérie est à l'origine de syndromes fébriles chez des patients immunocompétents, elle a également été impliquée dans des méningoencéphalites chez des patients immunodéprimés (Wagemakers *et al.*, 2015). À noter qu'un cas a été décrit en Suède de méningoencéphalite chez un patient *a priori* immunocompétent (Henningsson *et al.*, 2019). De même *Neorhlichia mikurensis* semble également avoir un pouvoir pathogène plus important chez l'immunodéprimé, puisque cette bactérie a été décrite comme à l'origine d'évènement thrombotique chez ce type de patient (Wennerås, 2015). Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a évalué la fréquence relative de ces

deux pathogènes dans une population immunodéprimée et une population immunocompétente appariées.

À l’opposé, d’autres microorganismes transmis par les tiques possèdent un caractère pathogène stricte, citons à titre d’exemple *R. rickettsii* l’agent de la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses qui est une maladie avec un taux de mortalité se situant entre 2 et 18 % avec traitement antibiotique (Holman *et al.*, 2001). Enfin, certains microorganismes sont pathogènes pour les animaux et n’ont pas démontré de pathogénicité pour l’homme, c’est le cas du virus de la peste porcine par exemple (Bonnet *et al.*, 2020).

Enfin, la détection d’un microorganisme connu comme pathogène ne constitue pas systématiquement un risque infectieux pour l’homme pour plusieurs raisons : (i) comme nous l’avons déjà évoqué au paragraphe I.A, si l’agent infectieux est vivant, cela ne signifie pas forcément que l’arthropode-vecteur aura la compétence vectorielle à transmettre ce pathogène (Kahl *et al.*, 2002) ; (ii) si une piqûre d’une tique porteuse d’un microorganisme survient, la transmission de l’agent infectieux n’est pas immédiate compte tenu du fait que bactéries et parasites doivent mûrir pour devenir infectieux et/ou migrer vers les glandes salivaires avant d’être transmis à l’hôte vertébré, processus qui met au moins 24 heures (de la Fuente *et al.*, 2017) ; (iii) même si un microorganisme est transmis au cours du repas sanguin, il peut être éliminé tôt ou tard après la transmission sans avoir exercé son pouvoir pathogène chez l’hôte récepteur (Kahl, 2018).

S’ajoute à cela le fait que même en cas de transmission efficace de pathogènes à l’homme, toute transmission ne conduit pas forcément à une maladie clinique. En effet, une étude s’intéressant à la séroprévalence de 7 microorganismes chez les travailleurs forestiers (Rigaud *et al.*, 2016) a montré que ces derniers possédaient les anticorps sans manifestation clinique associée dans leurs historiques médicaux.

Ces différents points ont été particulièrement étudiés et estimés pour la borréliose de Lyme, la Figure 16 illustre ce dernier point.

L’expression clinique d’une maladie vectorielle à tiques est donc multifactorielle, elle dépend à la fois de la nature du microorganisme, de l’interaction tique/homme et de l’interaction microorganisme/homme (et de son statut immunitaire).



Figure 16 : Histoire naturelle de la borréliose de Lyme en l'absence de traitement bien conduit d'après (Boyer *et al.*, 2019b).

## **II. LES MICROORGANISMES TRANSMIS PAR LES TIQUES A L'ORIGINE DE MALADIES**

Comme cela a déjà été évoqué, les tiques constituent les vecteurs d'agents responsables de maladies infectieuses les plus importants en matière de santé humaine et animale (Jongejan et Uilenberg, 2004; Colwell *et al.*, 2011; Dantas-Torres *et al.*, 2012), devant les moustiques qui occupent la première place si l'on ne considère que la santé humaine. Les tiques sont les vecteurs d'une grande diversité d'agents infectieux : bactéries (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*...), virus (TBEv, CCHFv) et parasites (*Babesia*, *Theileria*). Ces microorganismes circulent dans la nature entre les tiques et entre les tiques et un réservoir animal.

L'homme ou l'animal malade constitue le plus souvent un hôte accidentel et une impasse pour l'agent infectieux. La transmission intervient lors de la piqûre hématophage de la tique, lorsque celui-ci fréquente les biotopes où les tiques sont présentes (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Plusieurs études évaluant le risque de transmission à l'homme d'agents infectieux après piqûre de tique corroborent le fait que ce risque est faible à l'échelle individuelle (Jahfari *et al.*, 2016; Ocias *et al.*, 2020).

Il est impossible de détailler l'ensemble des maladies transmises par les tiques. Pour une vue globale, les différentes pathologies ont été synthétisées dans le Tableau 3. Nous détaillerons dans la revue « Other *Ixodes*-Borne Diseases » les microorganismes susceptibles de provoquer une maladie, transmis par les tiques appartenant au complexe *I. ricinus* en Europe.

	Microorganismes	Maladie	Vecteur	Distribution géographique	Hôte pouvant développer une maladie
Protozoaires	<b>Babesia</b>				
	<i>B. beliceri</i>	-	<i>Hyalomma spp.</i>	Russie	Bovins
	<i>B. bigemina</i>	Babésiose bovine	<i>Boophilus spp., Rhipicephalus spp.</i>	Afrique, Amérique, Asie, Australie	Bovins, Buffle
	<i>B. bovis</i>	Babésiose bovine	<i>Boophilus spp.</i>	Afrique, Amérique, Asie, Australie	Bovins, Buffle
	<i>B. major</i>	Babésiose bovine	<i>Haemaphysalis spp.</i>	Europe	Bovins
	<i>B. ovata</i>	-	<i>Haemaphysalis spp.</i>	Asie	Bovins
	<i>B. occultans</i>	-	<i>Hyalomma spp.</i>	Afrique	Bovins
	<i>B. divergens</i>	Babésiose bovine	<i>Ixodes spp.</i>	Europe	Bovins, Homme
	<i>B. microti</i>	-	<i>Ixodes scapularis</i>	USA, Canada	Homme, Rongeurs
	<i>B. canis</i>	Babésiose du chien	<i>Rhipicephalus sanguineus, Dermacentor reticulatus, D. marginatus</i>	Régions tropicales et semi-tropicales	Chiens
	<i>B. vogeli</i>	Babésiose du chien	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Régions tropicales et semi-tropicales	Chiens
	<i>B. rossi</i>	Babésiose du chien	<i>Haemaphysalis leachi</i>	Afrique du Sud	Chiens
	<i>B. gibsoni</i>	Babésiose du chien	<i>Haemaphysalis bispinosa, H. longicornis, Rhipicephalus sanguineus</i>	Europe du Sud	Chiens
	<i>B. ovis</i>	Babésiose ovine	<i>Rhipicephalus bursa, R. turanicus</i>	Afrique, Asie, Europe	Mouton
	<i>B. motasi</i>	Babésiose ovine	<i>Haemaphysalis spp.</i>	Afrique, Asie, Europe	Mouton
	<i>B. caballi</i>	Babésiose du cheval	<i>Dermacentor spp., Rhipicephalus evertsi evertsi</i>	Afrique, Amérique, Asie, Europe	Chevaux, mules, ânes
	<i>B. felis</i>	-	Inconnu	Afrique	Chats
	<i>B. bicornis</i>	-	Inconnu	Afrique du Sud	Rhinocéros noir
	<i>B. odocoilei</i>	-	<i>Ixodes scapularis</i>	Amérique	Cervidés et Bovidés sauvages
<b>Theileria</b>					

## Partie I – Tiques &amp; Maladies à tiques

Bactéries	<i>T. annulata</i>	La theilériose tropicale	<i>Hyalomma</i> spp.	Eurasie, Afrique, Asie centrale	Bovins, Chameaux	
	<i>T. orientalis</i>	-	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Asie	Bovins, Buffle	
	<i>T. parva</i>	Fièvre de la côte Est	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Afrique	Bovins	
	<i>T. lawrencei</i>	"Corridor disease"	<i>Rhipicephalus zambezensis</i>	Afrique	Bovins	
	<i>T. velifera</i>	Non pathogène	<i>Amblyomma</i> spp.	Afrique	Bovins, Buffle	
	<i>T. buffeli</i>	Non pathogène	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Asie	Bovins, Buffle	
	<i>T. mutans</i>	Thériose bénigne	<i>Amblyomma hebraeum</i> , <i>A. lepidum</i> , <i>A. variegatum</i> , <i>A. cohaerens</i> , <i>A. gemma</i>	Afrique	Bovins	
	<i>T. taurotragi</i>	Thériose bénigne	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>R. pulchellus</i> , <i>R. zambezensis</i>	Afrique	Bovins	
	<i>T. ovis</i>	La theilériose ovine	<i>Hyalomma</i> spp., <i>Rhipicephalus bursa</i>	Afrique, Asie	Mouton	
	<i>T. lestoquardi</i>	La theilériose ovine	<i>Hyalomma</i> spp.	Mediterranean region, Asie, Middle East, Inde	Ovin	
	<i>T. separata</i>	-	<i>Rhipicephalus evertsi</i>	Afrique	Ovin	
	<i>T. bicornis</i>	-	Unknown	Afrique du Sud	Rhinocéros noir	
	<i>T. equi</i>	Thélirose équine	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp., <i>Boophilus</i> spp.	Europe du Sud, Afrique, Asie	Chevaux, mules, ânes	
	<i>T. cervi</i>	Non pathogène	<i>Amblyomma americanum</i>	Nearctique	Cerf de Virginie	
	<b>Hepatozoon</b>					
	<i>H. canis</i>	Hépatozoonose canine	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Europe du Sud, Moyen-Orient, Extrême-Orient, Afrique	Chiens	
	<i>H. americanum</i>	Hépatozoonose canine	<i>Amblyomma maculatum</i>	Sud des USA	Chiens	
	<b>Cytauxzoon</b>					
	<i>Cytauxzoon felis</i>	Cytauxzoonose	<i>Dermacentor variabilis</i>	USA, Brésil	Chats domestiques et félinés sauvages	
	<b>Aegyptianella</b>					
<i>A. pullorum</i>	Aegyptianellose	<i>Argas walkerae</i> , <i>A. persicus</i> , <i>A. reflexus</i>	Afrique, Europe du Sud, Asie centrale, Inde	Volaille domestique		
<b>Rickettsia</b>						

## Partie I – Tiques &amp; Maladies à tiques

<i>R. rickettsii</i>	Fièvre pourprée des montagnes Rocheuses	<i>Dermacentor andersoni, D. variabilis</i>	Amérique	Homme, Chien
<i>R. amblyomii</i>	Fièvre boutonneuse non nommée	<i>Amblyomma americanum, A. neumanni, A. cajennense, A. coelebs</i>	Amérique	Homme
<i>R. conorii conorii</i>	Fièvre boutonneuse méditerranéenne	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Europe, Afrique, Asie	Homme, Chien
<i>R. conorii israelensis</i>	La fièvre boutonneuse israélienne	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Israël	Homme
<i>R. conorii caspia</i>	Fièvre d'Astrakhan	<i>Rhipicephalus sanguineus, R. pumilio</i>	Afrique, Asie	Homme
<i>R. conorii indica</i>	Le typhus à tiques indien	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Inde	Homme
<i>R. sibirica sibirica</i>	Le typhus sibérien ou Nord asiatique	<i>Dermacentor nuttalli, D. marginatus, D. silvarum, D. sinicus, Haemaphysalis concinna</i>	Asie	Homme
<i>R. sibirica mongolotimonae</i>	-	<i>Hyalomma asiaticum, H. truncatum, H. anatolicum excavatum</i>	Afrique, Chine, France	Homme
<i>R. australis</i>	Le typhus à tiques du Queensland	<i>Ixodes holocyclus, I. tasmani</i>	Australie	Homme
<i>R. japonica</i>	Fièvre boutonneuse orientale ou japonaise	<i>Ixodes ovatus, Dermacentor taiwanensis, Haemaphysalis longicornis, H. flava</i>	Japon	Homme
<i>R. africae</i>	Fièvre africaine des tiques	<i>Amblyomma hebraeum, A. variegatum</i>	Afrique, la Réunion, Antilles	Homme
<i>R. honei</i>	Fièvre boutonneuse de l'île Flinders	<i>Bothriocroton hydrosauri, Amblyomma cajennense, Ixodes granulatus</i>	Australie, USA, Thaïlande	Homme
<i>R. slovaca</i>	TIBOLA, DEBONEL	<i>Dermacentor marginatus, D. reticulatus</i>	Europe, Asie	Homme
<i>R. helvetica</i>	Fièvre anéruptive	<i>Ixodes ricinus</i>	Europe	Homme
<i>R. heilongjiangensis</i>	-	<i>Dermacentor silvarum</i>	Chine	Homme
<i>R. aeschlimannii</i>	-	<i>Hyalomma marginatum marginatum, H. m. rufipes, Rhipicephalus appendiculatus</i>	Europe, Afrique	Homme
<i>R. parkeri</i>	-	<i>Amblyomma maculatum, A. triste, A. dubitatum</i>	USA, Amérique du Sud	Homme
<i>R. massiliae</i>	-	<i>Rhipicephalus sanguineus, R. turanicus, R. muhsamae, R. lunulatus, R. sulcatus</i>	Europe, Asie, Argentine, USA	Homme
<i>R. marmorii</i>	Fièvre boutonneuse australienne	<i>Haemaphysalis novaeguineae, Ixodes holocyclus</i>	Australie	Homme
<i>R. monacensis</i>	-	<i>Ixodes ricinus</i>	Europe	Homme
<b>Ehrlichia</b>				
<i>E. chaffeensis</i>	Ehrlichiose monocytique humaine	<i>Amblyomma americanum, Dermacentor variabilis</i>	USA	Homme et divers mammifères

## Partie I – Tiques &amp; Maladies à tiques

<i>E. ewingii</i>	Ehrlichiose granulocytaire canine, Ehrlichiose humaine	<i>Amblyomma americanum</i>	USA	Homme, Chiens
<i>E. ruminantium</i>	Cowdriose bovine	<i>Amblyomma hebraeum, A. astrion, A. cohaerens, A. marmoreum, A. pomposum, A. americanum, A. gemma, A. lepidum, A. variegatum</i>	Afrique, Caraïbes	Bovins principalement
<i>E. canis</i>	Ehrlichiose canine	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Sud des États-Unis, Europe du Sud, Afrique, Moyen-Orient, Asie de l'Est	Chiens
<b>Anaplasma</b>				
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmose granulocytaire humaine	<i>Ixodes scapularis, I. pacificus, I. ricinus, I. hexagonus</i>	USA, Europe	Homme et divers mammifères
<i>A. marginale</i>	Anaplasmose bovine	Différentes espèces	Cosmopolite	Bovins
<i>A. centrale</i>	Anaplasmose bovine	Différentes espèces	Cosmopolite	Bovins
<i>A. ovis</i>	Anaplasmose ovine	Différentes espèces	Cosmopolite	Mouton
<i>A. platys</i>	Ehrlichiose canine	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		Chien
<b>Neoehrlichia</b>				
<i>N. mikurensis</i>	Néoehrlichiose	<i>Ixodes ricinus, I. persulcatus, I. ovatus</i>	Europe, Asie	Homme
<b>Francisella</b>				
<i>F. tularensis</i>	Tularémie	<i>Dermacentor andersoni, D. variabilis, A. americanum</i>	Eurasie, Nearctique	Homme et divers mammifères
<b>Borrelia</b>				
<i>B. burgdorferi</i> ss	Maladie de Lyme	<i>Ixodes pacificus, I. persulcatus, I. ricinus, I. scapularis</i>	USA, Canada, Europe, Asie, Afrique du Nord	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. garinii</i>	Maladie de Lyme	<i>Ixodes persulcatus, I. ricinus</i>	Europe, Asie, Afrique du Nord	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. bavariensis</i>	Maladie de Lyme	<i>Ixodes persulcatus, I. ricinus</i>	Europe, Asie	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. afzelii</i>	Maladie de Lyme	<i>Ixodes persulcatus, I. ricinus</i>	Europe, Asie, Afrique du Nord	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. valaisiana</i>	Maladie de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>	Europe, Asie	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. lusitaniae</i>	Maladie de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>	Europe	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. mayonii</i>	Maladie de Lyme	<i>I. scapularis</i>	USA (Est)	Homme (chat, chien, cheval)



## Partie I – Tiques &amp; Maladies à tiques

<i>B. spielmani</i>	Maladie de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>	Europe	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. japonica</i>	Maladie de Lyme	<i>Ixodes ovatus</i>	Japon	Homme (chat, chien, cheval)
<i>B. lonestari</i>	Non pathogène	<i>Amblyomma americanum</i>	USA	-
<i>B. theileri</i>	Bovine borreliosis	<i>Boophilus spp., Rhipicephalus evertsi</i>	Afrique, Amérique centrale et du Sud, Australie	Bovins
<i>B. turcica</i>	-	<i>Hyalomma aegyptium</i>	Turquie	
<i>B. miyamotoi</i>	<i>B. miyamotoi</i> disease	<i>Ixodes pacificus, I. persulcatus, I. ricinus, I. scapularis</i>	USA, Canada, Europe, Asie	Homme
<i>B. hermsii</i>	Fièvre récurrente à tiques du Nouveau Monde	<i>Ornithodoros hermsii</i>	USA, Canada	Homme
<i>B. turicatae</i>	Fièvre récurrente à tiques du Nouveau Monde	<i>Ornithodoros turicata</i>	USA, Mexique	Homme
<i>B. parkeri</i>	Fièvre récurrente à tiques du Nouveau Monde	<i>Ornithodoros parkeri</i>	USA	Homme
<i>B. mazzottii</i>	Fièvre récurrente à tiques du Nouveau Monde	<i>Ornithodoros talaje</i>	USA, Mexique	
<i>B. venezuelensis</i>	Fièvre récurrente à tiques du Nouveau Monde	<i>Ornithodoros rudis</i>	Amérique centrale et du Sud	Homme
<i>B. duttonii</i>	Fièvre récurrente à tiques de l'Ancien Monde	<i>Ornithodoros moubata</i>	Afrique	Homme
<i>B. crociduræ</i>	Fièvre récurrente à tiques de l'Ancien Monde	<i>Ornithodoros erraticus</i>	Europe, Afrique	Homme
<i>B. persica</i>	Fièvre récurrente perse	<i>Ornithodoros tholozani</i>	Asie	Homme
<i>B. hispanica</i>	Fièvre récurrente à tiques de l'Ancien Monde	<i>Ornithodoros erraticus</i>	Espagne, Portugal	Homme
<i>B. latyschevii</i>	Fièvre récurrente à tiques de l'Ancien Monde	<i>Ornithodoros tartakovskyi</i>	Iran, Central Asie	Homme
<i>B. caucasica</i>	Fièvre récurrente à tiques de l'Ancien Monde	<i>Ornithodoros aspersus</i>	Asie (Caucase et Irak)	Homme
<i>B. graingeri</i>	-	<i>Ornithodoros graingeri</i>	Afrique	Homme

## Partie I – Tiques &amp; Maladies à tiques

Virus	<i>B. anserina</i>	Borreliose aviare	<i>Argas spp.</i>	Cosmopolite	Oiseaux	
	<i>B. tillae</i>	-	<i>Ornithodoros zumpti</i>	Afrique	Homme	
	<i>B. coraciae</i>	-	<i>Ornithodoros coriaceus</i>	USA	Bovins	
	<i>B. parkeri</i>	-	<i>Ornithodoros parkeri</i>	USA	Homme	
	<b>Dermatophilus</b>					
	<i>D. congolensis</i>	Dermatophilose	<i>Amblyomma variegatum</i>	Afrique	Ruminants	
	<b>Bunyaviridae</b>					
	<i>Bunyaviridae, Nairovirus</i>	Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo	<i>Hyalomma marginatum, Hy. anatolicum, Hy truncatum Amblyomma variegatum Haemaphysalis punctata I. ricinus, Dermacentor spp., Rhipicephalus spp.</i>	Afrique, Asie, Europe	Homme	
	<i>Bunyaviridae, Nairovirus</i>	"Nairobi Sheep Disease"	<i>Rhipicephalus appendiculatus, R. pulchelus, Amblyomma variegatum</i>	Kenya, Ouganda, Rwanda, Tanzanie, Somalie	Ovin	
	<i>Bunyaviridae, Nairovirus</i>	Virus Soldado	<i>Ornithodoros maritimus, O. capensis, O. denmarki</i>	Trinidad, Hawaii, Seychelles, Éthiopie, Afrique du Sud, Maroc, France, Royaume-Uni	Homme	
	<i>Bunyaviridae, ungrouped</i>	Virus de la fièvre d'Issyk-Kul	<i>Argas vespertilionis, A. pusillus, Ixodes vespertilionis</i>	Tadjikistan, Kirgystan, Turkménistan	Chauves-souris	
	<b>Reoviridae</b>					
	<i>Reoviridae, Orbivirus</i>	Eyach virus	<i>Ixodes ricinus, I. ventalloi</i>	Europe	Homme	
	<i>Reoviridae, Orbivirus</i>	La fièvre à tiques du Colorado	<i>Dermacentor andersoni, D. occidentalis, D. albipictus</i>	Nearctique	Homme	
	<i>Reoviridae, Orbivirus</i>	Le virus du lac Mono	<i>Argas monolakensis, A. cooleyi</i>	USA	Homme	
	<b>Orthomyxoviridae</b>					
	<i>Orthomyxoviridae Thogotovirus</i>	-	<i>Amblyomma spp., Boophilus spp., Hyalomma spp., Rhipicephalus spp.</i>	Afrique centrale et orientale, Europe du Sud	Mouton, Homme	
	<b>Flaviviridae</b>					
	<i>Flaviviridae, Flavivirus</i>	Fièvre hémorragique d'Omsk	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Régions d'Omsk et de Novossibirsk en Sibérie occidentale (Russie)	Homme	
	<i>Flaviviridae, Flavivirus</i>	Encéphalite à tiques	<i>Ixodes ricinus, I. persulcatus, Haemaphysalis concinna, H. punctata</i>	Europe, Asie	Homme	

## Partie I – Tiques &amp; Maladies à tiques

<i>Flaviviridae, Flavivirus</i>	Langat virus	<i>Ixodes granulatus, Haemaphysalis papuana</i>	Malaisie	Rongeurs sauvages
<i>Flaviviridae, Flavivirus</i>	Louping ill	<i>Ixodes ricinus</i>	Royaume-Uni	Mouton
<i>Flaviviridae, Flavivirus</i>	Virus powassan	<i>Ixodes cookie, I. marxi, I. scapularis, Dermacentor andersoni</i>	Canada, USA, Russie	Homme, Rongeurs
<i>Flaviviridae, Flavivirus</i>	La maladie de la forêt de Kyasanur	<i>Haemaphysalis spp. (surto H. spinigera et H. turturis)</i>	Les zones forestières du district de Kyasanur en Inde	Homme, Singes
<i>Asfaviridae, Asfavirus</i>	Peste porcine africaine	<i>Ornithodoros moubata, O. erraticus, O. turicata, O. coriaceus, O. puertoricensis</i>	Afrique, Europe du Sud, Caraïbes (épidémies au Brésil, probablement importées)	Cochons domestiques
<b>Acanthocheilonema (Nématodes)</b>				
<i>Acanthocheilonema vitae</i>	-	<i>Ornithodoros tartakovskyi</i>	Asie	Rongeurs
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	-	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		Chiens

Tableau 3 : Microorganismes transmis par les tiques et maladies associées (d'après de la Fuente *et al.*, (2008))

## REVUE DE LA LITTÉRATURE : OTHER *IXODES*-BORNE DISEASES

---

Cette revue a pour but de faire un point récent de la littérature sur les microorganismes transmis par les tiques du complexe *I. ricinus* en dehors des bactéries du complexe *B. burgdorferi* s.l (les bactéries responsables de la maladie de Lyme). En effet, la maladie de Lyme est la maladie transmise par les tiques la plus prévalente de l'hémisphère Nord (Stanek *et al.*, 2012), elle donne un tableau clinique typique (manifestations cutanées, articulaires et neurologiques principalement). La forte fièvre (> 38,5 °C) est très peu fréquente en Europe chez les patients avec une borréliose de Lyme (Strle et Stanek, 2009). Nos travaux de thèse n'ayant pas été en lien avec cette pathologie, nous la détaillerons pas.

Cette revue détaille les caractéristiques microbiologiques, les éléments de cliniques, de diagnostic et de traitement des bactéries (hors *B. burgdorferi* s.l), virus et parasites transmis par les tiques du complexe *I. ricinus* en Europe. Bien que des spécificités cliniques peuvent être observées en fonction du microorganisme considéré, un syndrome fébrile dans les 7 à 10 jours après piqûre de tique est classiquement mis en évidence.

Cette revue sera intégrée dans un livre portant sur la borréliose de Lyme en Europe (Editeur : Klaus-Peter Hunfeld). Elle a été révisée, la version présentée dans ce manuscrit correspond donc à la version resoumise.

**PARTIE II :**  
**IDENTIFICATION DE L'ESPÈCE DE TIQUE**  
**PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-**  
**TOF**

## IDENTIFIER LES TIQUES : POURQUOI ET COMMENT ?

---

Pour l'étude des maladies vectorielles, l'identification du ou des vecteurs est de première importance. En effet, celle-ci permet de connaître le rôle précis de la tique observée ou collectée dans la transmission d'un agent infectieux à l'homme ou à l'animal (Figure 17). La connaissance de la distribution des arthropodes vecteurs et l'estimation du risque de maladies dans une zone étudiée ainsi que la planification de mesures de contrôle des vecteurs sont des points essentiels qui contribuent à la protection des populations exposées. De plus, l'implantation d'une tique vectrice d'un microorganisme pathogène dans une région précède l'implantation de celui-ci et permet ainsi d'alerter sur l'extension géographique d'une maladie. Par exemple, *Hyalomma marginatum*, vectrice du virus de la fièvre de Crimée Congo s'est implantée dans le Sud de la France, faisant craindre l'apparition de cette pathologie dans cette région à plus ou moins long terme (Vial *et al.*, 2016). Enfin, l'identification d'un arthropode prélevé sur un patient ou dans son environnement immédiat, est également importante. Elle permet de proposer une prise en charge adaptée au patient, à son environnement et à son entourage.

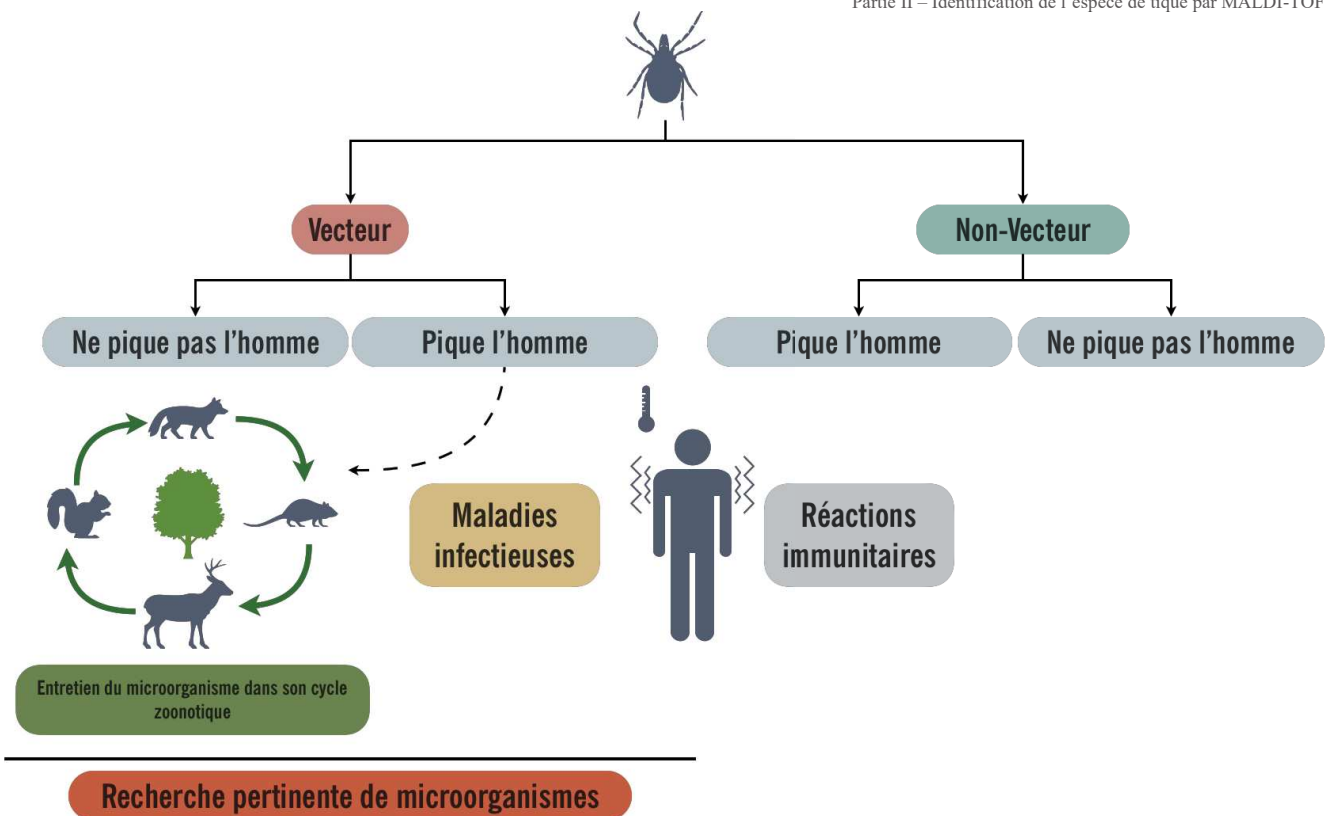


Figure 17 : Différents rôles pouvant être pris par une tique

## **I. INTERET DE L'IDENTIFICATION DES TIQUES**

### **A. Notion de compétence vectorielle**

#### **1. Définition**

Le concept de **compétence vectorielle** fait référence à la capacité des arthropodes à acquérir, maintenir et transmettre un microorganisme (bactérie, virus ou parasite) pouvant être à l'origine de maladie. Les espèces d'arthropodes qui présentent une compétence vectorielle élevée pour un agent infectieux l'acquièrent facilement en se nourrissant sur leur hôte vertébré, le maintiennent, en assurent la multiplication dans leurs tissus et le transmettent efficacement en se nourrissant à nouveau sur un hôte réservoir ou sensible à ce microorganisme. Les arthropodes, qui sont des vecteurs incompetents, peuvent acquérir l'agent en se nourrissant sur un hôte infecté, mais sont incapables de le maintenir dans leurs tissus et de le transmettre à un autre hôte (DeFoliart *et al.*, 1987).

Selon DeFoliart *et al.*, (1987) dans une revue de la littérature sur les arboviroses transmises par les moustiques, quatre critères sont nécessaires pour définir un vecteur compétent. Il s'agit de :

- ▶ (1) l'isolement de l'agent infectieux à partir de vecteurs infectés naturellement ;
- ▶ (2) la démonstration expérimentale que le vecteur peut acquérir le microorganisme d'intérêt en se nourrissant sur un hôte infecté
- ▶ (3) la démonstration que les vecteurs infectés expérimentalement peuvent transmettre l'agent en se nourrissant ;
- ▶ (4) la preuve que le vecteur potentiel suspecté se nourrit bien sur les hôtes vertébrés suspectés dans des conditions naturelles.

Ainsi, contrairement aux moustiques, pour les tiques dures (ne prenant qu'un repas sanguin par stase) outre les expériences de transmission horizontale du microorganisme (de l'hôte vertébré vers la tique et *vice versa*), les expériences de transmission transstadiale sont nécessaires à l'établissement de la compétence vectorielle. Le concept de compétence vectorielle diffère quelque peu selon les auteurs (DeFoliart *et al.*, 1987), l'accent a été mis sur les critères 2 et 3 pour définir le concept de compétence vectorielle par rapport aux critères 1 et 4. Le critère 4 rentre lui plutôt dans la définition de **capacité vectorielle**<sup>1</sup> qui prend en compte tous les facteurs environnementaux nécessaires à la transmission du microorganisme d'intérêt.

---

<sup>1</sup> La capacité vectorielle se calcule, elle prend en compte la densité en vecteur, en hôtes et différents autres facteurs environnementaux. Elle est plutôt utilisée dans l'étude des arboviroses transmises par les moustiques.



Il est intéressant de constater que le critère n° 1 fait appel à l'isolement (en culture) du microorganisme à partir d'un vecteur porteur du microorganisme d'intérêt. Paradoxalement, avec l'avènement de la biologie moléculaire, l'isolement en culture du microorganisme d'intérêt à partir de l'arthropode suspect d'être vecteur n'est que peu, voire plus pratiqué. La culture est remplacée par la détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) des acides nucléiques du microorganisme. En effet, la culture des agents infectieux transmis par les tiques est souvent fastidieuse, voire impossible pour certains. Elle nécessite des milieux particuliers ou une culture cellulaire. Pour certains microorganismes, elle doit se faire dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Cependant, bien qu'elle soit moins sensible qu'une PCR spécifique, la culture apporte l'information indispensable de la viabilité du microorganisme dans l'arthropode. En effet, les méthodes d'amplification d'acides nucléiques ne permettent pas de faire la différence entre un fragment d'ADN persistant après un repas sanguin, un génome complet d'un microorganisme non viable et d'un microorganisme viable.

## **2. Un exemple de la compétence vectorielle des tiques pour *Borrelia***

Depuis la découverte de la bactérie responsable de la maladie de Lyme en 1982 chez les tiques (Burgdorfer *et al.*, 1982), de nombreuses expériences de compétence vectorielle ont été menées sur plusieurs espèces de tiques, appartenant à la fois au genre *Ixodes* et à d'autres genres (Eisen, 2020). C'est, à notre connaissance, la maladie transmise par les tiques qui comporte le plus d'étude de compétence vectorielle pour différentes espèces de tiques.

Ainsi, certaines espèces d'*Ixodes* ne sont pas compétentes pour la transmission des bactéries du complexe *B. burgdorferi* s.l, notamment *I. holocyclus*, une espèce présente en Australie, qui n'assure pas la transmission de ces bactéries.

Le Tableau 4, présente la compétence vectorielle de différentes espèces d'*Ixodes*. De plus, ces expériences ont été menées sur des espèces d'autres genres et se sont avérées négatives. Il s'agit de : *Amblyomma americanum*, *Dermacentor andersoni*, *D. nuttalli*, *D. occidentalis*, *D. silvarum*, *D. variabilis*, *Haemaphysalis concinna* et *H. longicornis* (Eisen, 2020)

Il est donc fondamental de pouvoir identifier avec précision une tique. En effet, c'est l'espèce de tique qui va guider la recherche de microorganismes susceptibles d'être transmis par elle.

Partie II – Identification de l'espèce de tique par MALDI-TOF

Bactérie/Espèce de tique	<i>I. affinis</i>	<i>I. angustus</i>	<i>I. arboricola</i>	<i>I. cookei</i>	<i>I. dentatus</i>	<i>I. frontalis</i>	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. holocyclus</i>	<i>I. jellisoni</i>	<i>I. minor</i>	<i>I. muris</i>	<i>I. ovatus</i>	<i>I. pacificus</i>	<i>I. persulcatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>I. scapularis</i>	<i>I. sinensis</i>	<i>I. spinipalpis</i>
<b>Espèces isolées en culture &amp; PCR dans des prélèvements cliniques humains</b>																		
<i>B. burgdorferi</i> ss	oui	oui	-	NON	-	-	oui	NON	-	oui	oui	-	oui	-	oui	oui	-	oui
<i>B. afzelii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	oui	oui	-	-
<i>B. garinii</i>	-	-	NON	-	-	NON	-	-	-	-	-	NON	-	oui	oui	oui	oui	-
<i>B. bavariensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. spielmanii</i>	-	-	-	-	-	NON	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. lusitanae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. mayonii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	oui	-	-
<b>Espèces détectées par PCR uniquement dans des prélèvements cliniques humains</b>																		
<i>B. bissetti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	oui	-	-	oui	-	-	oui	-	oui
<i>B. kurtenbachii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. carolinensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. americana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. andersonii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. valaisiana</i>	-	-	NON	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. lanei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Pathogénicité inconnue ou Absence de pathogénicité</b>																		
<i>B. californiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	oui	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. chilensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. japonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. lanei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. sinica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. tamukii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. turdi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. yangtzensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Borrelia non caractérisée</i>	-	-	-	NON	oui	-	-	-	oui	-	-	-	oui	-	oui	oui	-	oui

Tableau 4 : Compétence vectorielle de différentes espèces de tique pour les espèces du complexe *B. burgdorferi* sl (d'après Eisen, (2020))

## B. Modification des aires de répartition des tiques

### 1. *Ixodes ricinus*

#### a) Modifications spatiales :

Les changements climatiques tendent à modifier la répartition d'*I. ricinus* vers des régions plus septentrionales. En effet, en Suède, la limite de distribution au nord d'*I. ricinus*, ainsi que celle d'autres espèces animales et végétales, s'est déplacée vers le nord depuis les années 90 (TäLleklint et Jaenson, 1998). Avant, *I. ricinus* était située en dessous de 61° de latitude Nord (Jaenson *et al.*, 1994) ; ces tiques sont maintenant établies sur tout le littoral de la mer baltique (jusqu'à 66° de latitude N). La modification de cette répartition est liée à l'augmentation des températures plus favorables à *I. ricinus* (Lindgren *et al.*, 2000). À noter qu'*I. scapularis* connaît également une expansion vers le Nord en Amérique (Ogden *et al.*, 2009).

De façon analogue, *I. ricinus* a été signalée à une altitude plus élevée en République tchèque. En effet, des études de terrain menées en 1957 et en 1979-80 ont montré que les tiques étaient présentes jusqu'à 700 mètres au-dessus du niveau de la mer. D'autres études menées dans les années 2000 ont montré, qu'*I. ricinus* était présente jusqu'à 1100 mètres d'altitude (Daniel *et al.*, 2003; Materna *et al.*, 2005).

De même, les modifications socio-économiques de la fin du XXe siècle ont conduit à des modifications des paysages ruraux et forestiers susceptibles de favoriser l'implantation des tiques dans des lieux où elles n'étaient pas présentes (Kilpatrick et Randolph, 2012; Medlock *et al.*, 2013).

#### b) Modifications de l'activité au cours de l'année :

L'activité saisonnière des nymphes et des adultes d'*I. ricinus* s'étend classiquement de mars à octobre dans la plupart des régions d'Europe centrale avec deux pics d'activité en automne et au printemps, tandis que les larves émergent plutôt en mai (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Cependant, la température peut exercer une forte influence sur ce schéma d'activité. Nous pouvons citer à titre d'exemple l'activité des tiques dans les îles Britannique en hiver (Gray *et al.*, 2009).

Les automnes et hivers doux, comme ceux observés lors des années 2006/2007 en Allemagne (respectivement 3,4 et 4,6 °C plus chaud que les moyennes), ont permis une activité continue des tiques en hiver (Dautel *et al.*, 2008). Si les températures augmentent en hiver en Europe centrale, il est probable qu'*I. ricinus* sera présente tout au long de l'année (Gray *et al.*, 2009).

En revanche, l'augmentation de la température pourrait avoir un effet néfaste sur les populations d'*I. ricinus*. En effet, cette dernière pourrait disparaître de régions devenues trop chaudes.

### c) Modification de la densité :

La modification de la densité des tiques est plus difficile à objectiver. En effet, les études menées sur de longues périodes susceptibles de répondre à cette question sont rares. L'expérience du CNR *Borrelia* de Strasbourg qui collecte mensuellement les mêmes sites depuis 2012 montre que malgré des variations annuelles, la densité en nymphe n'a pas varié par rapport aux collectes réalisées au début des années 2000 (Ferquel *et al.*, 2006) (données non publiées). Une étude suisse a montré une légère décroissance de la densité en tiques *I. ricinus* sur 15 ans de campagne de collecte (Hauser *et al.*, 2018). Par conséquent, à un endroit donné sur une longue (plus de 10 ans) période de temps la densité en nymphe semble rester stable.

Cependant, les modifications climatiques et l'abondance de certains mammifères pourraient indirectement favoriser la densité en tique. Cela a été indirectement évalué en Suède et en Italie sur la survenue de cas de TBE. En effet, en Suède l'augmentation de l'incidence de l'encéphalite à tiques depuis le milieu des années 1980 semble liée à des hivers plus doux et une arrivée précoce du printemps (Lindgren et Gustafson, 2001). En Italie, des pratiques d'afforestation et de reforestation favorisent la densité en hôtes réservoirs pour le virus TBE. De même, l'abondance en chevreuils semble expliquer l'émergence du TBE dans ce pays (Rizzoli *et al.*, 2009).

Pour mieux appréhender les modifications des variations de la densité en tique, une méta-analyse serait certainement très informative à ce sujet.

## 2. *Dermacentor reticulatus*

*Dermacentor reticulatus* est un vecteur notamment de la babésiose canine et de rickettsies responsables de la « Tick BOrne LymphAdénopathy ou TIBOLA » (Dautel *et al.*, 2006).

L'aire de répartition géographique de l'espèce s'étend de la France et du sud-ouest de l'Angleterre à l'ouest à l'Asie centrale à l'est. En Europe occidentale et centrale, sa limite nord est le nord de l'Allemagne, le nord de la Pologne et la Lituanie. En Allemagne, cette espèce a été signalée en 1976 sur quatre sites de collecte sur près de 3000 (Gray *et al.*, 2009). Son aire de répartition est plus importante dans ce pays à l'heure actuelle (Dautel *et al.*, 2006). Elle s'est étendue en particulier dans les régions de l'est et du sud-ouest de l'Allemagne (Gray *et al.*, 2009).

### 3. *Hyalomma marginatum*

*H. marginatum* est le vecteur principal d'une zoonose virale, la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) (Ergönül, 2006). Cette espèce a été signalée dans des pays d'Europe du Nord, probablement apportée par des oiseaux migrateurs, comme en Suède (Grandi *et al.*, 2020) ou en Allemagne (Chitimia-Dobler *et al.*, 2019). *H. marginatum* a probablement été transportée par les oiseaux migrateurs depuis de nombreuses années en Europe centrale, cependant les hivers doux observés en Allemagne rendent possible son implantation en Europe centrale (Chitimia-Dobler *et al.*, 2019). Cette espèce est maintenant bien implantée dans le Sud de la France en Camargue (Vial *et al.*, 2016). Le risque réside dans l'implantation de tiques porteuses du virus CCHF transportées par des oiseaux et contaminant un hôte réservoir autochtone (un cheval par exemple).

## **II. COMMENT IDENTIFIER LES TIQUES ?**

### **A. Identification morphologique**

L'identification morphologique est basée sur la présence ou l'absence de caractères morphologiques permettant la classification d'un spécimen dans un genre et une espèce. Elle nécessite l'utilisation de clés d'identification dichotomiques (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

L'identification morphologique des tiques constitue la pierre angulaire de l'identification en entomologie. Elle est peu coûteuse. De plus, dans de nombreuses régions du monde, ou lors de campagne de collectes sur le terrain, une loupe binoculaire et des clés d'identification peuvent être les seuls outils à disposition.

Cependant, cette méthode présente plusieurs limites : premièrement la disponibilité de clés d'identification exhaustive. Deuxièmement, cette méthode nécessite l'intégrité des spécimens pour éviter la perte des critères d'identification spécifiques à l'espèce. En effet les spécimens peuvent être détériorés, le repas sanguin peut effacer les traces de caractères anatomiques permettant de faire la diagnose au rang d'espèce (Anderson *et al.*, 2004).

De plus, l'identification morphologique est chronophage et est non applicable à une utilisation à haut débit. En effet, l'identification des spécimens à l'état larvaire peut nécessiter l'observation des soies à la loupe binoculaire (Klompen, 1992). Le nombre d'entomologistes capables d'identifier correctement les espèces de tiques tend à décroître fortement (Cuisance et Antoine Rioux, 2004; Estrada-Peña *et al.*, 2017a).

Enfin, en entomologie certaines espèces dites cryptiques ne présentent pas de caractéristiques morphologiques différentes, seul l'emploi de marqueurs génotypiques permet une identification formelle au rang d'espèce (Hebert *et al.*, 2004).

#### **1. Identification des larves**

Du fait de leur repas sanguin relativement long comparé aux stases nymphales et adultes, la collecte sur hôte de larves d'Argasidae est parfois plus fréquente que la collecte d'adultes. Certaines espèces sont connues uniquement au stade de larve. Certains caractères, notamment les soies, permettent d'identifier les Argasidae. En effet, **la présence, le nombre, l'insertion et la disposition des soies** ont une importance majeure et permettent d'identifier les tiques. Il s'agit de la chaetotaxie (Klompen, 1992). Cette méthodologie peut être aussi employée pour les Ixodidae (Clifford et Anastos, 1960).

Le nombre et la **disposition des pores (ou lyrifissures)**, par rapport aux différentes soies sont également des caractéristiques importantes pour l'identification des larves au rang d'espèce.

Les caractères morphologiques (Figure 3) utilisés pour l'identification des tiques aux stases nymphales et adultes peuvent également servir à l'identification des larves. Il s'agit par exemple de l'analyse de la **dentition hypostomiale**, la forme du scutum, le nombre, la taille et la disposition des épines coxales, la forme du capitulum et la position du sillon anal. De plus, le nombre et la disposition des festons ainsi que la forme et la longueur des pattes peuvent être des caractères importants pour les larves d'Ixodidae. Les larves d'Argasidae étant pourvues d'une plaque dorsale, la forme et la taille de celle-ci sont des éléments de la diagnose d'espèce.

## 2. Identification des nymphes

Si la chaétotaxie et le nombre de lyrifissures sont des caractères morphologiques importants, utilisés pour identifier les tiques à la stase larvaire, ces caractères sont beaucoup moins fréquemment utilisés pour identifier les tiques aux stases nymphales et adultes.

À la stase nymphale, les Argasidae et les Ixodidae ressemblent aux adultes, mais les tiques sont généralement plus petites, elles n'ont pas l'orifice génital que possèdent les adultes. Cependant, certains caractères peuvent être absents (par exemple, la présence de pores sur la surface dorsale, la présence de plaques accessoires sur la partie ventrale de l'idiosome<sup>1</sup>) (Durden *et al.*, 2013).

Les caractères importants des nymphes d'Ixodidae comprennent la présence, le nombre, la taille et la disposition des éperons coxaux, trochantériens ou tarsiens<sup>2</sup>, la forme et la longueur des articles des pattes ; la dentition de l'hypostome ; la forme du capitulum de base ; la présence éventuelle de protubérances ventrales ; la forme du scutum...

## 3. Identification des adultes

Les caractères morphologiques importants utiles pour l'identification des tiques adultes sont identiques à ceux utilisés pour les nymphes. Cependant, il existe des caractères supplémentaires permettant d'effectuer la diagnose. Il s'agit notamment : de la forme de l'orifice génital, de la texture du scutum (lisse, rugueux, etc.), de la taille et de la forme des pores chez les femelles, de la présence ou de l'absence d'un appendice caudal, et de la présence (et de la forme) ou de l'absence de diverses plaques ventrales chez les mâles.

<sup>1</sup> L'idiosome correspond au « corps » de la tique à l'arrière du capitulum (Figure 3).

<sup>2</sup> Coxa, trochanter et tarsi correspondent à 3 des 6 articles des pattes de la tiques (les auteurs ne sont pas tous en accord avec la dénomination des 6 articles). Les éperons sont des appendices s'étendant vers l'arrière de l'article.

## B. Identification moléculaire de l'espèce de tique

Le séquençage de régions codantes et non codantes de gènes spécifiques de certaines espèces de tiques et leur confrontation à des bases de données internationales permettent l'identification des espèces et ont joué un rôle important dans le développement de l'identification moléculaire (Black et Piesman, 1994; Mangold *et al.*, 1998). L'avantage majeur lié à l'utilisation des séquences d'ADN est que celle-ci n'est pas affectée par la stase. En effet, la séquence est identique pour un œuf, une larve, une nymphe et un adulte. De plus, plusieurs conditions de conservation des spécimens sont compatibles avec l'intégrité de l'ADN, comme les échantillons congelés, conservés dans l'alcool et même dans certains cas, des échantillons secs (Yssouf *et al.*, 2016). La quantité d'ADN nécessaire à l'analyse pour l'identification moléculaire est faible (l'extraction de l'ADN de 4 pattes d'une nymphe ou d'un œuf suffit à amplifier le gène cible) (Yssouf *et al.*, 2016). Enfin, l'extraction de l'ADN total d'un spécimen entier permet à la fois d'identifier l'espèce de tique, et de réaliser la détection de microorganismes potentiellement infectieux. Différents marqueurs génétiques et stratégies moléculaires ont été mis au point à l'aide de séquences de nucléotides spécifiques aux espèces, conçues principalement à partir de l'ADN ribosomique (ADNr) ou d'autres gènes mitochondriaux (exemple Cytochrome c Oxidase sous-unité I (COI)).

Le gène COI appartient au génome mitochondrial, il est décrit comme le marqueur de première intention pour l'identification au rang d'espèce du vivant en général et des tiques en particulier (Hebert *et al.*, 2003; Lv *et al.*, 2014). Cependant, il peut être pris en défaut pour l'identification de certains spécimens d'une même espèce (Lv *et al.*, 2014). Dans ce cas, d'autres marqueurs sont nécessaires. De manière générale, une approche de séquençage de plusieurs loci (l'un provenant du génome mitochondrial et l'autre du génome nucléaire) est préférable, car l'introgression<sup>1</sup> par hybridation interspécifique accidentelle peut fausser l'interprétation des séquences (Rees *et al.*, 2003).

Parmi les marqueurs d'ADN ribosomique, l'ADNr 16s est le marqueur présentant le plus de séquences dans la base de données GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), du fait de son utilisation historique pour l'étude de la phylogénie des tiques (Black et Piesman, 1994). Les performances de ce dernier pour l'identification des tiques sont équivalentes à celles du COI (Lv *et al.*, 2014). Les séquences « Internal Transcribed Spacer » (ITS) et les sous-unités ribosomiques 16s et 18 s sont les principaux marqueurs ribosomiques utilisés pour l'identification des tiques (Yssouf *et al.*, 2016). La séquence ITS2 semble présenter la plus grande divergence inter-espèces et la plus

---

<sup>1</sup> L'introgression est l'incorporation par hybridation d'allèles d'une espèce dans le pool génétique d'une seconde espèce



faible variation intra-espèces. Elle a été proposée comme le marqueur d'ADN le plus approprié pour l'identification des espèces de tiques (Zahler *et al.*, 1995; Lv *et al.*, 2014).

De manière générale, il n'existe pas de séquence consensus pour l'identification de toutes les espèces de tiques. Une autre limitation est la disponibilité des séquences dans les bases de données. Par exemple, dans la base de données GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), près de 60 % des séquences déposées correspondent à *I. scapularis*, 10 % à *R. sanguinus*, 6 % à *I. ricinus*. Peu de séquences sont disponibles pour certaines espèces plus rares. De plus, les méthodes moléculaires peuvent être coûteuses (en comptabilisant le coût réactif, le temps technique et le temps d'analyse) et relativement longues à mettre en œuvre, ce qui peut entraver leur utilisation à haut débit.

## C. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) s'est progressivement implantée dans les laboratoires de microbiologie depuis le milieu des années 2000. En effet, cette technologie a permis tout d'abord de réaliser l'identification précise et rapide des bactéries et des levures. Elle a ensuite été appliquée à la détection des résistances bactériennes et à l'identification de champignons filamenteux. Le caractère précis et rapide ainsi que le faible coût en réactifs ont rapidement popularisé cette technologie dans les laboratoires de microbiologie (Croxatto *et al.*, 2012).

Après avoir été établie comme méthode de référence en microbiologie, cette dernière a par la suite été détournée pour identifier des arthropodes. La première étude a démontré l'intérêt du MALDI-TOF pour l'identification des insectes de l'ordre des *Mantophasmatodea*, en se basant sur l'analyse de peptides extraits d'organes neurohémiques (Predel *et al.*, 2005). Cette technologie a ensuite été étendue à d'autres groupes d'arthropodes (*Drosophila melanogaster*, pucerons) (Campbell, 2005; Perera *et al.*, 2005). Après ces travaux pionniers en entomologie, cette technologie a été employée pour identifier différents arthropodes potentiellement vecteurs de maladie pour l'homme et les animaux : *Culicoides*, tiques, moustiques, les mouches tsé-tsé et les puces (Yssouf *et al.*, 2016).

### 1. Principe

Cette méthode est basée sur l'extraction des protéines et des peptides d'un organisme ou d'une partie d'un organisme d'intérêt. Le mélange peptide/protéine obtenu est ensuite placé sur une plaque cible en acier et recouvert d'une matrice *ad hoc*. Cette dernière est constituée généralement d'un composé organique qui va absorber à la même longueur d'onde que celle de la source d'ionisation. Cette matrice va ensuite sécher sur le dépôt et cocrystalliser avec l'échantillon. Le cristal est ensuite

bombardé par un laser qui est la source d'ionisation douce, ce qui provoque la désorption et le transfert d'un proton sur la biomolécule (généralement les protéines et les peptides extraits demeurent intacts et monochargés) (Welker et Moore, 2011). Les molécules désorbées et ionisées sont ensuite accélérées dans un champ électrique et séparées dans un tube de vol selon leur rapport masse/charge jusqu'à ce qu'elles atteignent un détecteur (Croxatto *et al.*, 2012). Ainsi, le temps de vol (ou time of flight en anglais [TOF]) de chaque molécule est mesuré par l'instrument. Le signal est ensuite traduit en spectre de masse (Figure 18 & Figure 19) avec en abscisse le rapport  $m/Z$  proportionnel au temps de vol des différentes protéines/peptides et en ordonnée l'intensité proportionnelle à la quantité de protéines présentes (Welker et Moore, 2011). La gamme de masses analysée par les spectromètres de masse en microbiologie varie entre 2 et 20 kDa. Dans cette dernière, les protéines et les peptides de faibles poids moléculaires sont analysés.

Les spectres de masse générés peuvent être comparés à de véritables empreintes digitales d'une espèce bactérienne, fongique ou d'arthropode. Cette empreinte est ensuite comparée par un algorithme du système informatique de l'instrument à une base de données comprenant les spectres de souches bactériennes de référence ou de spécimen parfaitement identifiés (Croxatto *et al.*, 2012). Le degré de confiance en l'identification proposée par le système informatique est exprimé de façon différente selon les fabricants. Il s'agit d'un pourcentage pour les spectromètres de masse Shimadzu et d'un score allant de 0 à 3 pour les spectromètres de masse Bruker. Ce score prend en compte le nombre de pics similaires entre le spectre de référence et le spectre inconnu ainsi que l'intensité de ces pics.

La Figure 18 présente le principe du MALDI-TOF.

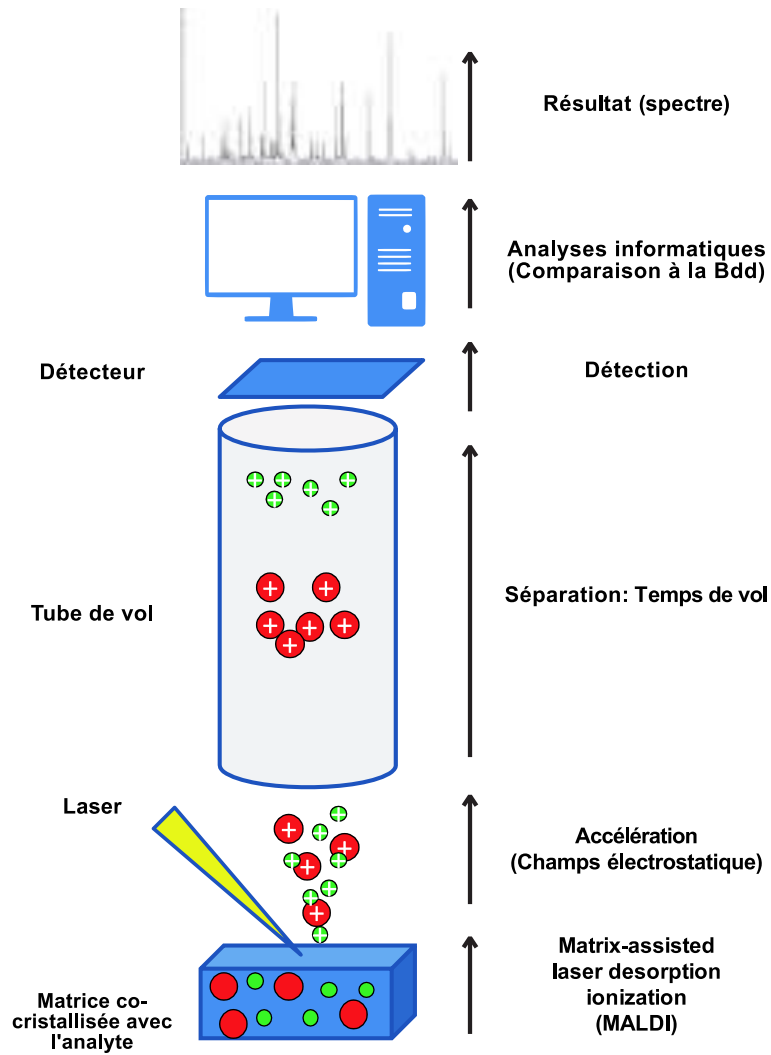


Figure 18 : Principe du MALDI-TOF d'après (Croxatto *et al.*, 2012)

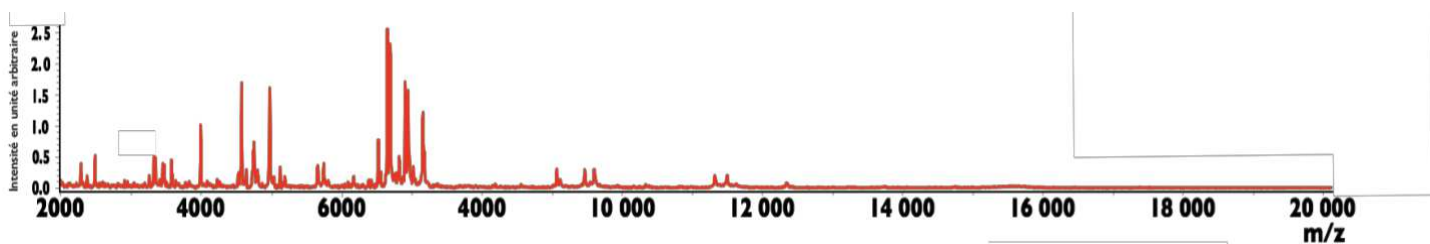


Figure 19 : Spectre de masse des 4 pattes d'*I. hexagonus*

## 2. Base de données spectrale

### a) Création de la base de données

Avant d'identifier un spécimen sur la base de son spectre, il est nécessaire de posséder ou créer une base de données de référence issue si possible de spécimens de référence ou de spécimens parfaitement identifiés. Des logiciels dédiés dépendant du fabricant sont utilisés à ces fins. Pour la société Bruker, il s'agit du MALDI-Biotyper (Bruker Daltonic). Cette base de données est créée avec plusieurs spectres issus de plusieurs spécimens de différentes origines géographiques représentatifs par espèce. Généralement au moins deux spécimens distincts par espèce doivent être inclus dans la base de données de référence ; toutefois, pour accroître la précision de l'identification, il est préférable d'ajouter plusieurs spécimens par espèce. Cinq spécimens sont généralement inclus (Yssouf *et al.*, 2016). Deux critères majeurs doivent être réunis pour créer une base de données et pour que l'identification des spécimens qui en découle se fasse correctement. Il s'agit premièrement, de la reproductibilité des profils pour tous les spécimens d'une même espèce (reproductibilité intra-espèce), quelle que soit la stase ou l'origine géographique et deuxièmement, la spécificité des profils par espèce (spécificité inter-espèce).

### b) Validation de la base de données

Une fois la base de données créée, celle-ci doit être validée par une interrogation de cette dernière avec les spectres de nouveaux spécimens non inclus dans celle-ci et identifiés formellement par une autre technique. Cette procédure est appelée « blind-test » dans la littérature (Yssouf *et al.*, 2016).

La validité de l'identification est modélisée par un système de score. Les valeurs obtenues avec le logiciel MALDI Biotyper vont de 0 à 3. Pour la bactériologie classique, un score seuil de 1,8 est recommandé pour une identification fiable du genre et de 2,0 pour l'attribution probable d'une espèce (Croxatto *et al.*, 2012). Dans le cas de l'identification en entomologie, ce seuil a été abaissé à 1,8 comme pour l'identification des espèces arthropodes (Nebbak *et al.*, 2016, 2017), comme cela peut également s'observer pour l'identification de certains genres bactériens (notamment le genre *Mycobacterium*). Un critère supplémentaire d'une différence minimale de 0,2 entre le score de la meilleure proposition et le score le plus élevé pour la deuxième espèce proposée doit également être satisfait (Kumsa *et al.*, 2016).

### 3. Application à l'identification des tiques

Plusieurs études se sont intéressées à l'identification des tiques. La première a été publiée par Karger *et al.*, (2012) et s'est intéressée à la différence de profil protéique que pouvaient produire les œufs et les différentes stases d'une tique (en utilisant le spécimen entier). Cette étude a révélé que malgré les différences observées en fonction des stases, le premier déterminant permettant de classer les spectres était l'espèce. Les œufs, quant à eux, présentaient un profil très différent et ne pouvaient pas être utilisés pour l'identification. Cependant, la base de données construite lors de ce travail pionnier n'avait pas été testée avec des spécimens non inclus dans cette dernière. D'autres travaux se sont ensuite intéressés à l'identification des tiques de différents pays (Éthiopie, Algérie, France) en utilisant seulement les 4 pattes des tiques comme matrice. L'identification de spécimens non inclus dans la base de données a été correcte, et ce quelle que soit la modalité de conservation (dans de l'alcool ou congelés) (Yssouf *et al.*, 2013; Kumsa *et al.*, 2016; Boucheikhchoukh *et al.*, 2018).

Bien que les protéines faisant partie du spectre de masse ne soient pas identifiées, une similarité entre les spectres issus de l'hémolymphe et des 4 pattes a été mise en évidence (Yssouf *et al.*, 2015a). Cette dernière matrice peut également servir à l'identification des tiques, sans passer par une phase d'extraction des protéines, puisque l'hémolymphe<sup>1</sup> peut être directement déposée sur la cible et recouverte de matrice avant analyse.

Une étude récente a démontré que les profils protéiques issus d'*I. ricinus* de différentes régions d'Allemagne pouvaient être différents, en fonction des conditions climatiques et d'autres facteurs abiotiques (température, humidités...). Cependant, elle ne précise pas si ces modifications entraînent une mauvaise ou une absence d'identification (Karger *et al.*, 2019).

Il est à noter que toutes les études menées jusqu'à présent corroborent le fait que cette méthodologie n'est pas applicable à la réalisation d'analyses phylogénétiques. En effet, il s'agit d'une méthode phénotypique qui ne permet pas de reconstruire l'histoire évolutive des espèces de tiques comme peut le faire l'analyse des séquences d'ADN (Karger *et al.*, 2012; Yssouf *et al.*, 2013; Boyer *et al.*, 2019a).

Enfin, le concept a été poussé plus loin, puisque certains auteurs ont proposé d'identifier d'une part l'espèce de tique et d'autre part le microorganisme potentiellement porté par la tique analysée. Des pics spécifiques pouvant correspondre à des pics majoritaires du spectre protéique de la bactérie hébergée par la tique analysée ont été détectés (Fotso Fotso *et al.*, 2014; Yssouf *et al.*, 2015b, 2015a). Ce concept porte le nom de « dual identification », il a été décrit pour la détection de

---

<sup>1</sup> Fluide circulatoire des arthropodes qui correspond au sang et au liquide interstitiel des vertébrés.

*Borrelia crocidurae* et les tiques *Ornithodoros*, pour *Rickettsia conorii* et *Rhipicephalus sanguineus*, pour *R. slovaca* et *Dermacentor marginatus* (Fotso Fotso *et al.*, 2014; Yssouf *et al.*, 2015b, 2015a). Il est à noter que la technique n'est pas applicable à *B. burgdorferi* et *Ixodes ricinus*, y compris en utilisant l'idiosome comme matrice, du fait du faible inoculum bactérien à l'intérieur de la tique (Boyer *et al.*, 2017a).

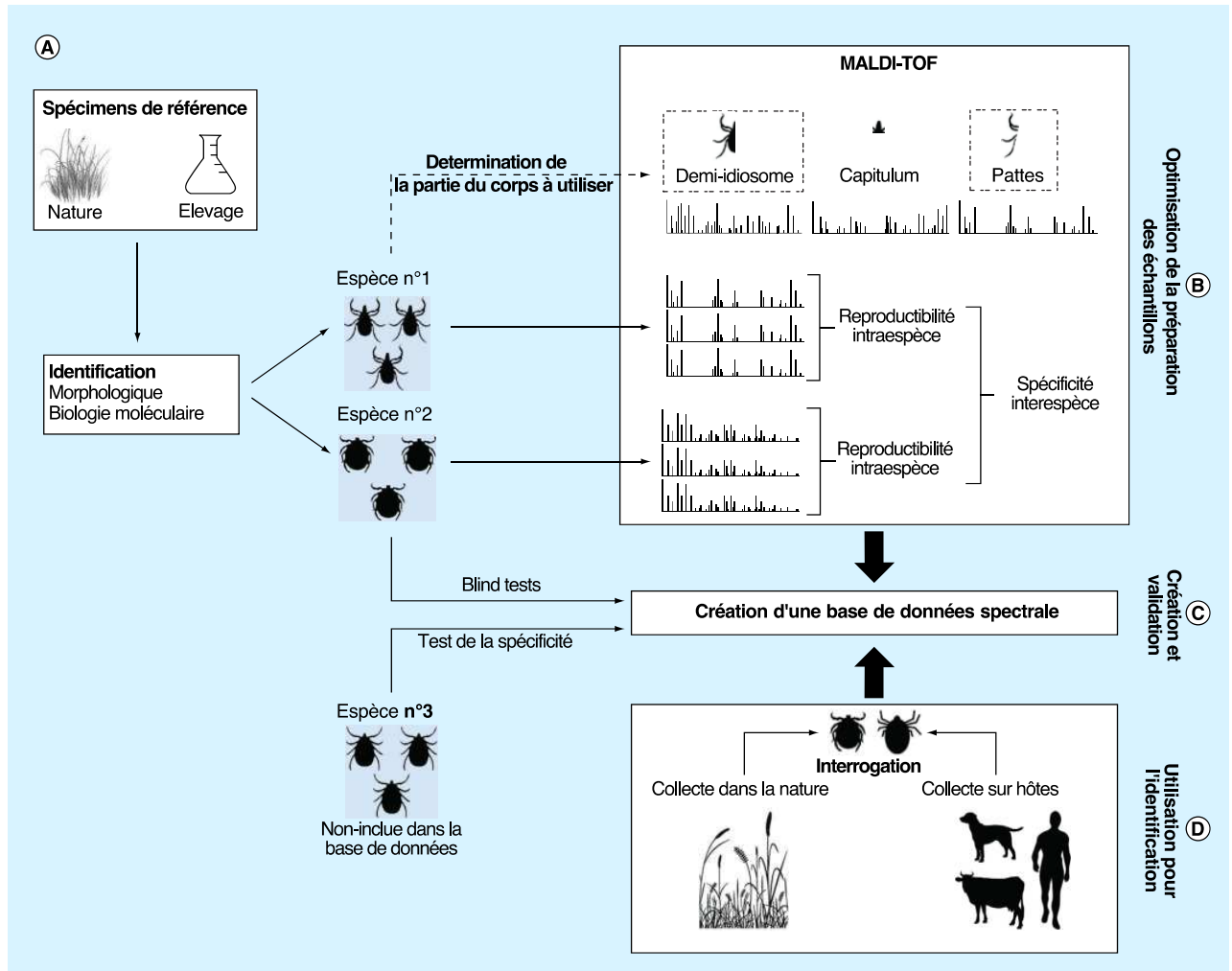


Figure 20 : Stratégie de création, validation d'une base de données et d'utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des tiques (d'après Yssouf *et al.*, (2016))

## **ARTICLE N°1 : IDENTIFICATION OF CLOSELY RELATED *IXODES* SPECIES BY PROTEIN PROFILING WITH MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY**

---

Nos travaux sur le MALDI-TOF et l'identification des tiques ont débuté en 2017, nous nous étions initialement intéressés à la détection par MALDI-TOF des bactéries appartenant au complexe *B. burgdorferi* s.l, responsables de la maladie de Lyme, dans les tiques *I. ricinus* (Boyer *et al.*, 2017a). À l'occasion de ces travaux nous avons testé séparément demi-idiosome, 4-pattes et le capitulum. De façon intéressante, nous avons obtenu des profils identiques pour les 4-pattes et le capitulum, différents de celui du demi-idiosome. Nous avons alors émis l'hypothèse que tester 2 parties du corps permettait de renforcer l'identification par MALDI-TOF.

Après cette étude princeps, nous nous sommes intéressés à l'identification des tiques par MALDI-TOF. En effet comme nous l'avons déjà évoqué, identifier correctement une espèce de tique est fondamental et à la base de toute étude sur les MVT.

Au moment de commencer ce travail, il avait déjà été démontré que l'identification des tiques était possible à partir des 4-pattes. Cependant, les études publiées jusqu'alors avaient été menées sur des tiques appartenant à différents genres ou ne comprenant au mieux que quelques espèces par genre de tique. Notre objectif principal a été de démontrer que le MALDI-TOF permettait l'identification de plusieurs espèces de tiques présentant une parenté phylogénétique importante. Nous nous sommes donc intéressés au genre *Ixodes*, car ces tiques sont susceptibles de transmettre différents microorganismes potentiellement pathogènes, dont les bactéries responsables de la maladie de Lyme : *B. burgdorferi* s.l (thématique d'étude du laboratoire). Au total, neuf espèces de tiques appartenant au genre *Ixodes*, dont trois faisant partie du complexe *I. ricinus* ont été investiguées. Une espèce de *Dermacentor* a été incluse comme genre extérieur. Notre objectif secondaire était de démontrer que le demi-idiosome et les 4-pattes pouvaient être utilisés de manière indépendante pour identifier l'espèce de tique.

Au total, 246 spécimens de tique ont été soumis à l'analyse par spectrométrie de masse, et deux parties du corps (le demi-idiosome et les quatre pattes) ont été étudiées individuellement. Pour chaque partie du corps, la reproductibilité intra-espèce et la spécificité inter-espèces des spectres ont été déterminées. L'analyse a révélé que le principal déterminant du regroupement des spectres était l'espèce de tique, pour les deux compartiments étudiés. Pour chaque partie du corps, une base de données de référence des spectres a été créée, comprenant 2 à 5 spécimens sélectionnés au hasard pour chaque espèce. Pour confirmer l'identification morphologique, les spécimens inclus dans la base de données ont également été génotypés à l'aide du gène de l'ADNr 16S et du COI pour confirmer

leur identification morphologique. Les deux bases de données créées ont été individuellement testées en aveugle avec leur partie du corps respective en utilisant les spécimens restants. Ces derniers ont été correctement identifiés dans 98,5 % des cas.

Le MALDI-TOF possède donc les caractéristiques d'un outil fiable pour l'identification des tiques, y compris les spécimens appartenant à des espèces étroitement apparentées et difficilement distinguables par leur morphologie. Les 4 pattes ainsi que le demi-idiosome des tiques peuvent maintenant être appliqués pour l'identification des spécimens en utilisant deux bases de données différentes. L'utilisation combinée de ces deux parties du corps améliore le taux d'identification des tiques et le niveau de confiance de l'identification.

La base de données spectrale que nous avons constituée pour cette étude est disponible librement et utilisable par tous les laboratoires possédant un spectromètre de masse Bruker. Elle constitue la première pierre vers une base de données plus étendue qui permettra l'identification de la plupart des tiques d'intérêt médical.

Cet article a été publié dans la revue PLoS One en 2019.



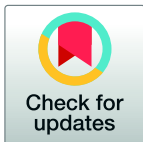
## RESEARCH ARTICLE

# Identification of closely related *Ixodes* species by protein profiling with MALDI-TOF mass spectrometry

Pierre H. Boyer<sup>1</sup>, Lionel Almeras<sup>2,3,4</sup>, Olivier Plantard<sup>5</sup>, Antoine Grillon<sup>1</sup>,  
Émilie Talagrand-Reboul<sup>1</sup>, Karen McCoy<sup>6</sup>, Benoît Jaulhac<sup>1,7</sup>, Nathalie Boulanger<sup>1,7\*</sup>

**1** EA 7290: Early Bacterial Virulence: *Borrelia* Group, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France, **2** Unité Parasitologie et Entomologie, Département Microbiologie et maladies infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France, **3** Aix Marseille Univ, IRD, SSA, AP-HM, VITROME, Marseille, France, **4** IHU Méditerranée Infection, Marseille, France, **5** BIOEPAR, INRA, Oniris, Université Bretagne Loire, Nantes, France, **6** Maladies Infectieuses & Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution & Contrôle (MIVEGEC), Université de Montpellier—CNRS—IRD, Centre IRD, Montpellier, France, **7** French National Reference Center for *Borrelia*, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

\* [nboulanger@unistra.fr](mailto:nboulanger@unistra.fr)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Boyer PH, Almeras L, Plantard O, Grillon A, Talagrand-Reboul É, McCoy K, et al. (2019) Identification of closely related *Ixodes* species by protein profiling with MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS ONE 14(10): e0223735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735>

**Editor:** Ulrike Gertrud Munderloh, University of Minnesota, UNITED STATES

**Received:** May 29, 2019

**Accepted:** September 26, 2019

**Published:** October 17, 2019

**Copyright:** © 2019 Boyer et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Ticks are vectors of infectious diseases of major importance in human and veterinary medicine. For epidemiological studies, accurate identification of ticks is crucial to define their potential role as vectors and to develop control and prevention strategies. Although morphological and molecular methods are widely used to identify ticks, an innovative approach using MALDI-TOF MS technology recently emerged as an alternative tool. Previous works showed that MALDI-TOF MS was highly effective in identifying ticks, but these works mainly tested tick specimens of different genera. To confirm the accuracy of this new tool for tick identification, nine closely related tick species belonging to the *Ixodes* genus were analysed, specimens of the *Dermacentor reticulatus* species were also included in the analysis as an outer group. Three of the species used for the present study belonged to the *I. ricinus* species complex, which are known to transmit *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the causative agent of Lyme borreliosis. A total of 246 tick specimens were submitted to MALDI-TOF MS analysis, and two body parts (half-idiosoma and four legs) were individually investigated. For each body part, intraspecies reproducibility and interspecies specificity of the MS profiles were determined. The profile analysis revealed that the main determinant for spectra clustering was the tick species for both legs and half-idiosoma. For each body part, a reference database of spectra was set up including 2 to 5 specimens per species randomly selected, and genotyped using 16s rDNA and COI genes to confirm their morphological identification. Both created spectral databases were individually blind tested with their respective body part using the remaining specimens, which were correctly identified in 98.5% of the cases. MALDI-TOF MS is a reliable tool for tick identification, including specimens belonging to closely related species and hardly distinguishable using morphology. The 4-legs as well as the half-idiosoma of ticks can now be applied for specimen

identification using two different databases. The combined use of these two body parts improves the rate of tick identification and their confidence level.

## Introduction

Ticks are obligate hematophagous ectoparasites feeding on vertebrate hosts. Although wild and domestic animals are the primary source of tick blood meals, humans can be accidental hosts and are susceptible to several tick-borne diseases (TBDs) [1]. During blood meals of infective ticks, bacteria, viruses, and parasites can be transmitted to vertebrate hosts. Among TBDs affecting humans, Lyme borreliosis is the most prevalent in the Northern Hemisphere [2]. Lyme borreliosis presents as cutaneous (erythema migrans, acrodermatitis, lymphocytoma), articular (Lyme arthritis), and neurological (neuroborreliosis) symptoms. Spirochetes belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) group are the causative agents of Lyme borreliosis and are transmitted by ticks belonging to the *Ixodes* genus [2].

Approximately 244 species are currently part of the *Ixodes* genus [3], but 29 species are recognized as potential vectors of human diseases [4] and only a few are proven vectors of *B. burgdorferi* sl. [5,6]. The main vectors of human Lyme borreliosis are *I. ricinus* and *I. persulcatus* in Eurasia, and *I. scapularis* and *I. pacificus* in North America [2]. Accurate identification of tick species is initially required to evaluate the risk of tick bite exposure and to implement vector control measures [7,8]. Until recently, methods based on morphology and DNA sequencing were the two cornerstones of tick identification [9]. Morphological identification is based on the use of taxonomic criteria included in dichotomous keys [10]. However, this identification tool has several drawbacks [9] as it is time-consuming and as correct morphological identification relies on entomological expertise [11] and specimen integrity. Intraspecific morphological variation can also prevent reliable identification, particularly when using decisive criteria. This phenomenon is particularly frequent with immature stages of ticks (*i.e.*, larvae or nymphs) [12], which are very often collected at these developmental stages.

To overcome the limitations of morphological identification of ticks, molecular identification techniques mainly based on gene amplification and DNA sequencing have increasingly been used over the last decade [13]. The most frequently targeted genes have a mitochondrial origin (*e.g.*, 12S, 16S ribosomal DNA, cytochrome oxidase subunit 1), but nuclear genes are also used (18S ribosomal DNA, internal transcribed spacers 1 or 2) [14]. Despite the effectiveness and accuracy of this approach, no consensus has been reached on selecting a single genetic marker to identify tick species. No universal primers allow for the amplification of a given gene in all species [13]. Finally, the GenBank database is incomplete for some species and can be inaccurate for others (*i.e.*, wrong initial identification). Moreover, molecular biology techniques remain time-consuming and require expensive reagents. Their use is therefore limited to tick monitoring on a large scale.

An alternative approach for arthropod identification, based on protein profiling analysis, has recently been developed [9]. Using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), unknown specimen identification is performed by comparing the MS spectrum of these specimens – representing a fingerprint of the arthropod's most abundant proteins – with reference MS spectra database of known species. The accuracy of specimen identification relies on how well the MS spectrum matches the spectrum of a known species. This proteomic tool has already been used for the identification of several arthropod families such as biting midges, fleas, sand flies, mosquitoes, and ticks [9]. This fast

and reliable method is now emerging for the identification of arthropods [15,16]. Nevertheless, several factors such as storing mode (alcohol-preserved or fresh specimens), engorgement status [17], or standardization method of samples can alter the reproducibility of species-specific MS spectrum protein profiles [18]. Standardization and automatization of protocols increase the intraspecies reproducibility and interspecies specificity of MS profiles [19,20]. The development of this optimized protocol for sample preparation underlined the importance of upgrading the reference MS spectra database with samples processed under the same conditions. Moreover, it was recently demonstrated that legs and half-idiosoma of *I. ricinus* generated specific MS spectra [21]. Each of these two body parts can be used for tick identification by MS, which could improve the accuracy of specimen identification despite slight variations observed according to environmental or spatiotemporal conditions [22].

Based on enhanced preparation guidelines, the present study aimed to create and validate a primary MS spectra reference database for the identification of closely related tick species of the *Ixodes* genus using legs and half-idiosoma. A total of 10 distinct tick species were selected including nine tick species of the *Ixodes* genus among which three species belonged to the *I. ricinus* complex [23] (*I. ricinus*, *I. persulcatus*, and *I. scapularis*). Ticks of this complex play a key role in the transmission of spirochetes of the *B. burgdorferi* sl complex to humans [2] and several other TBDs such as *Anaplasma phagocytophilum* infections, *Babesia* spp. infections, and tick-borne encephalitis virus infections [10]. The added value of this MS reference database for rapid and accurate entomological diagnosis of tick specimens is here discussed in the context of TBDs. Materials and methods.

### Ticks sampling and morphological identification

Adult and nymphal ticks were either laboratory reared or collected in the field (on or off the vertebrate host). Laboratory-reared ticks were maintained in climatic chambers (25°C, with a relative humidity of 80–90%) and successive generations were obtained by feeding the ticks. Wild caught ticks were either collected by dragging a white flannel flag (1x1 m) over low vegetation, or were sampled from the host animals. Ticks were sampled in several countries and were sent alive at room temperature or frozen. The stage and sex of the collected ticks were determined by morphological identification under a binocular microscope at a magnification of ×56 (Leica M80, Leica, Nanterre, France) using standard taxonomic keys [24–26]. For *I. ricinus* and *D. reticulatus* specimens were collected at different geographic places and different months of the year (Table 1).

### Tick dissection and sample preparation

Each tick was rinsed once with 70% (v/v) ethanol then twice with distilled water as previously described [27]. After drying, the specimen was dissected with a sterile surgical blade. Four legs were removed and the idiosoma was longitudinally cut in two equal parts. Legs and the half-idiosoma were used independently for MALDI-TOF MS analyses.

### DNA extraction

DNA of each half idiosoma with legs was individually extracted with ammonium hydroxide (Sigma-Aldrich) as previously described [28,29]. Purified DNA from each tick was stored at -80°C until use.

### Molecular identification of ticks

To confirm morphological identification, all the specimens included in the database were genotyped using the COI gene and 16s rDNA gene. For the COI gene, Cox1F (5' -GGAACAATA

Table 1. Details of tick collection classified by species.

	Geographical origin	Number of specimens	Tick stages (Adult (sex <sup>#</sup> )/Nymph/Larva)	Number of specimens engorged
<i>I. ventalloi</i>	Nantes region, France	17	15 (8M/7F) / 2 / 0	7
<i>I. ricinus</i>	Alsace & Ain, France	109	13 (6M/7F) / 93 / 3	14
<i>I. persulcatus</i>	Riga, Latvia	18	14 (9M/5F) / 4 / 0	0
<i>I. scapularis</i>	Rhode Island, USA	27	27 (10M/17F) / 0 / 0	0
<i>I. acuminatus</i>	Nantes region, France	13	4 (0M/4F) / 9 / 0	0
<i>I. uriae</i>	Hornøya, Norway	13	8 (4M/4F) / 5 / 0	0
<i>I. vespertilionis</i>	Nantes region, France	4	4 (2M/2F) / 0 / 0	0
<i>I. hexagonus</i>	Nantes region, France	28	16 (0M/16F) / 12 / 0	28
<i>I. frontalis</i>	Nantes region, France	4	2 (0M/2F) / 2 / 0	4
<i>D. reticulatus</i>	Alsace & Ain, France	13	13 (7M/6F) / 0 / 0	0
<b>Total</b>		246	116 (40M/76F)/127/3	53

<sup>#</sup>M (male), F (female).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.t001>

TATTTAATTTTTGG-3') and Cox1R (5'-ATCTATCCCTACTGTAAATATATG-3') [13] were used as forward and reverse primers respectively, the predicted size of the product was around 800 bps. For the 16s rDNA a fragment with a predicted size of 400 bps was amplified by PCR, using 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3' as the forward primer and 5'-GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT-3' as the reverse one [30]. PCR amplifications were performed on GenAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using a HotStartTaq (Qiagen, Les Ulis, France). The PCR program for the COI amplification included an initial denaturation step of 15 min at 94°C, followed by 10 cycles of denaturation at 92°C for 1 min, annealing at 42°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min 30 s, followed by 32 cycles of denaturation at 92°C for 1 min, annealing at 46°C for 35 s, and elongation at 72°C for 1 min 30 s, followed by a final elongation at 72°C for 7 min. For the 16s rDNA, the protocol was: 15 min initial denaturation at 94°C, followed by 7 cycles of denaturation at 92°C for 30 s, annealing for 30s with an annealing temperature increased by 0.3°C every second cycle from 47 to 48.8°C, elongation for 45s at 72°C, followed by 28 cycles with an annealing temperature of 50°C and finally a 7 min extension step at 72°C. The success of the PCR amplification was checked by performing agarose gel electrophoresis. After purification, amplicons were sequenced with the primer used for amplification on an ABI 3730 XL system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as previously described [31]. Quality of sequences was assessed by inspecting the chromatogram with SeqTrace [32], then the forward and reverse sequences were assembled and converted into high-quality finished DNA sequences using the SeqTrace software [32]. The sequences were compared with sequences from GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### Phylogenetic analyses

After gene sequences alignment with the Clustal ω2 algorithm in the MEGA 7.0 software, two maximum likelihood trees based on the 16s rDNA or the COI gene were constructed using the MEGA 7.0 software. The most appropriate model was determined with the modified Akaike criterion calculated with IQ-TREE tool available at <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>. The general time reversible model, with gamma distributed rate variation across sites and a proportion of invariable sites, was selected for the phylogenetic analysis. Support for internal nodes was estimated using the nonparametric bootstrap method with 100 replications.

## MALDI-TOF MS analyses

**Sample preparation.** The four legs and half-idiosoma of each tick specimen were homogenized separately using an automated grinding method, the FastPrep-24 device (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) with a small amount of glass beads (with a diameter  $\leq 106 \mu\text{m}$ ) (Sigma, Lyon, France). The device settings were identical to those previously established as optimal for ticks [20]. For tick legs, a mix of 20  $\mu\text{L}$  of 70% (v/v) formic acid (Sigma) plus 20  $\mu\text{L}$  of 50% (v/v) acetonitrile (Fluka, Buchs, Switzerland) was used. For half-idiosoma, 30  $\mu\text{L}$  of 70% (v/v) formic acid (Sigma) and 30  $\mu\text{L}$  of 50% (v/v) acetonitrile were used.

After sample homogenization, a quick centrifugation at 200 g for 1 min was done to pellet debris, and 1  $\mu\text{L}$  of the supernatant of each sample was spotted on the MALDI-TOF steel target plate in quadruplicate (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). After drying, each spot was coated with 1  $\mu\text{L}$  of matrix solution composed of saturated  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma, Lyon, France), 50% acetonitrile (v/v), 2.5% trifluoroacetic acid (v/v) (Aldrich, Dorset, UK) and HPLC-grade water. The target plate was then air-dried for a few minutes at room temperature prior to being introduced in the Microflex LT MALDI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics) for analysis. To control matrix quality, sample loading, and MALDI-TOF apparatus performance, the matrix solution was deposited in duplicate onto each MALDI-TOF plate with and without bacterial control (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

**MALDI-TOF MS parameters.** Protein mass profiles of each tick body part were generated using a Microflex LT MALDI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Germany), with detection in the linear positive-ion mode at a laser frequency of 50 Hz within a mass range of 2–20 kDa. The acceleration voltage was 20 kV, and the extraction delay time was 200 ns. Each spectrum corresponded to ions obtained from 240 laser shots performed in six regions of the same spot and automatically acquired using the AutoXecute method with the default parameters of the flexControl v3.4 software (Bruker Daltonics). The spectrum profiles were visualized with flexAnalysis v3.4 software, MALDI biotyper Compass Explorer v4.1.70 (Bruker Daltonics, Germany) and ClinProTools v3.0 software (Bruker Daltonics) for data processing.

**Spectra analyses.** The MS spectra resulting from automatic protocols were first visually controlled by the flexAnalysis v3.4 software. Then, to assess intra-species reproducibility by body part, spectra were loaded on ClinProTools v3.0 software. Next, the MS profile specificity was assessed, using the following method. The four spectra of two to five specimens per species underwent an MSP (Main Spectra Projection) processing using the manufacturer's method. Cluster analysis using the MSP dendrogram function of MALDI biotyper Compass Explorer v4.1.70 software was performed. Briefly, it is based on the comparison between the MSP given by the MALDI-Biotyper software and clustered according to protein mass profile (i.e., their mass signals and intensities) and the resulting MS dendrogram illustrating how samples are related to each other. The reproducibility and the specificity of the MS profiles according to the body part per species were also assessed based on a Principal Component Analysis (PCA). The PCA tool of the ClinProTools software was used with the manufacturer settings. The composite correlation index (CCI) tool from MALDI biotyper Compass Explorer software was used to assess the spectral variations within and between each sample group, according to the body part. Correlation values (expressed as the mean  $\pm$  standard deviation, SD) reflecting reproducibility for the MS spectra, were used to estimate MS spectra distance between species for each body part.

**Reference database creation.** Based on the consistency of the morphological and molecular results of tick identification, two to five specimens per species and body part were used to create reference MS spectra database (S1 File). Legs and half-idiosoma from each tick species

exhibiting reproducible and specific MS spectra were then included in a MS spectra reference database. To create the database, MSP reference spectra were included using spectra from two to five specimens per species. Average spectra (MSP, Main Spectrum Profile) were created by combining the four spectra of one tested sample, using the automated function of the MALDI-Biotyper software (Bruker Daltonics). MSP were created on the basis of an unbiased algorithm using peak position, intensity and frequency data using the default parameter set of the “Bio Typer MSP Creation Standard Method”. Briefly, the maximum mass error of each single spectrum was 2000 Da, the desired mass error for the MSP was 200 Da, the desired peak frequency minimum was 25% and the maximum desired peak number for the MSP was 70.

**Assignment of discriminating peaks.** To assign discriminating peaks according to tick species by body-part, MS spectra from each species and both body-parts were imported into ClinProTools software. The software was used to generate a peak list for each species per body-part in the 2 to 20 kDa mass range and to identify discriminating peaks. The settings in ClinProTools software for spectrum preparation were the following: a resolution of 300; a noise threshold of 2.00; a maximum peak shift of 800 ppm and a match to calibrating agent peaks of 10%. Peak calculation and selection were performed on individual spectrum with a signal-to-noise threshold of 2.00 and an aggregation of 800 ppm. The spectra were then analysed using the genetic algorithm (GA) model using the default parameters, which displays a list of discriminating peaks. The maximum number of peaks in the model was set to 150 the maximum number of generations was set to 250 and the number of neighbours was five for K nearest neighbours (KNN) classification. Manual inspection and validation of the selected peaks by the operator gave a recognition capability (RC) value together with the highest cross-validation (CV) value. The presence or absence of all discriminating peaks generated by the GA model was controlled by comparing the average spectrum of each species per body-part.

**Blind tests.** A blind test was performed with the remaining tick specimens not included in the reference MS spectra databases. A total of 808 and 624 MS spectra from tick legs and half-idiosoma were tested against their respective reference spectra database. The reliability of tick species identifications was estimated using the log score values (LSVs) obtained from the MALDI-Biotyper software, which ranged from 0 to 3. These LSVs correspond to the degree of similarity between the MS reference spectra in the database and those submitted by blind tests. A LSV was obtained for each spectrum of the samples tested. According to previous studies [19,20], an LSV of at least 1.8 should be obtained to be considered reliable for species identification. As proposed by Kumsa et al. [33], an additional criterion of a 0.2 minimum difference between the score of the best species match and the second species match score was required. To test the specificity of the generated MS profiles, all spectra were queried against the commercial bacteria database (Bruker Daltonics) including MSPs from new bacterial species or strains found in the laboratory (library of 7393 MSPs, database from November, 8, 2017) using MALDI biotyper Compass Explorer v4.1.70 software.

## Ethical statement

The protocols to maintain tick colony (N° APAFIS 886–2015062209279407) and for blood feeding of wild ticks (N° APAFIS 6040–2016111411067314) were approved by the Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS—Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Strasbourg). Ethical approval of the collection of *I. uriae* from seabirds was obtained from the Norwegian National Food and Safety Authorities (ID 8947) and the Finnmark county government (Fylkesmannen). The authority who issued the permission to collect ticks from public locations was the ONF (Office National des forêts, France). Privately owned areas were sampled after agreement with the



owners. Ticks were not collected from endangered or protected species except hedgehogs. Hedgehogs (on which *I. hexagonus* specimens were sampled) and blackbirds (on which *I. frontalis* specimens were sampled) were brought by civilians to Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire a wildlife health centre Near Nantes. To grant animals an easy and complete recovery, all ectoparasites are removed on arrival at the center as a standard procedure.

All the protocols listed above follow the European directive 2010/63/EU and were performed in animal facilities N° A67-482-34.

## Results

### Morphological and molecular identification

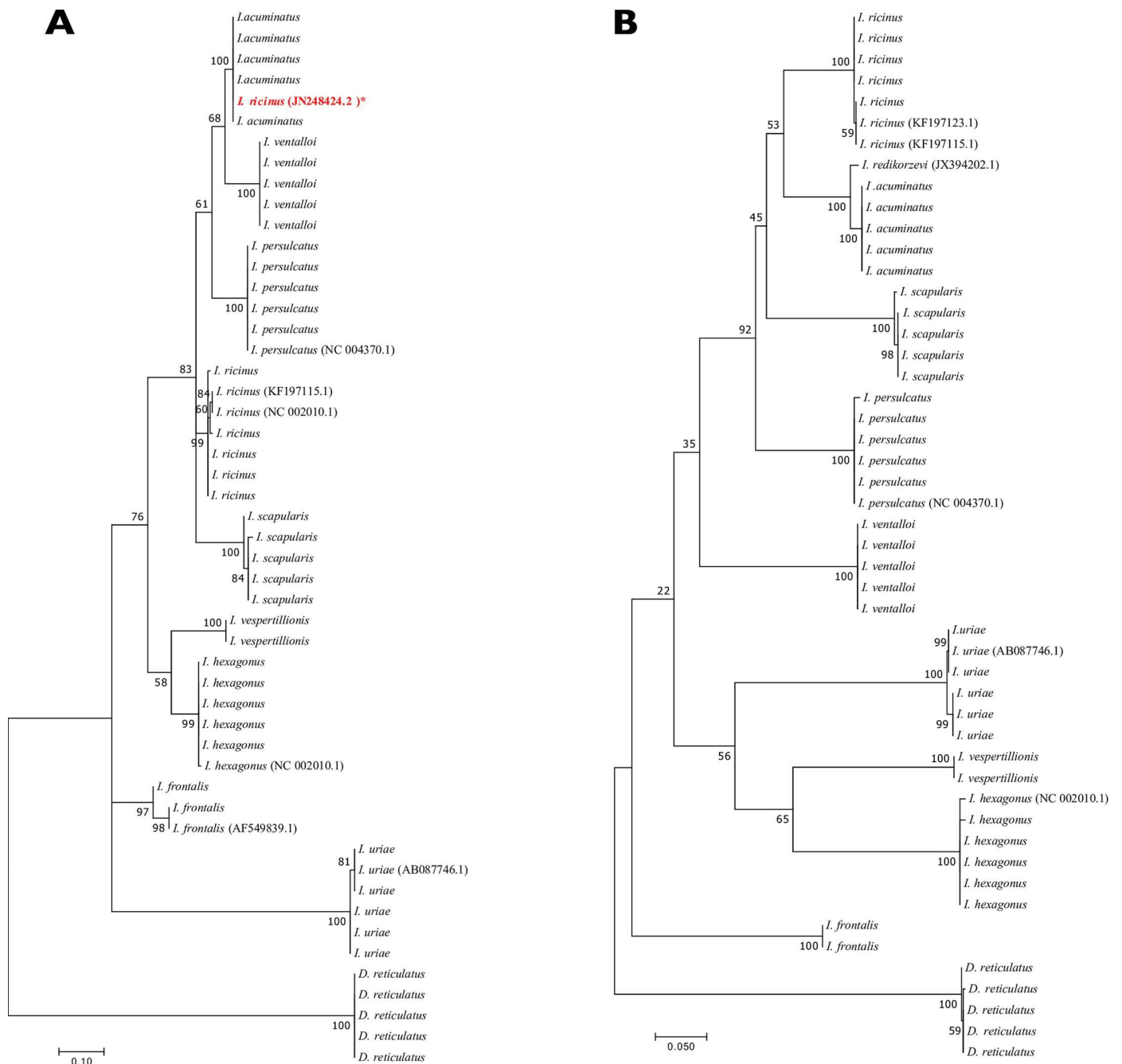
A total of 246 ticks were included in the present study. Ticks were collected from the field ( $n = 174$ ), on animals ( $n = 57$ ), and from laboratory rearing colonies ( $n = 15$ ). Morphological identification revealed that all specimens investigated belonged to nine different species of the *Ixodes* genus (*I. ventalloi*, *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis*, *I. acuminatus*, *I. uriae*, *I. vespertilionis*, *I. hexagonus*, *I. frontalis*), except for 13 specimens of *Dermacentor reticulatus* ticks. Data on tick sampling, including species, sex type, developmental stage, and origin, are summarized in [Table 1](#) and [S1 Table](#).

To confirm morphological identification, 44 of the 246 specimens (2 to 5 specimens per species) were selected at random for molecular analysis. A GenBank query indicated that 16s rDNA and COI gene sequences were available for all species except for *I. acuminatus*. Sequencing and comparisons with GenBank database of the 16s rDNA gene and COI gene, using the BLAST functionality, revealed reliable and coherent tick species identification according to morphological data ([Fig 1](#) and [Table 2](#)). Interestingly, using a BLAST analysis *I. acuminatus* COI sequence matched at 98% with a COI sequence of *I. redikorzevi*. Surprisingly, interrogating the GenBank database with 16s rDNA sequence obtained from the *I. acuminatus* specimens revealed 100% similarity with a single sequence of *I. ricinus* (Accession number JN248424.2). These results confirmed the reliability of morphological identifications. The sequences obtained for each species were submitted to the GenBank database, detailed accession numbers are summed up in the [S2 Table](#).

### Reproducibility and specificity of MALDI-TOF MS spectra according to *Ixodes* tick species and body parts

To control the reproducibility and specificity of MS spectra according to tick species and body parts (44 legs and 37 half-idiosoma), the 44 specimens morphologically identified and confirmed by molecular biology technique were selected ([Table 2](#)). As all *I. hexagonus* and *I. frontalis* specimens were collected from hosts, they were all engorged. It has already been reported that blood contained in the tick's gut interferes with MS spectra reproducibility and quality [[17,27](#)]. Only the legs of these two tick species were submitted to MS analysis. The MS spectra obtained were visually distinct between species and body parts ([Fig 2](#)). Clustering analyses of MS spectra from legs ([Fig 3A](#)) and half-idiosoma ([Fig 3B](#)) showed that all specimens of the same species gathered together on the same cluster.

To confirm reproducibility and specificity of MS spectra according to body parts by species, PCAs were performed ([Fig 4](#)). PCAs revealed clustering in two groups of the dots corresponding to MS spectra from legs and half-idiosoma. This finding supports the specificity of MS profiles between these two body parts for each of the eight species tested. Collectively, these results yielded unique reproducible MS spectra for each tick species tested according to body parts.



**Fig 1. Unrooted maximum-likelihood trees based on the sequences of the 16s rDNA gene (A) and the COI gene (B) of the 44 specimens included in the database and GenBank sequences.** \* A GenBank sequence attributed to *I. ricinus* (Accession number JN248424.2) clustered with *I. acuminatus* on the 16s rDNA gene tree.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.g001>

CCI matrix also revealed the correlation of MS spectra between specimens of the same species per body parts ( $0.57 \pm 0.23$  for legs;  $0.57 \pm 0.24$  for half-idiosoma; [S2 Fig](#)). Conversely, lower CCI were obtained between *Ixodes* species and body parts ( $0.13 \pm 0.08$  for legs and  $0.14 \pm 0.07$  for half-idiosoma; [S2 Fig](#)) confirming the reproducibility and specificity of protein profiles according to tick species and body part.



**Table 2. Details of the 44 specimens included in the reference database and homology to the reference sequences using BLAST.**

Tick species	Tick stages (Adult (sex <sup>*</sup> )/Nymph)	Status	Origin	16s rDNA interrogation			COI interrogation		
				Identified species	% of identity	Accession number	Identified species	% of identity	Accession number
<i>D. reticulatus</i>	3F/2M/0N	Unengorged	Field	<i>D. reticulatus</i>	99–100%	KR870969.1-KX881100.1	<i>D. reticulatus</i>	99–100%	AF132829.1
<i>I. acuminatus</i>	2F/0M/3N	Unengorged	Lab breed	<i>I. ricinus</i>	100%	JN248424.2	<i>I. redikorzevi</i>	98%	JX394202.1
<i>I. frontalis</i>	1F/0M/1N	Engorged	Animal	<i>I. frontalis</i>	99–100%	KP769862.1	<i>I. frontalis</i>	99%	KU170492.1
<i>I. hexagonus</i>	2F/0M/3N	Engorged	Animal	<i>I. hexagonus</i>	99–100%	KJ414454.1-KP769862.1	<i>I. hexagonus</i>	99–100%	MG432679.1-AF081828.1
<i>I. persulcatus</i>	1F/4M/0N	Unengorged	Field	<i>I. persulcatus</i>	99–100%	KP283020.1	<i>I. persulcatus</i>	99–100%	AB073725.1
<i>I. ricinus</i>	2F/2M/1N	Unengorged	Field	<i>I. ricinus</i>	99–100%	AB819253.1-KP283020.1	<i>I. ricinus</i>	99–100%	KF197132.1-KF197134.1
<i>I. scapularis</i>	3F/2M/0N	Unengorged	Field	<i>I. scapularis</i>	99–100%	KF146643.1-KR092230.1	<i>I. scapularis</i>	100%	KC488301.1-KC488313.1
<i>I. uriae</i>	2F/0M/3N	Unengorged	Field	<i>I. uriae</i>	100%	AB087746.1-D88298.1	<i>I. uriae</i>	99–100%	AB087746.1-KX360345.1
<i>I. ventalloi</i>	0F/5M/0N	Unengorged	Field	<i>I. ventalloi</i>	100%	MG210720.1-KY231931.1	<i>I. ventalloi</i>	99%	KU178964.1
<i>I. vespertilionis</i>	1F/1M/0N	Unengorged	Field	<i>I. vespertilionis</i>	99%	KM455967.1	<i>I. vespertilionis</i>	99%	KR902758.1

\*M (male), F (female)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.t002>

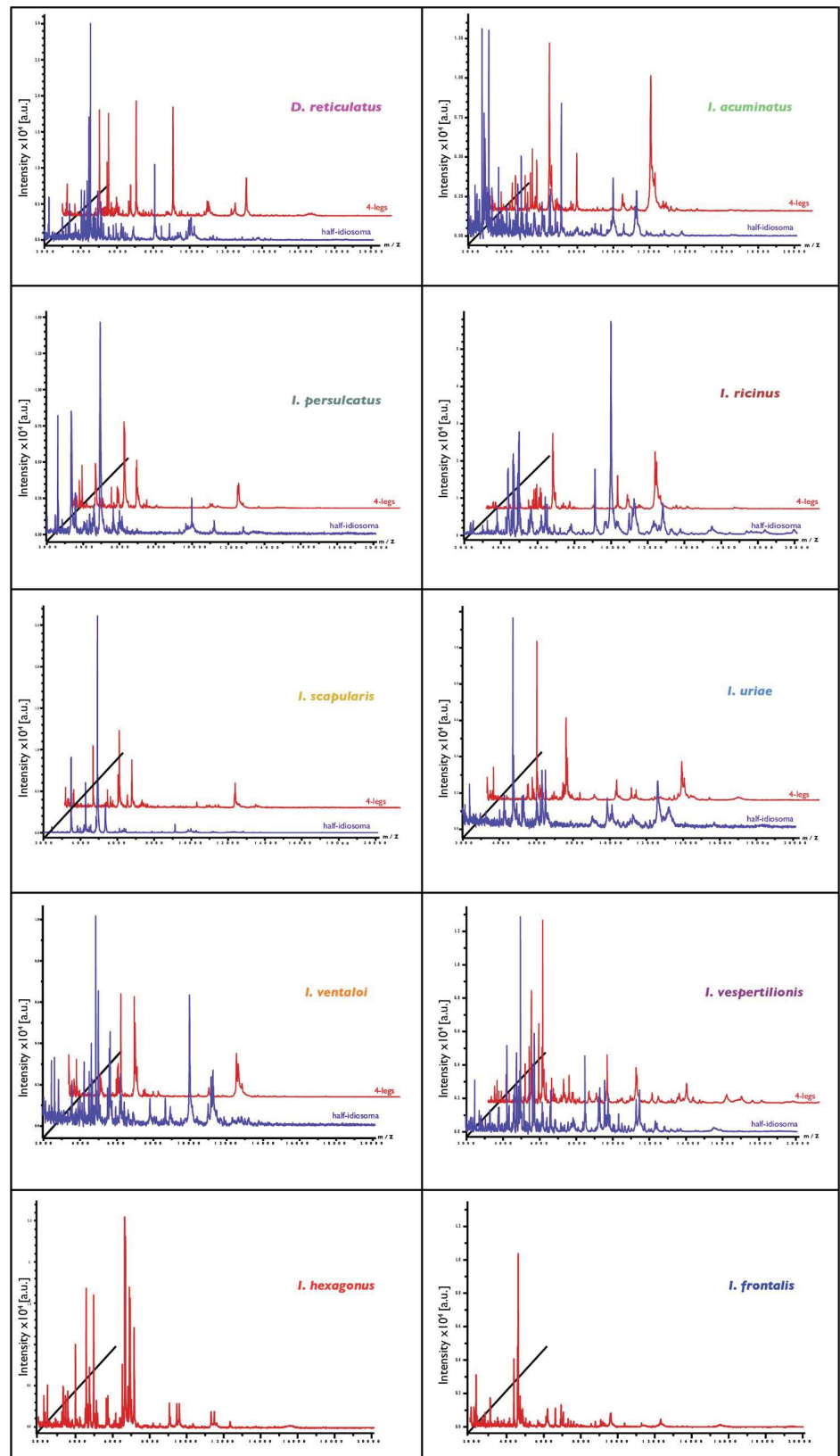
**Assignment of discriminating peaks.** To identify discriminatory peaks among the nine *Ixodes* tick species for each body part, the Genetic Algorithm (GA) tool from ClinProTools™ software was used. The GA model exhibited a pattern of 67 and 88 discriminatory mass peaks between *Ixodes* tick species for legs and half-idiosoma, respectively (S3 & S4 Tables and S1 Fig). The presence or absence of these discriminatory peaks per tick species displayed RC and CV values of 100% and 95.8%, respectively, for MS spectra from legs. For MS spectra from half-idiosoma, RC and CV values of 100% and 99.5% were obtained, respectively (Table 3).

### Blind tests

Accuracy of tick identification by MALDI-TOF MS was tested using 202 morphologically identified specimens representing the 10 tick species included in the MS reference database. The query of the MS database with MS profiles for legs showed that 96.5% of the specimens (n = 195/202) obtained an LSV of 1.8 or higher corresponding to the threshold defined for relevant identification; thus, confirming the morphological classification (S1 Table). The four-leg MS analysis confirmed the morphological identification for six of the seven specimens which did not reach the LSV threshold.

The 46 engorged ticks were excluded from half-idiosoma MS analysis. The rate of relevant (LSV >1.8) identifications using half-idiosoma MS spectra queried against the MS database was >91.0% (n = 142/156). Concordance of tick species identification between morphological and MS analyses was obtained for all half-idiosoma MS spectra queried against the MS database reaching the LSV threshold (S1 Table and Table 4).

To assess the risk of tick species misidentification using MALDI-TOF MS, the differences in LSVs (dLSVs) between the first and second top distinct species identified for each body part were calculated (S1 Table and Table 4). The dLSVs of *Ixodes* ticks ranged from 0.73 to 1.41 for legs and from 0.22 to 1.44 for half-idiosoma. As these values were expressed in logarithmic



**Fig 2. Comparison of MALDI-TOF MS spectra from the four legs (in red) and half-idiosoma (in blue).** Representative MS spectra of legs and half-idiosoma of ticks, automatically standardized using FastPrep-24, are shown. Respective tick species and body parts are indicated on the right part of each spectrum. a.u., arbitrary units; m/z, mass-to-charge ratio.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.g002>

scale, these differences could be considered substantial. Moreover, the query of legs and half-idiosoma against the commercial bacteria MS spectra database revealed no cross-identification. This confirms the specificity of the MS profiles. All LSVs were lower than the significant threshold of 1.8.

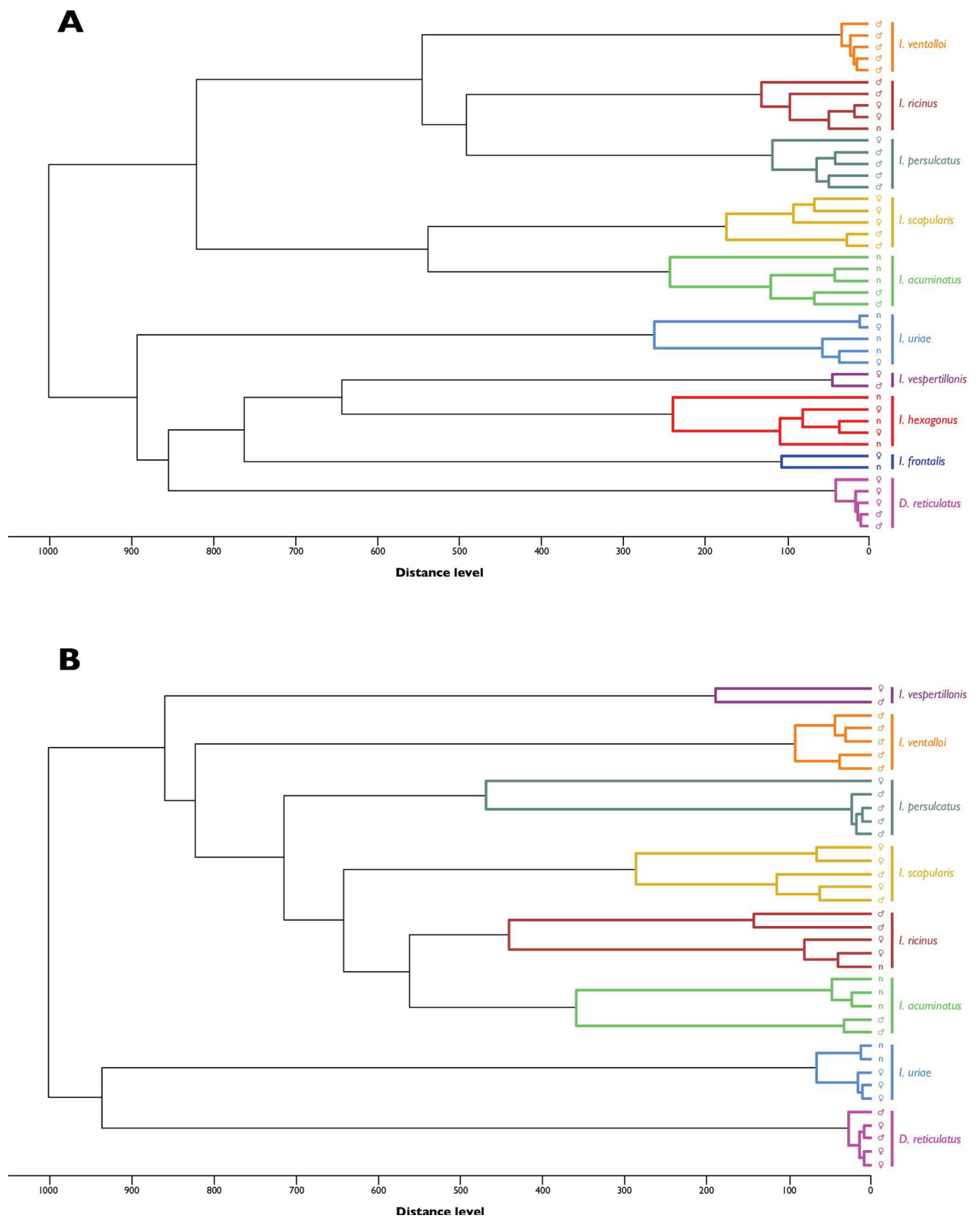
Interestingly, the combination of MS identification results from legs and half-idiosoma increased the rate of relevant identifications to 99.4% (n = 155/156) for specimens for which both body parts were submitted to MS analysis (Fig 5). Species identification for each body part was 100% concordant and corroborates morphological identification. The only tick identification considered unreliable (LSVs of 1.63 and 1.59 for legs and half-idiosoma, respectively) was classified as *I. ricinus* according to both body parts; thus confirming the morphological result. Finally, among the 202 tick specimens submitted to MS analysis for identification, only three failed to reach the LSV threshold value for relevant identification, with at least one of the body parts. The legs or both body parts validated the morphological identification for two of them, and the remaining specimen morphologically classified as *I. ventalloi* was classified by leg MS spectra as *I. ricinus*. The low MS identification score (LSV = 1.42) reflected the poor quality of the respective MS spectra with few MS peaks of low intensity (<2,000 arbitrary units). The global proportion of relevant identifications was 98.5% (n = 199/202). This rate can be considered very interesting as nine tick species belonged to the same *Ixodes* genus, including several species with very close morphological features, especially at the nymphal stages.

## Discussion

MALDI-TOF MS profiling emerged a decade ago as an innovative strategy for rapid, low-cost identification of arthropods, especially for vectors of infectious diseases [9,17,34,35]. Contrary to genome which is identical for all body parts of specimens, MS spectra are different according to body parts (legs, capitulum, idiosoma) [36], and other factors can modify them such as the blood-engorged status [17], or infectious status [37–39]. To facilitate comparisons and to share MS spectra database, guidelines for sample preparation, storing modes, or body part selection were developed for some arthropod families [19,20]. MALDI-TOF MS technology has so far been successfully used for identifying fresh [17] or alcohol-preserved tick specimens [18,40] using ticks' legs as biological material. However, databases built for these studies have only included a few tick species belonging to the same genus. Effective assessment of this innovative tool's effectiveness in correctly classifying closely related tick species was thus difficult.

In order to improve the rate and accuracy of MS identification, two distinct body parts (legs and half-idiosoma of ticks) were submitted to MS analysis. A previous study comparing MS profiles from various *I. ricinus* body parts reported distinct protein patterns between legs and half-idiosoma from this species of ticks [21]. The present study thus assessed whether half-idiosoma could also be used as a relevant body part for tick species identification using a MALDI-TOF MS profiling strategy and whether it could improve identification accuracy. Legs and half-idiosoma of ticks are therefore proposed to be systematically submitted to MS analysis to improve reliability of tick species identification.

Reproducible interspecies-specific MS spectra were obtained for each tick species. Although variations occurred according to sex type or developmental stages, no clear distinction was observed on the MSP dendrograms among specimens of the same species according to sex

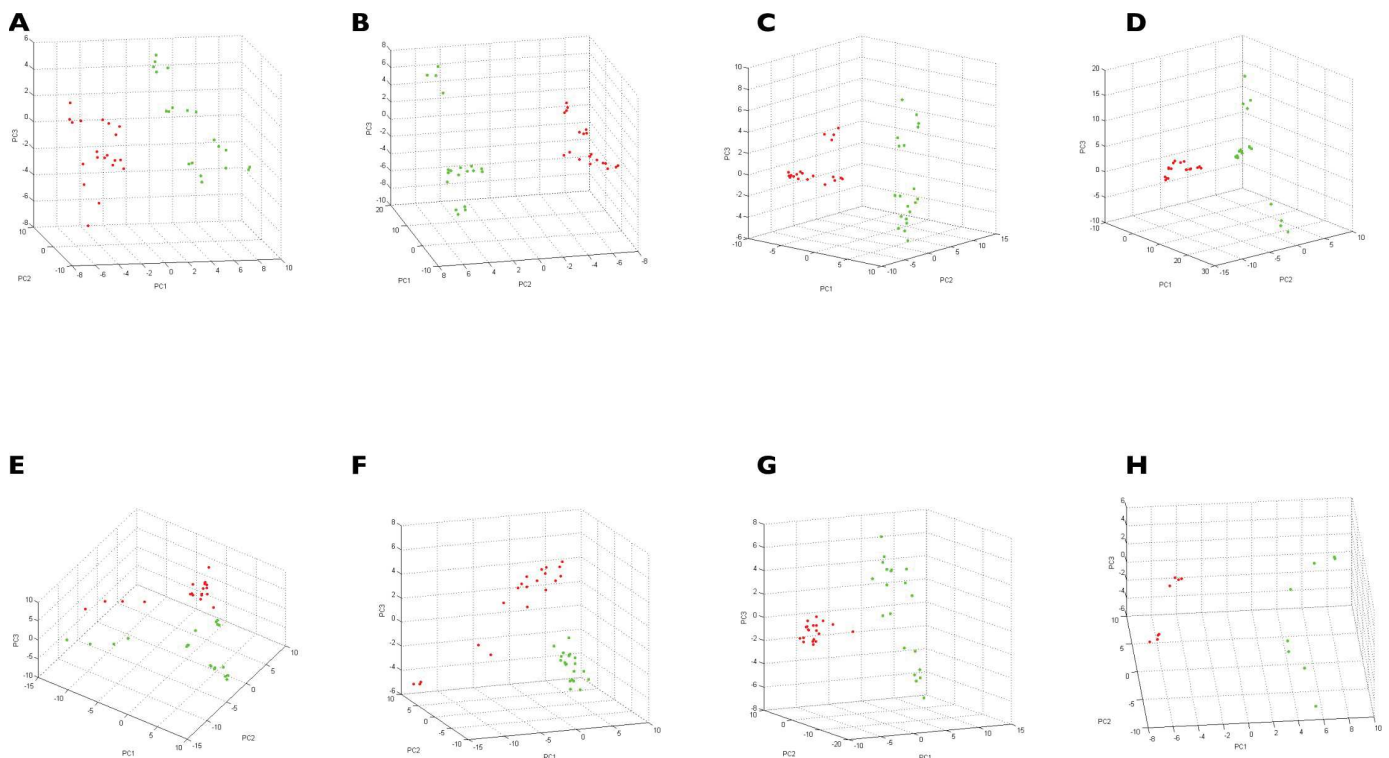


**Fig 3. MSP dendrograms of MALDI-TOF MS spectra from legs (A) and half-idiosoma (B) of ticks.** Two to five specimens per tick species were used to construct MSP dendrograms. Dendrograms were created using MALDI Biotyper Compass Explorer v4.1.40 software, and distance units represent the relative similarity of MS spectra. The same color code is used for each tick species. Genders of adult ticks are indicated by symbols and “n” corresponds to the nymphal stage.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.g003>

type (male vs. female) or developmental stages (adults vs. nymphs). These results reveal the lower impact of these factors on MS profiles and suggest that the main determinant of MS profiles is the species. Karger et al. [17] previously observed this phenomenon by comparing MS spectra from ticks at various developmental stages or sex type using whole specimens.

The comparison of dendrograms from legs and from half-idiosoma showed that the topology of the trees is different despite the use of paired body parts. The present results confirmed that half-idiosoma have similar characteristics as legs, and are relevant for tick species identification by MS. Distinct topologies of the MSP dendrograms between paired legs and half-idiosoma from tick specimens also suggested that each body part generates distinct reproducible MS spectra. PCA analyses confirmed the singularity of MS profiles for each body part from each tick species. The reproducibility and specificity of protein profiles per tick species and per body part were objectified by CCI, suggesting that each body part can be tested in an independent manner. Reference MS database query with protein profiles from legs and half-idiosoma from the same tick specimen thus constitutes a double-independent species identification. This double tick species identification checking is frequently performed by sequencing two or more distinct gene targets using molecular tools, as performed in the present study to improve the accuracy of molecular identification [7].



**Fig 4. Assessment of MS spectra specificity according to species and body parts using principal component analysis.** MS spectra from the legs and half-idiosoma of ticks were analyzed by species using the PCA tool. Red dots represent spectra of the four legs and green dots represent spectra of the half-idiosoma. (A) *D. reticulatus* (B) *I. acuminatus* (C) *I. persulcatus* (D) *I. ricinus* (E) *I. scapularis* (F) *I. uriae* (G) *I. ventalloi* (H) *I. vespertilionis*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.g004>

**Table 3. Performance of the genetic algorithm based on the presence or absence of discriminatory peaks of the *Ixodes* species.** The analysis was not performed for *I. frontalis* and *I. hexagonus* for the half-idiosoma because all specimens were engorged.

Species	4 legs		Half-idiosoma	
	Recognition capability	Cross validation	Recognition capability	Cross validation
<i>I. frontalis</i>	100%	100%		
<i>I. hexagonus</i>	100%	89.66%		
<i>I. acuminatus</i>	100%	97.62%	100%	100%
<i>I. persulcatus</i>	100%	96.55%	100%	96.67%
<i>I. ricinus</i>	100%	90.7%	100%	100%
<i>I. scapularis</i>	100%	90%	100%	100%
<i>I. uriae</i>	100%	100%	100%	100%
<i>I. ventalloi</i>	100%	97.5%	100%	100%
<i>I. vespertilionis</i>	100%	100%	100%	100%
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>95.78%</b>	<b>100%</b>	<b>99.52%</b>

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.t003>

Among the specimens included in the present study which both body parts were submitted to MS analysis, the rates of relevant (LSVs >1.8) identifications were 96.8% and 91.0% for legs and half-idiosoma, respectively. Combining results from both body parts increased the rate of relevant identifications to 99.4% with 100% of corroborative tick species classification concordant with morphological identification. Among the remaining 46 specimens for which only the legs were submitted to MS analysis, 44 were properly identified. Finally, only three specimens were not reliably identified, two *I. ricinus* nymphs and one *I. ventalloi* female. The global identification rate was 98.5% (199/202).

Interestingly, a lower rate of relevant identifications was obtained for half-idiosoma than for legs. The presence of residues in the midgut, such as residual blood meal which can persist for several weeks or months following the blood meal [41] could explain the minor changes in MS profiles; thus decreasing the scores of spectra matching with MS DB. Karger and collaborators [22] recently reported spectral variations between *I. ricinus* specimens according to geographical origin, environmental factors, and seasons. These slight MS profile changes only concern the intensity of a few peaks, which does not prevent specimen identification [17]. Moreover, ticks presented in this study – especially *I. ricinus* ticks – were collected at different times and in various geographical regions, and 96.7% (87/96) of *I. ricinus* specimens were correctly identified using half-idiosoma. The three specimens that were not identified had spectra of low quality, explaining their low LSVs.

Using four legs for tick identification by MALDI-TOF MS analysis has several advantages. The whole body is preserved allowing additional morphological and/or molecular analyses (e.g., taxonomy validation or pathogen search). Leg MS spectra remain unchanged irrespective of the engorgement status of the tick [27]. Conversely, recent blood meals can compromise tick species identification using half-idiosoma [17]. Indeed, for ticks collected from hosts (i.e., humans or animals), confirmation of tick species using half-idiosoma cannot always be performed. It depends on the engorgement status, and thus limits its diagnostic use. Nevertheless, the inability to reach LSV threshold for relevant tick identification only using leg MS spectra has been repeatedly reported [18,27,42]. These questionable identifications were usually attributed to the poor MS spectra “quality” (decreased peak intensity and diversity). This problem was particularly observed with specimens at immature stages (i.e., larval and nymphal stages) [17]. The small size of specimens at these immature stages is associated with fastidious dissection of legs with low quantity of extracted proteins as previously reported for early stages of



**Table 4. Results of the blind test procedure against the four legs and half-idiosoma database.**

Species	No. of specimens used for the blind test	LSVs* [Low-High]	Top species identified <sup>§</sup>	Differences in LSVs between the first and second top species [Mean ± SD] <sup>§</sup>
<i>4 legs</i>				
<i>I. ventalloi</i>	12	[1.92–2.30] (11) <i>[1.42] (1)</i>	<i>I. ventalloi</i> /	0.81±0.21
<i>I. ricinus</i>	104	[1.8–2.41] (99) <i>[1.57–1.78] (5)</i>	<i>I. ricinus</i> /	0.73±0.15
<i>I. persulcatus</i>	13	[2.02–2.43] (13)	<i>I. persulcatus</i>	0.97±0.15
<i>I. scapularis</i>	22	[1.80–2.84] (22)	<i>I. scapularis</i>	0.94±0.29
<i>I. acuminatus</i>	8	[2.24–2.65] (8)	<i>I. acuminatus</i>	1.15±0.19
<i>I. uriae</i>	8	[1.98–2.46] (7) <i>[1.74] (1)</i>	<i>I. uriae</i> /	2.28±0.17
<i>I. vespertilionis</i>	2	[2.19–2.45] (2)	<i>I. vespertilionis</i>	1.33±0.22
<i>I. hexagonus</i>	23	[1.87–2.54] (23)	<i>I. hexagonus</i>	1.14±0.35
<i>I. frontalis</i>	2	[2.15–2.43] (2)	<i>I. frontalis</i>	1.14±0.29
<i>D. reticulatus</i>	8	[2.23–2.51] (8)	<i>D. reticulatus</i>	1.42±0.16
<i>Half-idiosoma</i>				
<i>I. ventalloi</i>	5	[1.81–2.13] (5)	<i>I. ventalloi</i>	0.22±0.31
<i>I. ricinus</i>	90	[1.92–2.64] (87) <i>[0.58–1.59] (3)</i>	<i>I. ricinus</i> /	0.51±0.19
<i>I. persulcatus</i>	13	[1.81–2.41] (11) <i>[1.62–1.68] (2)</i>	<i>I. persulcatus</i> /	0.67±0.39
<i>I. scapularis</i>	22	[1.81–2.29] (15) <i>[1.44–1.77] (7)</i>	<i>I. scapularis</i> /	0.43±0.17
<i>I. acuminatus</i>	8	[2.25–2.67] (8)	<i>I. acuminatus</i>	0.82±0.41
<i>I. uriae</i>	8	[1.90–2.21] (6) <i>[1.46–1.65] (2)</i>	<i>I. uriae</i> /	1.28±0.14
<i>I. vespertilionis</i>	2	[2.06–2.08] (2)	<i>I. vespertilionis</i>	1.44±0.21
<i>D. reticulatus</i>	8	[2.11–2.53] (8)	<i>D. reticulatus</i>	1.53±0.41

Incorrect identifications are shown in italics

\*Range of log score values (LSVs), the number of specimens included in each range of LSVs (above and below 1.8) are indicated into brackets

<sup>§</sup>Names of the first top hit species identified with relevant LSVs (LSVs >1.8)

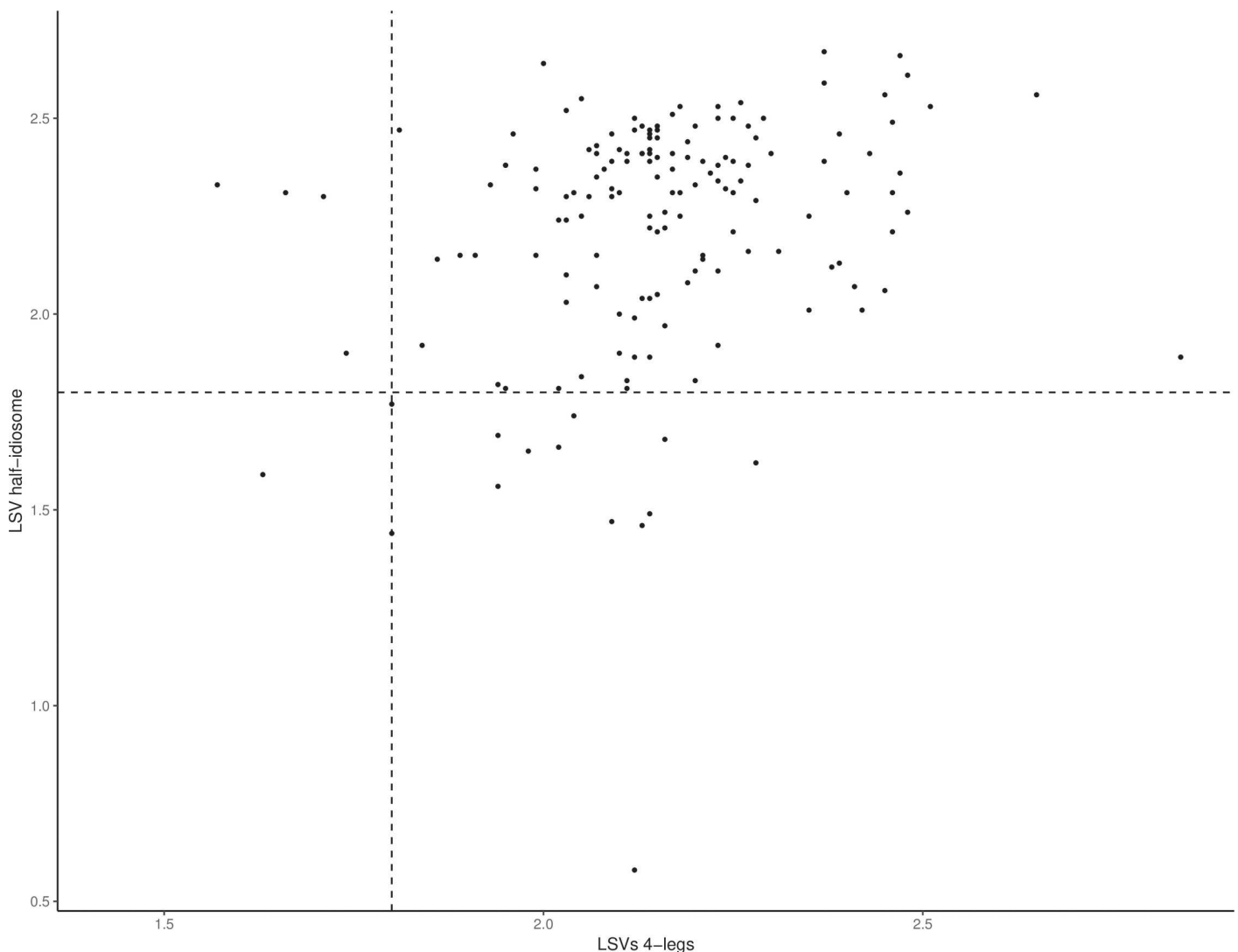
<sup>§</sup>Mean and standard deviation of the differences in log score values between the first and second top species identified by MS

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.t004>

mosquito larvae [43]. Intensities of four-leg MS spectra were indeed sometimes low, whereas intensities of half-idiosoma MS spectra were higher. This difference is probably due to the larger amount of proteins extracted from half-idiosoma.

As immature stages are usually preponderant during field collection of ticks [44,45], confirmation of tick species identity using a second body part at the same time or with two-tiered testing could rule out equivocal classifications. More than half of the ticks submitted to MS analysis in the present study were at the nymphal stage. As questing ticks are usually not engorged, half-idiosoma could be a helpful additional strategy.

The present work included nine species of the *Ixodes* genus, among which three (*I. ricinus*, *I. scapularis*, and *I. persulcatus*) are members of the *I. ricinus* complex [23]. For bacterial identification, closely related species are difficult to identify with MALDI-TOF MS. For example, *Streptococcus pseudopneumoniae* and *S. pneumoniae* are hard to differentiate routinely [46] as well as *Escherichia coli* and *Shigella* spp [47]. To our knowledge, there is no previous study



**Fig 5. Comparison of LSVs from MS spectra of the 10 tick species according to body part.** Specimens, for which the four legs and half-idiosoma were available, are presented ( $n = 156$ ). The dashed line represents the threshold value for relevant identification (LSVs  $>1.8$ ). LSV, log score value.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735.g005>

assessing MALDI-TOF ability to discriminate and identify the closely related tick species of the *I. ricinus* complex. Indeed, no misidentification between *I. ricinus*, *I. persulcatus* and *I. scapularis* had been noticed during this work. Moreover, MALDI-TOF allows for the correct identification subadult specimens (*i.e.*, nymphs or larvae) for which morphological identification is harder than for adult specimens even for well-trained taxonomists and are, for the study of Lyme borreliosis, the main material collected [11,48].

Correct identification of tick species is the crucial first step for all tick-associated researches. Assessing the risk of tick-borne pathogen, vector distribution, and vector/host associations can indeed be distorted when misidentifications occur [49]. MALDI-TOF MS technology is a suitable method for high throughput species identification of field-collected specimens. Furthermore, some of the ticks included in this database – *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. hexagonus*, *I. scapularis*, *I. uriae* – are vectors of *B. burgdorferi* s.l, the causative agent of Lyme disease, the



most prevalent tick borne disease in the Northern hemisphere [5]. *I. ricinus*, *I. persulcatus*, and *I. scapularis* are also vectors of *Anaplasma phagocytophilum*, responsible for human granulocytic anaplasmosis [50]. *Borrelia miyamotoi* [51] and tick-borne encephalitis virus [52] can be transmitted by *I. ricinus* and *I. persulcatus*, respectively. *Dermacentor reticulatus* is a vector of *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii*, responsible for tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) [53]. Other ticks included in this database such as *I. frontalis* do not seem to be competent for the transmission of *B. burgdorferi* sl. [6], although potentially playing a role in transmitting the bacterium by co-feeding. Hence, accurate identification of ticks removed from hosts or collected in the field allows to distinguish tick vectors of TBDs from non-vectors and helps to orientate pathogen diagnosis and control strategies.

The present study also identified a limitation related to the genomic database. No sequence of *I. acuminatus* was available on the GenBank database. The 2% difference between the COI sequence of *I. acuminatus* and *I. redikorzevi* COI can be explained by *I. redikorzevi* being a synonym for *I. acuminatus*, as suggested by several authors [54]. Sequences may correspond to intraspecific variability. It should be noted that the GenBank sequence of *I. redikorzevi* form a monophyletic group with our *I. acuminatus* sequences (Fig 1B).

Interestingly, interrogating the GenBank database with 16s rDNA from the specimens identified as *I. acuminatus* revealed 100% similarity with a sequence of *I. ricinus* (Accession number JN248424.2). This *I. ricinus* sequence is different from the remaining sequence of *I. ricinus*, either already available from GenBank (KF197115.1, NC 002010.1) or from our own sequences of *I. ricinus*. This JN248424.2 sequence of the *I. ricinus* mitogenome [55] harbors regions of low sequence identity with the 18 mitogenomes obtained by Carpi et al. [56], leading those authors to exclude the sequence of Montagna et al. [55] from their analysis.

As previously reported, MALDI-TOF MS does not seem to be an appropriate method for phylogenetic studies [17,27]. Trees built based on the data provided by MALDI-TOF MS cannot be analyzed using phylogenetical methods, the clustering method can thus only be a phenetic method, clustering samples according to their overall similarities. Moreover, all phylogenetical methods are based on the comparison of homologous sites. With MALDI-TOF MS data, the analyzed peaks may not be all homologous.

All tick-associated researches are based on the correct initial identification of tick species. Assessing the risk of tick-borne pathogen, vector distribution, and vector/host associations can indeed be distorted when misidentifications occur [49]. MALDI-TOF MS technology is a suitable method for high throughput species identification of field-collected specimens. Furthermore, some of the ticks included in this database – *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. hexagonus*, *I. scapularis*, *I. uriae* – are vectors of *Borrelia burgdorferi* sl, the causative agent of Lyme disease [5]. *I. ricinus*, *I. persulcatus*, and *I. scapularis* are also vectors of *Anaplasma phagocytophilum*, responsible for human granulocytic anaplasmosis [50]. *Borrelia miyamotoi* [51] and tick-borne encephalitis virus [52] can be transmitted by *I. ricinus* and *I. persulcatus*, respectively. *Dermacentor reticulatus* is a vector of *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii*, responsible for tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) [53]. Other ticks included in this database such as *I. frontalis* do not seem to be competent for the transmission of *B. burgdorferi* sl. [6], although potentially playing a role in transmitting the bacterium by co-feeding. Hence, accurate identification of ticks removed from hosts or collected in the field allows to distinguish tick vectors of TBDs from non-vectors and helps to orientate pathogen diagnosis and control strategies.

## Conclusion

The present study demonstrated that for tick identification both legs and half-idiosoma can be used as a matrix for MALDI-TOF MS identification. In this study, this high throughput tool

has been employed for the identification of closely related species belonging to the *Ixodes* genus which are hardly distinguishable using morphological tools. MALDI-TOF MS thus discriminates between tick vectors of Lyme disease and non-vectors which is of utmost importance for large scale epidemiological studies and “live” monitoring of field-collected tick vectors.

The double-check strategy proposed herein, based on the combined use of two matrices (half-idiosoma and tick legs) improves the accuracy of this method. The database set-up constitutes the foundation stone for a larger and shared database.

## Supporting information

**S1 Fig.** Discriminatory peaks between the *Ixodes* species for legs (A) and half-idiosoma (B). (PDF)

**S2 Fig. Evaluation of *Ixodes* MS spectra reproducibility and specificity according to tick species and body parts using composite correlation index (CCI).** MS spectra from two to five specimens per body part were analyzed using the CCI tool. Tick species and body part are indicated on the left side of the heat map. Levels of MS spectra reproducibility are indicated in red and blue revealing relatedness and incongruence between spectra, respectively. CCI matrix was calculated using MALDI-Biotyper v3.0. software with default settings (mass range  $3.0 \pm 12.0$  kDa; resolution 4; 8 intervals; auto-correction off). The values correspond to the mean coefficient of correlation and respective standard deviations obtained for paired condition comparisons.

(PDF)

**S1 Table. Detailed origins and results of the blind test procedure of the ticks' body parts.** (XLSX)

**S2 Table. Sequences obtained in this study and submitted in the GeneBank database.** (XLSX)

**S3 Table. Mass peak list distinguishing *Ixodes* tick species using legs as matrix, determined by Genetic Algorithm model analysis of ClinProTools.**

(DOCX)

**S4 Table. Mass peak list distinguishing *Ixodes* tick species using half-idiosoma as matrix, determined by Genetic Algorithm model analysis of ClinProTools.**

(DOCX)

**S1 File. Raw MS spectra from legs and half-idiosoma of ticks are included in the MS reference database.** MS spectra were obtained using Microflex LT MALDI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics).

(ZIP)

## Acknowledgments

We warmly thank Mr. and Mrs. Dimberton who kindly allowed PHB to collect ticks in their property.

We also thank Nicolas Minéry and Bertrand Scaar (CRBPO/RNN Petite Camargue Alsacienne) who helped NB for tick collection on birds and to Thierry Delorme (FDC56 Fédération des Chasseurs du Morbihan); François Varenne (LPO 85; Ligue Pour la Protection des Oiseaux, Vendée) and Gérald Larcher (Faculté de pharmacie d'Angers) who helped OP in the tick collection. Many of the ticks collected and used in this paper came from ZA Armorique.

We thank Renate Ranka who provided the *I. persulcatus* and Thomas Mather, University of Rhode- Island, USA who provided the *I. scapularis*. We are grateful to Laurence Zilliox and Axelle Durand for their technical assistance. And finally, we thank Mrs. Marie-Christine MICHELLET and Marthe MOREN for her help in English editing of this manuscript.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Lionel Almeras, Olivier Plantard, Antoine Grillon, Émilie Talagrand-Reboul, Benoît Jaulhac, Nathalie Boulanger.

**Data curation:** Pierre H. Boyer, Lionel Almeras.

**Formal analysis:** Pierre H. Boyer, Lionel Almeras, Olivier Plantard.

**Methodology:** Pierre H. Boyer, Lionel Almeras, Benoît Jaulhac, Nathalie Boulanger.

**Project administration:** Nathalie Boulanger.

**Resources:** Émilie Talagrand-Reboul, Karen McCoy.

**Software:** Pierre H. Boyer.

**Supervision:** Lionel Almeras.

**Validation:** Lionel Almeras.

**Writing – original draft:** Pierre H. Boyer, Lionel Almeras, Nathalie Boulanger.

**Writing – review & editing:** Pierre H. Boyer, Lionel Almeras, Olivier Plantard, Antoine Grillon, Émilie Talagrand-Reboul, Karen McCoy, Benoît Jaulhac, Nathalie Boulanger.

## References

1. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 2012; 28: 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003> PMID: 22902521
2. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet Lond Engl.* 2012; 379: 461–473.
3. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, et al. The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: *Ixodida*) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa.* 2010; 2528: 1–28.
4. Yang LH, Han BA. Data-driven predictions and novel hypotheses about zoonotic tick vectors from the genus *Ixodes*. *BMC Ecol.* 2018; 18: 7. <https://doi.org/10.1186/s12898-018-0163-2> PMID: 29448923
5. Eisen L, Lane RS. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Lyme borreliosis: biology, epidemiology, and control. CABI. Oxon, UK.; New York: CABI Pub; 2002. pp. 91–116.
6. Heylen D, Sprong H, van Oers K, Fonville M, Leirs H, Matthysen E. Are the specialized bird ticks, *Ixodes arboricola* and *I. frontalis*, competent vectors for *Borrelia burgdorferi* sensu lato? *Environ Microbiol.* 2014; 16: 1081–1089. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12332> PMID: 24237635
7. Lv J, Wu S, Zhang Y, Zhang T, Feng C, Jia G, et al. Development of a DNA barcoding system for the *Ixodida* (Acari: *Ixodida*). *Mitochondrial DNA J DNA Mapp Seq Anal.* 2014; 25: 142–149. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.792052> PMID: 23631370
8. Vial L, Stachurski F, Leblond A, Huber K, Vourc'h G, René-Martellet M, et al. Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2016; <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.002> PMID: 27568169
9. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol.* 2016; 11: 549–566. <https://doi.org/10.2217/fmb.16.5> PMID: 27070074
10. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 897–928. <https://doi.org/10.1086/319347> PMID: 11247714
11. Estrada-Peña A, D'Amico G, Palomar AM, Dupraz M, Fonville M, Heylen D, et al. A comparative test of ixodid tick identification by a network of European researchers. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2017; 8: 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.03.001> PMID: 28320640

12. Rumer L, Sheshukova O, Dautel H, Mantke OD, Niedrig M. Differentiation of Medically Important Euro-Asian Tick Species *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by Polymerase Chain Reaction. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2010; 11: 899–905. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0191> PMID: 21028959
13. Lv J, Wu S, Zhang Y, Chen Y, Feng C, Yuan X, et al. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the *Ixodida* (Acari: *Ixodida*). Parasit Vectors. 2014; 7: 93. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-93> PMID: 24589289
14. Sonenshine DE, Roe RM. Biology of ticks. Volume 1. 2014.
15. Mewara A, Sharma M, Kaura T, Zaman K, Yadav R, Sehgal R. Rapid identification of medically important mosquitoes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Parasit Vectors. 2018; 11: 281. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2854-0> PMID: 29720246
16. Sambou M, Aubadie-Ladrix M, Fenollar F, Fall B, Bassene H, Almeras L, et al. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for identification of *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) biting midges in senegal. J Clin Microbiol. 2015; 53: 410–418. <https://doi.org/10.1128/JCM.01855-14> PMID: 25411169
17. Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, Hoffmann B, et al. Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Ticks Tick-Borne Dis. 2012; 3: 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.11.002> PMID: 22487425
18. Diarra AZ, Almeras L, Laroche M, Berenger J-M, Koné AK, Bocoum Z, et al. Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria in Mali. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11: e0005762. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005762> PMID: 28742123
19. Nebbak A, Willcox AC, Bitam I, Raoult D, Parola P, Almeras L. Standardization of sample homogenization for mosquito identification using an innovative proteomic tool based on protein profiling. Proteomics. 2016; <https://doi.org/10.1002/pmic.201600287> PMID: 27862981
20. Nebbak A, El Hamzaoui B, Berenger J-M, Bitam I, Raoult D, Almeras L, et al. Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. Med Vet Entomol. 2017; <https://doi.org/10.1111/mve.12250> PMID: 28722283
21. Boyer PH, Boulanger N, Nebbak A, Collin E, Jaulhac B, Almeras L. Assessment of MALDI-TOF MS biotyping for *Borrelia burgdorferi* s.l detection in *Ixodes ricinus*. PLoS One. 2017; 12: e0185430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185430> PMID: 28950023
22. Karger A, Bettin B, Gethmann JM, Klaus C. Whole animal matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry of ticks—Are spectra of *Ixodes ricinus* nymphs influenced by environmental, spatial, and temporal factors? PLoS One. 2019; 14: e0210590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210590> PMID: 30645604
23. Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. J Parasitol. 2003; 89: 452–457. [https://doi.org/10.1645/0022-3399\(2003\)089\[0452:MPAITT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3399(2003)089[0452:MPAITT]2.0.CO;2) PMID: 12880241
24. Pérez-Eid C. La famille des Ixodidae. Les tiques: identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Lavoisier. 2007. pp. 93–181.
25. Keirans JE, Hutcheson HJ, Durden LA, Klompen JS. *Ixodes scapularis* (Acari: *Ixodidae*): redescription of all active stages, distribution, hosts, geographical variation, and medical and veterinary importance. J Med Entomol. 1996; 33: 297–318. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.3.297> PMID: 8667375
26. Filippova NA. Ixodid ticks (*Ixodinae*). Fauna USSR New Ser. Leningrad: Nauka; 1977.
27. Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger J-M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. J Clin Microbiol. 2013; 51: 522–528. <https://doi.org/10.1128/JCM.02665-12> PMID: 23224087
28. Guy EC, Stanek G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol. 1991; 44: 610–611. <https://doi.org/10.1136/jcp.44.7.610> PMID: 1856296
29. Rijpkema S, Golubić D, Molkenboer M, Verbeek-De Kruijff N, Schellekens J. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. Exp Appl Acarol. 1996; 20: 23–30. PMID: 8746131
30. Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of Rhipicephalus and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). Parasitol Res. 1998; 84: 478–484. <https://doi.org/10.1007/s004360050433> PMID: 9660138
31. Meddeb M, Koebel C, Jaulhac B, Schramm F. Comparison between a Broad-Range Real-Time and a Broad-Range End-Point PCR Assays for the Detection of Bacterial 16S rRNA in Clinical Samples. Ann Clin Lab Sci. 2016; 46: 18–25. PMID: 26927338

32. Stucky BJ. SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. *J Biomol Tech JBT*. 2012; 23: 90–93. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-004> PMID: [22942788](#)
33. Kumsa B, Laroche M, Almeras L, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. Morphological, molecular and MALDI-TOF mass spectrometry identification of ixodid tick species collected in Oromia, Ethiopia. *Parasitol Res*. 2016; 115: 4199–4210. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5197-9> PMID: [27469536](#)
34. Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pflüger V, Mathis A. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Med Vet Entomol*. 2011; 25: 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00927.x> PMID: [21118284](#)
35. Singhal N, Kumar M, Viridi JS. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology*. 2016; 143: 1491–1500. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001189> PMID: [27387025](#)
36. Tahir D, Almeras L, Varloud M, Raoult D, Davoust B, Parola P. Assessment of MALDI-TOF mass spectrometry for filariae detection in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0006093. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006093> PMID: [29261659](#)
37. Fotso Fotso A, Mediannikov O, Diatta G, Almeras L, Flaudrops C, Parola P, et al. MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crociduræ/Ornithodoros sonrai* paradigm. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e2984. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002984> PMID: [25058611](#)
38. Yssouf A, Almeras L, Berenger J-M, Laroche M, Raoult D, Parola P. Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2015; 6: 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.04.013> PMID: [26051210](#)
39. Yssouf A, Almeras L, Terras J, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Detection of *Rickettsia* spp in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e0003473. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003473> PMID: [25659152](#)
40. Rothen J, Githaka N, Kanduma EG, Olds C, Pflüger V, Mwaura S, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for comprehensive indexing of East African ixodid tick species. *Parasit Vectors*. 2016;9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1240-4>
41. Önder Ö, Shao W, Kemps BD, Lam H, Brisson D. Identifying sources of tick blood meals using unidentified tandem mass spectral libraries. *Nat Commun*. 2013; 4: 1746. <https://doi.org/10.1038/ncomms2730> PMID: [23612287](#)
42. Boucheikhchoukh M, Laroche M, Aouadi A, Dib L, Benakha A, Raoult D, et al. MALDI-TOF MS identification of ticks of domestic and wild animals in Algeria and molecular detection of associated microorganisms. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018; 57: 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.05.002> PMID: [30017077](#)
43. Nebbak A, Koumare S, Willcox AC, Berenger J-M, Raoult D, Almeras L, et al. Field application of MALDI-TOF MS on mosquito larvae identification. *Parasitology*. 2018; 145: 677–687. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001354> PMID: [28768561](#)
44. Dantas-Torres F, Lia RP, Capelli G, Otranto D. Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Exp Appl Acarol*. 2013; 61: 119–127. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9671-0> PMID: [23417703](#)
45. Goldstein V, Boulanger N, Schwartz D, George J-C, Ertlen D, Zilliox L, et al. Factors responsible for *Ixodes ricinus* nymph abundance: Are soil features indicators of tick abundance in a French region where Lyme borreliosis is endemic? *Ticks Tick-Borne Dis*. 2018; <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.013> PMID: [29606622](#)
46. van Prehn J, van Veen SQ, Schelfaut JGG, Wessels E. MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 85: 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.012> PMID: [26971637](#)
47. Khot PD, Fisher MA. Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 3711–3716. <https://doi.org/10.1128/JCM.01526-13> PMID: [23985919](#)
48. Wright CL, Hynes WL, White BT, Marshall MN, Gaff HD, Gauthier DT. Single-tube real-time PCR assay for differentiation of *Ixodes affinis* and *Ixodes scapularis*. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2014; 5: 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.08.003> PMID: [24192510](#)
49. Värk K, Ivanova A, Geller J, Remm J, Jaik K, Tikunova N, et al. Identification of *I. ricinus*, *I. persulcatus* and *I. trianguliceps* species by multiplex PCR. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2016; <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.004> PMID: [27856176](#)
50. Dumler JS. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Fems Immunol Med Microbiol*. 2012; 64: 13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00909.x> PMID: [22098465](#)

51. Telford SR III, Goethert HK, Molloy PJ, Berardi VP, Chowdri HR, Gugliotta JL, et al. *Borrelia miyamotoi* disease: neither Lyme disease nor relapsing fever. *Clin Lab Med*. 2015; 35: 867–882. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2015.08.002> PMID: [26593262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26593262/)
52. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet*. 2008; 371: 1861–1871. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60800-4)
53. Parola P, Roveery C, Rolain JM, Brouqui P, Davoust B, Raoult D. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 1105–1108. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081449> PMID: [19624931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19624931/)
54. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG. *The Hard Ticks of the World: (Acari: Ixodida: Ixodidae)* [Internet]. Springer Netherlands; 2014. Available: <http://www.springer.com/gp/book/9789400774964>
55. Montagna M, Sasser D, Griggio F, Epis S, Bandi C, Gissi C. Tick-box for 3'-end formation of mitochondrial transcripts in Ixodida, basal chelicerates and *Drosophila*. *PloS One*. 2012; 7: e47538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047538> PMID: [23077630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23077630/)
56. Carpi G, Kitchen A, Kim HL, Ratan A, Drautz-Moses DI, McGraw JJ, et al. Mitogenomes reveal diversity of the European Lyme borreliosis vector *Ixodes ricinus* in Italy. *Mol Phylogenet Evol*. 2016; 101: 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.009> PMID: [27165938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27165938/)

**PARTIE III :**

**MALADIES VECTORIELLES A TIQUES**  
**ET ÉMERGENCE, L'EXEMPLE DE DEUX**  
**MICROORGANISMES : *N. MIKURENSIS***  
**ET *B. MIYAMOTOI***



## INTRODUCTION

---

### I. LES MVT SONT-ELLES EMERGENTES ?

La définition MeSH (Medical Subject Heading) de maladie infectieuse émergente est une maladie d'apparition nouvelle dans une zone géographique ou dans un hôte ou présentant un nouveau mode de transmission. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'émergence de maladies infectieuses dont certains peuvent s'appliquer aux maladies vectorielles à tiques.

Premièrement, les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis la mise en évidence de nombreux microorganismes inconnus. C'est le cas aussi dans les MVT où de nouveaux microorganismes ont été détectés, d'abord dans les tiques, puis chez les patients. Cela s'est vérifié pour les deux microorganismes auxquels nous nous sommes intéressés : *B. miyamotoi* (Wagemakers *et al.*, 2015) et *N. mikurensis* (Wennerås, 2015) mais également d'autres comme *R. helvetica*. La liste des agents pathogènes transmis par les tiques au sujet desquels il n'existe que quelques cas décrits dans la littérature s'est donc allongée (Jahfari et Sprong, 2016). Le tableau clinique, la gravité et l'incidence ainsi que la proportion de formes asymptomatiques ne sont pas connus avec précision. La plupart de ces pathologies présentent un tableau de syndrome infectieux non spécifique et peuvent de ce fait passer inaperçues. On peut néanmoins s'attendre à une augmentation des diagnostics d'infections rares, compte tenu de l'augmentation régulière du nombre de personnes immunodéprimées.

Un deuxième paramètre qui doit être examiné avec précaution est l'augmentation du nombre de tiques. Ce point a déjà été abordé dans la première partie de ce manuscrit. En effet, si l'augmentation de la densité en *I. ricinus* est difficilement objectivable, la présence de celle-ci dans des territoires où au préalable elle ne survivait pas est attestée : à des altitudes plus élevées, plus au nord de son aire de répartition. Les auteurs évoquent le changement climatique comme étant à l'origine de cette modification de répartition (Medlock *et al.*, 2013). Ce phénomène concourt à la propagation des MVT transmises par *I. ricinus* dans des zones où elles n'étaient pas présentes initialement (Jahfari et Sprong, 2016).

Si *I. ricinus* colonise le nord de l'Europe, d'autres espèces de tiques s'implantent dans des régions plus septentrionales par rapport à leur aire de répartition initiale. C'est le cas de *H. marginatum* qui a colonisée le sud de la France et qui est susceptible de transmettre la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (Vial *et al.*, 2016) et de *D. reticulatus* (Dautel *et al.*, 2006).



Ainsi seules des études sur de longues périodes (> 10 ans) dans un endroit donné, permettant à la fois d'évaluer la modification sur le long terme de la densité en tiques ainsi que la prévalence des différents microorganismes (Hauser *et al.*, 2018; Vogelgesang *et al.*, 2020) peuvent répondre à la question de l'augmentation de l'abondance en tiques. De telles surveillances à long terme sont nécessaires pour quantifier les effets possibles du changement climatique ou pour développer des modèles de prévision fiable de la densité de tiques.

De même, la surveillance de la prévalence des microorganismes potentiellement transmis parmi les tiques porteuses est aussi informative. Des résultats surprenants peuvent être observés sur cette surveillance à long terme. Par exemple, une récente étude menée en Lettonie a montré une diminution significative de la prévalence de *Borrelia* en 10 ans dans 3 sites étudiés (Okeyo *et al.*, 2020). Aucune augmentation dans le temps de la prévalence de *B. burgdorferi* si n'a été observée dans une méta-analyse européenne sur 5 ans de Strnad *et al.*, (2017).

Un troisième paramètre à examiner est l'augmentation de la prévalence des MVT en général et de la maladie de Lyme en particulier. En effet, les données du réseau Sentinelle montrent une évolution en France du taux d'incidence, passant de 40 cas pour 100 000 habitants en 2009 à 100 cas pour 100 000 habitants en 2018, une légère diminution a été constatée en 2019 (80 cas pour 100 000 habitants). Cette augmentation semble multifactorielle, elle peut correspondre à la part importante prise dans les médias par la maladie de Lyme et les autres MVT (Pascal *et al.*, 2020) ; une meilleure connaissance de la maladie par les patients et le corps médical favorise la reconnaissance des signes cliniques ce qui expliquerait l'augmentation de la prévalence. Elle peut également correspondre à la survenue de MVT dans des zones géographiques où elles n'avaient jamais été enregistrées. Par exemple, des cas de TBE ont récemment été décrits dans la région Rhône-Alpes Auvergne où au préalable aucun cas n'avait été enregistré (Botelho-Nevers *et al.*, 2019). Une autre composante qui pourrait expliquer cette augmentation est le plus grand intérêt pour les activités récréatives en extérieur, favorisant l'exposition aux tiques (Kilpatrick et Randolph, 2012).

Il est néanmoins nécessaire d'examiner cette augmentation récente de la prévalence des MVT sur une plus grande échelle temporelle. Les tiques sont présentes sur Terre depuis des millénaires et les microorganismes qu'elles véhiculent ne sont probablement pas nouvellement apparus (Peñalver *et al.*, 2017). Si on observe un regain d'intérêt pour les activités récréatives en forêt, il ne faut pas méconnaître que la deuxième partie du XXe siècle a été marquée par une désertification des campagnes. Un mode de vie rural favorise le contact avec les tiques, il est donc très probable que les populations étaient au moins autant exposées aux tiques sinon plus durant la première moitié du XXe

siècle. Pour illustrer cela, citons une étude non encore publiée, mais dont les résultats ont été présentés lors d'un congrès (Cuellar *et al.*, 2019), qui montre que la séroprévalence de la borréliose de Lyme en Finlande était significativement plus élevée dans les années 1970 par rapport à la séroprévalence actuelle.

Différentes composantes entrent donc dans le concept d'émergence pour les MVT : une meilleure connaissance de ces maladies par la communauté médicale et une meilleure sensibilisation du grand public au risque acarologique entraîne un meilleur diagnostic de ces dernières, une amélioration des techniques moléculaires a permis d'identifier des microorganismes dont la pathologie était inconnue, enfin, la modification de la répartition géographique entraîne l'apparition de MVT dans certaines régions où elles n'étaient pas présentes.

## **II. À LA RECHERCHE DES MICROORGANISMES EMERGENTS DANS LES SYNDROMES FEBRILES APRES PIQURE DE TIQUE**

De façon intéressante, comme cela a été évoqué dans la revue de la littérature « Other Ixodes-Borne Diseases », les microorganismes transmis par *I. ricinus* en dehors de *Borrelia* sont à l'origine de syndromes fébriles survenant 7 à 10 jours après une piqûre de tique. En effet, en Europe la borréliose de Lyme n'est pas décrite pour être à l'origine de forte fièvre (> 38,5 °C), contrairement à ce qui peut être observé aux États-Unis (Strle et Stanek, 2009). L'hypothèse avancée est que la bactériémie est plus faible et moins fréquente avec les espèces et souches du complexe *B. burgdorferi* si présentes en Europe en comparaison de celles présentes aux Etats-Unis.

Lorsque de la fièvre est mise en évidence chez un patient suivant une piqûre de tique ou avec une notion d'exposition aux tiques, la recherche d'autres microorganismes transmis doit être entreprise (TBEv, *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*). Le tableau clinique est sans particularité, il s'agit d'un syndrome pseudo-grippal : fièvre, frisson, fatigue. Il peut néanmoins présenter des spécificités en fonction du microorganisme suspecté (cytopénie, encéphalite, thrombose...). Ces particularités cliniques peuvent être absentes au début des symptômes et constituer des complications dans un second temps. La recherche d'une documentation microbiologique, c'est-à-dire la mise en évidence du microorganisme responsable de la pathologie, est donc fondamentale pour proposer un traitement et une surveillance adaptés.

Nous avons commencé l'étude des syndromes fébriles après piqûre de tique dès nos travaux de Master. En effet, dans un premier temps nous nous sommes intéressés à une espèce particulière du complexe *B. burgdorferi* si : *B. mayonii*. Cette dernière a été décrite dans l'est des États-Unis en 2016 (Pritt *et al.*, 2016), elle donne les mêmes symptômes que la maladie de Lyme (méningoencéphalites, arthrites et érythèmes migrants multiples) accompagné d'une forte fièvre (> 39 °C). Cette forte fièvre est probablement à relier avec l'inoculum bactérien important dans le compartiment sanguin<sup>1</sup>. Nous l'avons recherchée dans la cohorte de patients fébriles après piqûre de tique du Grand Est et dans les tiques des 4 sites de collecte. Elle s'est avérée absente du territoire français (Boyer *et al.*, 2017).

Pour nos travaux de thèse le lien entre pathogènes émergents et syndromes fébriles après piqûre de tique s'est précisé. Nous avons poursuivi l'investigation étiologique de ces syndromes, car nous

---

<sup>1</sup> L'inoculum était si important que des spirochètes ont été observé au microscope à fond noir. A titre de comparaison, lors d'une bactériémie à une bactérie usuelle (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*...) l'inoculum bactérien est en médiane de 1 IFC/mL de sang (elles sont non visualisables au microscope).

avons émis l'hypothèse que des microorganismes transmis par les tiques, récemment décrits, en sont à l'origine. Après une analyse des données de la littérature nous nous sommes intéressés à deux autres microorganismes : *B. miyamotoi* et *N. mikurensis*. Les premières données d'épidémiologie vectorielle suggéraient également que ces deux microorganismes étaient présents dans les tiques *I. ricinus* en France et en Alsace en particulier. Nous les avons donc recherchés dans une cohorte de patients suspects d'anaplasmose, c'est-à-dire des patients se présentant en consultation ou en hospitalisation pour syndrome fébrile avec une notion de piqûre de tique ou d'exposition particulière aux tiques. Nous avons également affiné le travail d'épidémiologie vectorielle sur les sites de collecte en Alsace ainsi qu'en Bretagne. Ceci est rendu possible les campagnes de collecte mensuelles réalisées par l'équipe du CNR *Borrelia* de Strasbourg.

Deux articles sont présentés ici. L'article n°2 : « Assessment of *Borrelia miyamotoi* in febrile patients and ticks in Alsace, an endemic area for Lyme borreliosis in France » a été publié en 2020 dans la revue *Parasites & Vectors*. L'article traitant de *N. mikurensis* est en préparation pour soumission.

## ARTICLE N° 2 : ASSESSMENT OF *BORRELIA MIYAMOTOI* IN FEBRILE PATIENTS AND TICKS IN ALSACE, AN ENDEMIC AREA FOR LYME BORRELIOSIS IN FRANCE

---

*Borrelia miyamotoi* est une espèce de *Borrelia* des fièvres récurrentes transmise par des tiques du complexe *Ixodes ricinus*. La maladie causée par *B. miyamotoi* a été décrite pour la première fois en Russie, puis aux États-Unis et au Japon. Il s'agit classiquement d'un syndrome fébrile après piquûre de tique pouvant évoluer vers des récurrences en l'absence de traitement. En outre, cinq cas de méningo-encéphalite chez des patients immunodéprimés et un cas chez un patient apparemment immunocompétent ont été décrits.

Nous avons étudié la présence de *B. miyamotoi* dans les nymphes d'*I. ricinus* et chez des patients suspectés d'anaplasmose, en Alsace, une région endémique pour les tiques *I. ricinus* et la borréliose de Lyme, en utilisant le diagnostic direct (PCR) et indirect (sérologie).

*Borrelia miyamotoi* a été détecté dans 2,2 % des 4354 tiques collectées entre 2013 et 2016. Aucun des 575 échantillons de sang, prélevés chez les patients suspectés d'être atteints d'anaplasmose, n'a été trouvé positif pour *B. miyamotoi* par PCR. Des sérums précoces et tardifs de 138 de ces 575 patients étaient disponibles. La réactivité en IgM et en IgG de ces sera a été testé vis-à-vis d'un antigène spécifique de *B. miyamotoi* (la glpQ). Au total, 14 des 138 patients avaient au moins un paramètre positif (c'est-à-dire des IgG et/ou IgM anti-GlpQ). Un patient a séroconverti pour les IgG, et trois avaient des IgM isolées dans le sérum prélevé de manière précoce. Ces trois derniers patients ont été traités avec de la doxycycline, ce qui aurait pu empêcher la séroconversion. Après examen des données cliniques et des autres tests biologiques effectués, une co-exposition entre différents microorganismes vectorisés par des tiques ou des réactions croisées n'ont pas pu être exclues dans ces différents cas. Un patient présentait des IgG persistantes, ce qui suggère une exposition antérieure à *B. miyamotoi*.

Nous avons pu mettre en évidence une exposition à *B. miyamotoi* chez les patients testés. Les données présentées ici sont en faveur d'une possible exposition à *B. miyamotoi* plutôt qu'une réelle infection chez ces patients ayant de la fièvre après une piquûre de tique. De études supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer l'incidence et l'évolution clinique de cette maladie émergente transmise par les tiques.

## **ARTICLE N°3 : THE EMERGING TICK BORNE PATHOGEN *NEOEHRlichIA MIKURENSIS* : FIRST FRENCH CASE SERIES AND VECTOR EPIDEMIOLOGY.**

---

*Neoehrlichia mikurensis* est une bactérie intracellulaire transmise par des tiques appartenant au complexe *I. ricinus* en Europe et en Asie. L'intérêt pour cette bactérie s'est accru depuis qu'il a été démontré qu'elle est responsable de syndromes fébriles chez les patients immunodéprimés tout d'abord et immunocompétents ensuite. Jusqu'à présent, la plupart des cas cliniques ont été signalés en Europe du Nord (Suède et Norvège), mais des séries de cas ont également été décrites en Europe centrale (Allemagne, République tchèque) et en Chine. Des complications thrombotiques ont été rapportées chez les patients immunodéprimés.

En utilisant un test PCR spécifique, nous avons étudié la présence de *N. mikurensis* chez 5 036 nymphes d'*I. ricinus* dans deux régions de France (l'Alsace et la Bretagne) et chez des patients ayant fait l'objet d'une recherche d'anaplasmose granulocytaire humaine en Alsace, région endémique de la borréliose de Lyme,

*N. mikurensis* a été trouvée dans 5,06 % des tiques d'Alsace alors qu'aucune tique n'a été trouvée positive en Bretagne. Des disparités spatio-temporelles ont également été constatées en Alsace. Quatre patients sur les 934 patients suspects d'anaplasmose ont été trouvés positifs pour *N. mikurensis*. Deux d'entre eux avaient des pathologies lymphoïdes et les deux autres étaient apparemment immunocompétents. Une thrombose superficielle a été constatée chez un patient et une bactériémie de longue durée chez un autre. Ces caractéristiques cliniques ont été décrites précédemment chez les patients atteints de néoehrlichiose. Ces quatre patients sont les premiers cas cliniques de néoehrlichiose décrits en France.

La recherche de cette bactérie devrait être incluse dans le diagnostic différentiel des syndromes fébriles après piqûre de tique afin de traiter les patients et de surveiller l'apparition de complications thrombotiques chez ces patients. Des études à plus grande échelle sur les syndromes fébriles après piqûre de tiques, sur les tiques vectrices et sur le réservoir naturel de *N. mikurensis*, permettront d'expliquer les disparités spatio-temporelles observées dans cette étude et d'évaluer le risque de néoehrlichiose.

**THE EMERGING TICK BORNE PATHOGEN**  
***NEOEHRlichia MIKURENSIS* : FIRST FRENCH CASE SERIES**  
**AND VECTOR EPIDEMIOLOGY.**

Pierre H. BOYER (1), Lisa BALDINGER (2), Xavier WIRTH (1), Chazy MEWA CANDEM (1),  
Yves HANSMANN (1, 3), Nathalie BOULANGER (1, 2), Benoît JAULHAC (1, 2)

(1) UR 7290: Early Bacterial Virulence: *Borrelia* Group, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France.

(2) French National Reference Center for *Borrelia*, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

(3) Department of Infectious and Tropical Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

**Keywords:** Tick-borne diseases, Post-tick bite fever, *Neoehrlichia mikurensis*, *Neoehrlichiosis*

**PARTIE V :**  
**DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



# IDENTIFICATION DES TIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

---

L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF des arthropodes, vecteurs de maladies infectieuses en général, et des tiques en particulier, est en plein essor. Le partage des spectres de masse dans la communauté des entomologistes est fondamental pour assurer le développement et la popularité de cette technologie. À terme, nous souhaitons participer à cette évolution et développer une base de données internationale comportant les spectres de la plupart des espèces de tiques, en particulier celles ayant un intérêt médical.

Notre travail a permis de poser les premiers jalons d'une base de données internationale à disposition de la communauté scientifique en partageant les spectres d'individus appartenant à neuf espèces d'*Ixodes*. De nombreux points restent à élucider pour créer une base partagée et facilement utilisable par de nombreux entomologistes. En effet, cette création impose la reproductibilité des spectres pour une espèce donnée, quel que soit le laboratoire où ils sont acquis. Ainsi l'influence des conditions préanalytiques doit particulièrement être étudiée.

De plus, même si nous avons démontré que le MALDI-TOF est capable d'identifier des tiques appartenant à des espèces proches phylogénétiquement, ses capacités discriminatoires devront être testées sur d'autres complexes d'espèce voire sur des espèces dites cryptiques.

## I. ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS PREANALYTIQUES

### **A. Influence de la conservation de l'échantillon**

La conservation de l'échantillon est un paramètre clé, influençant le spectre d'un spécimen, ce qui peut conduire à une absence d'identification voire une mauvaise identification. Citons par exemple, la conservation dans l'éthanol à 70°, qui est pratiquée par de nombreuses équipes scientifiques. Pour l'identification des tiques à partir des 4 pattes, il a été montré par Nebbak *et al.* (2017) que la conservation à court terme ( $\leq 180$  jours) permettait de réaliser une identification correcte grâce à d'une base de données élaborée à partir de spécimens de référence frais. Pour augmenter la fiabilité de l'identification, ces mêmes auteurs suggèrent de créer une base de données avec des spécimens de référence eux-mêmes conservés dans l'alcool. Ceci a été appliqué jusqu'alors pour les études réalisées avec des tiques conservées dans l'éthanol (Diarra *et al.*, 2017; Boucheikhchoukh *et al.*, 2018).

Un point reste néanmoins en suspens, il s'agit de l'influence du temps passé par le spécimen dans l'alcool. En effet, dans les études publiées jusqu'à présent, les durées de conservation étaient

identiques entre les spécimens de référence et les spécimens à identifier. Les bases de données étaient créées pour une étude ponctuelle, sans objectif d'être utilisées sur le long terme. Or il a été montré, pour l'identification des mouches du genre *Drosophila*, que le stockage à long terme dans l'éthanol pouvait entraîner une modification majeure du profil protéique (Feltens *et al.*, 2010). Ainsi une étude préalable de l'influence de l'éthanol à 70° sur les spectres au cours du temps, devra être entreprise avant la mise en place de la banque de données partagée.

Il existe d'autres méthodes de conservation possible pour les tiques, qui sont peu pratiquées. Il s'agit de la conservation dans le formol dont l'usage doit être limité dans le temps, car il durcit les tissus de la tique (Pérez-Eid, 2007). L'alcool glycérolé à 5 % peut également être utilisé (Pérez-Eid, 2007). L'influence de ces deux dernières conditions pourra également être testée et les performances d'identification de spécimens conservés de la sorte évaluées.

## **B. Choix des parties du corps à inclure**

Nous avons également démontré que le demi-idiosome pouvait être utilisé comme matrice pour réaliser une identification de tique, à condition que celui-ci ne soit pas issu d'un spécimen gorgé. En effet, l'utilisation de l'idiosome permet de renforcer la fiabilité de l'identification. Cette partie du corps est également plus facile à disséquer que les 4 pattes, en particulier pour les spécimens immatures. Bien que les 4 pattes soient la matrice la plus utilisée à l'heure actuelle, les spectres de l'idiosome de spécimens de référence devraient également être inclus dans une base de données partagée au sein de la communauté scientifique.

## **C. Standardisation de la préparation de l'échantillon**

Afin d'améliorer la reproductibilité, plusieurs paramètres sont importants à standardiser. Premièrement, les solvants organiques utilisés pour l'extraction. En effet, plusieurs techniques sont décrites dans la littérature pour extraire les protéines des arthropodes vecteurs (acide formique seul, acide formique et acétonitrile) (Yssouf *et al.*, 2016). Une uniformisation de la composition de la solution organique est nécessaire pour assurer une reproductibilité des résultats, quel que soit le laboratoire pratiquant les analyses.

Deuxièmement la façon de broyer le spécimen est également importante ; un broyage automatisé est à privilégier en comparaison d'un broyage manuel (Nebbak *et al.*, 2017). En effet, ce dernier permet d'obtenir des spectres plus reproductibles et plus intenses. Deux automates de broyage ont montré leur efficacité (FastPrep-24 [MP Biomedicals] et TissueLyser [Qiagen]) ; il conviendra

donc de tester d'autres systèmes assurant un broyage analogue en microtube afin d'assurer une meilleure transmission du protocole à d'autres équipes.

## D. Choix du spectromètre de masse

Actuellement, deux systèmes sont largement utilisés dans les laboratoires de microbiologie pour l'identification en routine des bactéries. Il s'agit des automates des sociétés Bruker et Biomérieux (Croxatto *et al.*, 2012). Les deux systèmes ont permis d'identifier les tiques avec succès (Yssouf *et al.*, 2013; Rothen *et al.*, 2016). Néanmoins, il n'existe pas à l'heure actuelle de système permettant de traiter et de comparer les spectres issus des deux systèmes, à une base de données de spécimens de référence.

Une plateforme gratuite, Mass-Up (López-Fernández *et al.*, 2015) permet d'importer des spectres de différents systèmes de spectrométrie de masse et de réaliser des opérations de regroupement des spectres, d'analyse en composante principale et contrôle de qualité des spectres. Mais il n'existe pas de méthode permettant de réaliser une identification microbienne ou de tiques. Dans le but de partager et diffuser à une plus grande échelle cette méthode d'identification, la création d'une plateforme permettant l'analyse de spectre acquis par des automates de différents fournisseurs constituerait une avancée majeure.

## II. DIFFERENCIATION D'ESPECES PHYLOGENETIQUEMENT PROCHES PAR MALDI-TOF

Nous avons démontré que le MALDI-TOF pouvait être utilisé pour identifier des espèces proches. Cependant certains groupes d'espèces de tique présentent une parenté phylogénétique encore plus importante que les trois espèces étudiées appartenant au complexe *I. ricinus*.

Par exemple, pour le genre *Rhipicephalus*, plusieurs lignées différentes coexistent au sein d'un complexe appelé *R. sanguineus* s.l. (Dantas-Torres *et al.*, 2013 b). Même si de faibles différences morphologiques existent au sein de ce complexe, des différences au niveau du génome mitochondrial ont été notées. Pour tester les capacités discriminatives du MALDI-TOF, il serait intéressant d'acquérir les spectres de plusieurs spécimens conservés de façon analogue et appartenant à ces différentes lignées.

Dans notre problématique portant sur l'étude des maladies transmises par *Ixodes*, la différenciation entre *I. ricinus* et *I. inopinatus* est un point majeur à élucider. En effet, cette dernière espèce a été récemment décrite et semble être présente aux mêmes endroits qu'*I. ricinus* en Europe. Il n'existe que peu de caractères morphologiques qui permettent de différencier *I. ricinus*

d'*I. inopinatus*. La différenciation ne peut être, pour l'instant, qu'effectuée sur la base du séquençage de l'ADN ribosomique 16S (2 nucléotides de différence sur un fragment d'environ 400 paires de bases amplifiées par les amorces décrite par (Mangold *et al.*, 1998)) (Hauck *et al.*, 2019). Avant d'utiliser le MALDI-TOF à grande échelle, pour des études d'épidémiologie vectorielle, il est nécessaire de savoir si ce dernier est assez performant pour discriminer les deux espèces correctement.

Ce travail a été initié lors du stage de BTS d'Andrea Grinner que nous avons supervisé et sera poursuivi par un stagiaire de master 2 en Janvier 2021.

### **III. ÉTUDE DES PROTEINES/PEPTIDES COMPOSANT LE SPECTRE DE MASSE**

Les protéines/peptides composant le spectre de masse d'une tique ne sont pas connues. Comme l'intégralité des pattes et du demi-idiosome est broyée, les protéines/peptides composant le spectre peuvent correspondre aux protéines de cuticule, de l'intestin ou d'autres organes (pour l'idiosome) et de l'hémolymphe. Les observations rapportées par Yssouf *et al.*, (2015a) suggèrent que les spectres issus de l'hémolymphe et des 4 pattes présentent une ressemblance. Mais il n'existe pas de travaux qui ont permis d'identifier avec précision les protéines/peptides du spectre. Pour le demi-idiosome, les protéines/peptides composant le spectre sont inconnues.

Une stratégie de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (stratégie LC-MS/MS) pourrait être employée pour identifier les protéines des extraits de tiques.

La connaissance des protéines/peptides composants le spectre permettrait de mieux comprendre les modifications du spectre lié à la conservation des spécimens dans l'alcool et permettrait d'identifier les protéines/peptides permettant de discriminer des espèces de tiques proches.

# RECHERCHE DE MICROORGANISMES EMERGENTS

---

Les progrès en matière de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence des microorganismes initialement détectés dans les tiques et dont le pouvoir pathogène était inconnu. Ces dix dernières années le pouvoir pathogène de *B. miyamotoi*, *N. mikurensis*, *R. helvetica* et *R. monacensis* a été mis en évidence. Ces microorganismes étaient à l'origine de syndromes pseudo-grippaux (Tijssse-Klasen *et al.*, 2014) ; nous nous y sommes donc naturellement intéressés.

## **I. LES AGENTS RESPONSABLES DE SYNDROMES FEBRILES APRES PIQURE DE TIQUE**

Dans notre travail, les rôles pathogènes respectifs de *B. miyamotoi*, *N. mikurensis* et *A. phagocytophilum* doivent être mis en perspective. En effet, ces microorganismes sont détectés dans des proportions équivalentes dans les tiques (1,35 % pour *A. phagocytophilum*, 2,2 % pour *B. miyamotoi* et 5 % pour *N. mikurensis*). Lors de nos travaux, nous avons exploité la même cohorte de patients. Cette cohorte de patient avait été mise en place pour l'étude d'*A. phagocytophilum* (PHRC HUS 2007–3960). *A. phagocytophilum* semble présenter un caractère infectieux plus important que *N. mikurensis* et *B. miyamotoi* puisque nous détectons par ailleurs entre 3 et 5 cas d'anaplasmose par an dans notre pratique de routine au laboratoire des hôpitaux universitaires de Strasbourg. Nous n'avons pas détecté de cas clinique de borréliose à *B. miyamotoi* et seulement 4 cas de néoehrlichiose par PCR. Parmi les microorganismes transmis par les tiques et responsables de syndromes fébriles, il semblerait exister un « gradient de pathogénicité ». Certains facteurs semblent favoriser l'infection (en particulier l'immunodépression). Pour mieux prévenir le risque de maladie, il est nécessaire d'étudier ces facteurs. Une étude prospective comparative sur une cohorte de patients permettrait de mieux répondre à cette question.

## **II. PERSPECTIVES**

Concernant la recherche de pathogènes émergents deux volets pourront être développés. Il s'agit premièrement de l'investigation de tableaux cliniques différents des syndromes fébriles après piqûre de tique. D'autres approches non supervisées, c'est-à-dire sans *a priori*, pourraient être employées pour rechercher d'autres microorganismes susceptibles de provoquer ces syndromes.

## A. Autres tableaux cliniques à investiguer

Nous avons recherché les pathogènes transmis par les tiques émergents comme agent étiologique d'un syndrome infectieux : le syndrome fébrile après piqûre de tique. D'autres entités cliniques pourraient être également explorées.

En effet, très récemment des infections oculaires (uvéites) à *Spiroplasma ixodeti* ont été décrites (Matet *et al.*). *Spiroplasma ixodetis* est une bactérie de la classe des mollicutes, décrite comme endosymbiontes d'*I. ricinus* (Binetruy *et al.*, 2019). Les techniques de biologie moléculaire (PCR 16S) mises en œuvre au laboratoire de bactériologie des hôpitaux universitaires de Strasbourg sur les ponctions de chambre antérieure auraient permis de mettre en évidence<sup>1</sup> *Spiroplasma ixodetis* si un cas clinique se présentait aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

De l'ADN de *N. mikurensis* a également été détecté dans le sang de patients présentant un érythème migrant (Grankvist *et al.*, 2015; Jahfari *et al.*, 2016; Ocias *et al.*, 2020). Ce dernier point n'est pas une preuve que *N. mikurensis* est responsable de cette manifestation. Ce microorganisme pourrait en effet être accompagnant d'une infection à *Borrelia* non détectée par les techniques de PCR et de culture. Cependant, dans les laboratoires, certains érythèmes migrants restent sans documentation microbiologique. En effet, la sensibilité de la PCR sur biopsie cutanée est évaluée à 69 % (Dessau *et al.*, 2018). Il serait donc intéressant de tester la PCR *N. mikurensis* sur les biopsies cutanées de ces érythèmes migrants.

Un autre tableau clinique qu'il serait intéressant d'investiguer est la méningo-encéphalite pour rechercher *B. miyamotoi*. En effet, cette dernière a été mise en évidence dans le LCR de patients immunodéprimés et d'un patient immunocompétent (Wagemakers *et al.*, 2015 ; Henningsson *et al.*, 2019). Il n'existe aucune étude à l'heure actuelle sur la prévalence de cette pathologie parmi les neuroborrélioses.

## B. Approche non supervisée pour le diagnostic des syndromes fébriles après piqûre de tique

Tijssse-Klasen *et al.*, (2014) opposent deux manières de découvrir le lien entre microorganisme transmis par les tiques et maladie. **La découverte conventionnelle** consiste à partir de plusieurs cas cliniques présentant des symptômes similaires, possiblement liés à une exposition aux tiques et de mettre en évidence dans un second temps le microorganisme responsable. Cette méthodologie a

---

<sup>1</sup> A la suite de la publication de Matet *et al.*, (2020), un alignement des amorces 16S utilisées au laboratoire et le génome de *Spiroplasma ixodetis* n'a pas montré de mésappariement avec les amorces que nous utilisons (Meddeb *et al.*, 2016).

permis la découverte de la maladie de Lyme et de la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses par exemple.

À la découverte conventionnelle s'oppose **la découverte inverse**. Cette dernière consiste à d'abord identifier des microorganismes dans les tiques puis à aller les rechercher chez les patients. Cette méthodologie a été employée pour la mise en évidence de *B. miyamotoi* et de *N. mikurensis*.

Une approche intéressante consisterait à partir du patient fébrile après piqûre de tique et d'appliquer des techniques sans *a priori*, par exemple le séquençage de nouvelle génération. Cette approche pourrait également présenter un intérêt majeur pour l'approfondissement des connaissances sur ces syndromes fébriles. Cette démarche a déjà été adoptée en Chine où elle a permis la mise en évidence d'un nouveau Bunyavirus (Xu *et al.*, 2011).

### **C. Perspective ancillaire : étude du réservoir de *N. mikurensis***

Une perspective ancillaire au travail sur *N. mikurensis* est l'étude du réservoir animal de *N. mikurensis*. En effet, différents animaux ont été suspectés d'être réservoir de *N. mikurensis* (Wennerås, 2015) (campagnols, souris, tamias...). Seul *Myodes glareolus* (campagnol roussâtre) et les souris du genre *Apodemus* spp. ont été décrits comme des réservoirs par des expériences de transmission (Burri *et al.*, 2014). La disparité spatio-temporelle entre les années et les sites de collectes étudiés en Alsace suggère qu'un hôte réservoir (rongeur ou micromammifère) est présent en plus grande quantité dans le site où la prévalence de *N. mikurensis* est plus importante. Ce dernier pourrait participer à amplifier le portage de *N. mikurensis* par les tiques.



# AMELIORATION DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES SYNDROMES FEBRILES APRES PIQURE DE TIQUES

---

Une meilleure documentation microbiologique de ces syndromes fébriles après piqûre de tique est fondamentale, car elle permettrait de proposer un traitement antibiotique adapté s'il s'agit d'une bactérie (basé principalement sur de la doxycycline) et une surveillance clinique (par exemple des événements thromboemboliques pour *N. mikurensis*).

## I. AMELIORATION A COURT ET MOYEN TERMES

### **A. Amélioration à court terme (Janvier 2021)**

Ces syndromes fébriles après piqûre de tique constituent actuellement un défi diagnostique. Pour améliorer ce dernier nous envisageons à court terme de réaliser une détection multiplexée d'*A. phagocytophilum* et de *N. mikurensis* par biologie moléculaire à partir d'un prélèvement de sang total pour toute recherche d'*A. phagocytophilum* adressée à notre laboratoire (date de mise en place envisagée janvier 2021). La mise au point de cette technique multiplexée pourra également permettre une surveillance plus aisée de ces deux microorganismes dans les tiques collectées mensuellement par le CNR *Borrelia*.

### **B. Amélioration à moyen terme**

À moyen terme, nous envisageons de réaliser un « kit » de diagnostic des « syndrome fébrile après piqûre de tique » permettant de systématiser la réalisation d'examens paracliniques de recherche étiologique. Ce dernier inclura un prélèvement de sang total pour la PCR et un prélèvement pour la réalisation de sérologies. De plus, si une manifestation cutanée est détectée lors de l'examen clinique, celle-ci pourra également être prélevée (frottis cutané ou biopsie).

## II. AMELIORATION A PLUS LONG TERME

De nouvelles approches diagnostiques semblent nécessaires pour faire le diagnostic microbiologique des syndromes fébriles après piqûre de tique. Nous avons présenté une approche basée sur la protéomique. Cette dernière est intéressante, car elle permet la détection simultanée de plusieurs microorganismes : bactéries, virus, parasites. À terme, l'idée est de mettre en place une technique de protéomique ciblée. Cette dernière offre des capacités de multiplexage plus importantes



que celles rendues possibles par les techniques de PCR en temps réel maison. Elle permettrait d'éviter de nombreuses PCR spécifiques et fournirait un résultat en une seule manipulation.

L'étude préliminaire présentée ici constitue le premier jalon vers le développement de cette technique de protéomique ciblée. Cette première phase est fondamentale pour le choix des biomarqueurs à utiliser à l'avenir. Une fois la méthode par protéomique ciblée mise en place, une étude de performance sur modèle murin par rapport à un Gold-Standard (principalement PCR) sera nécessaire.

# CONCLUSION

Trois axes ont été développés dans cette thèse. Le premier concerne l'entomologie médicale avec l'**identification** de l'espèce de tique par une méthodologie innovante : le MALDI-TOF. L'identification permet d'affirmer le caractère vecteur ou non vecteur d'une tique collectée dans la nature, sur animal ou retirée d'un patient. Le second s'intéresse à l'**implication de deux microorganismes décrits comme émergents** en tant qu'agent étiologique de syndromes fébriles après piqûre de tique : *B. miyamotoi* et *N. mikurensis*. Cet axe comporte également un volet « épidémiologie vectorielle », ces microorganismes ont également été recherchés dans les tiques collectées en Alsace depuis 2013 (*B. miyamotoi* et *N. mikurensis*) et en Bretagne (*N. mikurensis*). Enfin, le troisième axe est une étude préliminaire sur le développement de nouveaux outils permettant le **diagnostic étiologique des syndromes fébriles après piqûre de tique**. Ces axes de recherche sont profondément **interconnectés** dans une approche translationnelle de l'étude des MVT : de la tique vectrice au patient. Ces relations sont illustrées à la Figure 24.

L'identification précise d'une espèce de tique collectée est un élément important à la base de l'étude des MVT. Elle permet de connaître le rôle précis de la tique dans la transmission d'un ou plusieurs microorganismes. Identifier des tiques avec précision permettra dans le futur de mettre en évidence des interactions tiques/microorganisme non encore élucidées actuellement. La facilité d'utilisation d'un MALDI-TOF et sa grande diffusion dans les laboratoires de microbiologie en font l'outil idoine pour atteindre ce but. Sa principale limitation à l'heure actuelle réside dans la disponibilité de bases de données suffisamment importantes pour identifier la plupart des espèces de tiques. Une fois la tique identifiée, une cartographie du risque acarologique et une mise en place de mesures de prévention peuvent être effectuées. À ces fins, la recherche de microorganismes ayant une pertinence clinique parmi les nombreux présents dans les tiques doit être entreprise.

Pour connaître l'implication des microorganismes émergents transmis par les tiques, nous avons investigué les syndromes fébriles après piqûre de tique. En effet, c'est l'étude de ces syndromes qui a permis et qui permettra de mettre en évidence leur pouvoir pathogène et d'étudier les spécificités cliniques liées à un microorganisme afin de proposer une surveillance adaptée aux patients piqués.

Enfin, bien qu'il existe des spécificités cliniques selon le microorganisme, ces syndromes peuvent se confondre cliniquement. Ils apparaissent en général de façon précoce après la piqûre de tique (7 à 10 jours). Un diagnostic syndromique, c'est-à-dire permettant de réaliser simultanément la détection des agents infectieux transmis par les tiques, constitue une piste de recherche innovante qui nécessite d'être explorée à l'avenir.

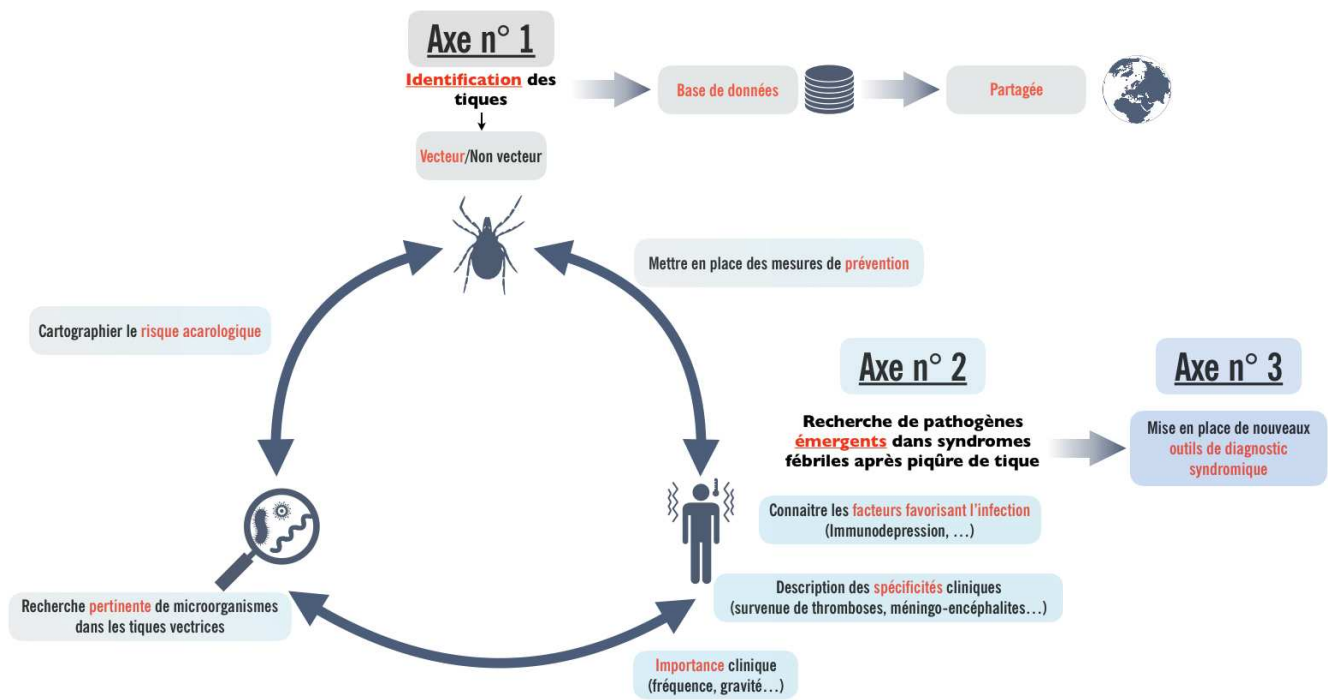


Figure 24 : Résumé des axes de recherche et des perspectives développés dans cette thèse

# BIBLIOGRAPHIE

- Agoulon, A., Hoch, T., Heylen, D., Chalvet-Monfray, K., and Plantard, O. (2019). Unravelling the phenology of *Ixodes frontalis*, a common but understudied tick species in Europe. *Ticks Tick-Borne Dis.* 10, 505–512. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.12.009.
- Anderson, J. M., Ammerman, N. C., and Norris, D. E. (2004). Molecular differentiation of metastriate tick immatures. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N 4*, 334–342. doi:10.1089/vbz.2004.4.334.
- Apanaskevich, D., and Oliver, J. (2013). “Life cycles and natural history of ticks,” in *Biology of ticks*, eds. D. E. Sonenshine and R. M. Roe, 59–73.
- Arthur, D. R. (1956). The *Ixodes* ticks of Chiroptera (Ixodoidea, Ixodidae). *J. Parasitol.* 42, 180–196.
- Aubert, D. (2015). A formal analysis of phylogenetic terminology: Towards a reconsideration of the current paradigm in systematics. *Phytoneuron* 2015–66, 1–54.
- Beati, L., and Keirans, J. E. (2001). Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.* 87, 32–48. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[0032:AOTSRA]2.0.CO;2.
- Bernard, Q., Grillon, A., Lenormand, C., Ehret-Sabatier, L., and Boulanger, N. (2020). Skin Interface, a Key Player for *Borrelia* Multiplication and Persistence in Lyme Borreliosis. *Trends Parasitol.* 36, 304–314. doi:10.1016/j.pt.2019.12.017.
- Binetruy, F., Bailly, X., Chevillon, C., Martin, O. Y., Bernasconi, M. V., and Duron, O. (2019). Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. *Ticks Tick-Borne Dis.* 10, 575–584. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.02.001.
- Black, W. C., and Piesman, J. (1994). Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10034–10038.
- 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. doi:10.3389/fcimb.2017.00236.
- Bonnet, S. I., Bouhsira, E., De Regge, N., Fite, J., Etoré, F., Garigliany, M.-M., *et al.* (2020). Putative Role of Arthropod Vectors in African Swine Fever Virus Transmission in Relation to Their Bio-Ecological Properties. *Viruses* 12. doi:10.3390/v12070778.
- Botelho-Nevers, E., Gagneux-Brunon, A., Velay, A., Guerbois-Galla, M., Grard, G., Bretagne, C., *et al.* (2019). Tick-Borne Encephalitis in Auvergne-Rhône-Alpes Region, France, 2017-2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1944–1948. doi:10.3201/eid2510.181923.
- Boucheikhchoukh, M., Laroche, M., Aouadi, A., Dib, L., Benakhla, A., Raoult, D., *et al.* (2018). MALDI-TOF MS identification of ticks of domestic and wild animals in Algeria and molecular detection of associated microorganisms. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 39–49. doi:10.1016/j.cimid.2018.05.002.
- Boulanger, N., and McCoy, K. (2018). “Les tiques (Acari: Ixodida),” in *Entomologie médicale et*

vétérinaire Référence., eds. G. Duvallet, D. Fontenille, and V. Robert (Marseille : IRD Éditions), 553–596. Available at: <http://books.openedition.org/irdeditions/22142> [Accessed June 17, 2020].

- Boyer, P. H., Boulanger, N., Nebbak, A., Collin, E., Jaulhac, B., and Almeras, L. (2017a). Assessment of MALDI-TOF MS biotyping for *Borrelia burgdorferi* sl detection in *Ixodes ricinus*. *PloS One* 12, e0185430. doi:10.1371/journal.pone.0185430.
- Boyer, P. H., De Martino, S. J., Hansmann, Y., Zilliox, L., Boulanger, N., and Jaulhac, B. (2017). No evidence of *Borrelia mayonii* in an endemic area for Lyme borreliosis in France. *Parasit Vectors* 10, 282. doi:10.1186/s13071-017-2212-7.
- Boyer, P. H., Almeras, L., Plantard, O., Grillon, A., Talagrand-Reboul, É., McCoy, K., et al. (2019a). Identification of closely related *Ixodes* species by protein profiling with MALDI-TOF mass spectrometry. *PloS One* 14, e0223735. doi:10.1371/journal.pone.0223735.
- Boyer, P., Talagrand-Reboul, É., Grillon, A., and Jaulhac, B. (2019 b). La borréliose de Lyme et son diagnostic biologique. *Rev. Francoph. Lab.* 2019, 44–54. doi:10.1016/S1773-035X(19)30288-6.
- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E., and Davis, J. P. (1982). Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317–1319.
- Burri, C., Schumann, O., Schumann, C., and Gern, L. (2014). Are Apodemus spp. mice and Myodes glareolus reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neohhrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 245–251. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.11.007.
- Campbell, P. M. (2005). Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Syst. Entomol.* 30, 186–190. doi:10.1111/j.1365-3113.2004.00279.x.
- Charretier, Y., Dauwalder, O., Franceschi, C., Degout-Charrette, E., Zambardi, G., Cecchini, T., et al. (2015). Rapid bacterial identification, resistance, virulence and type profiling using selected reaction monitoring mass spectrometry. *Sci. Rep.* 5. doi:10.1038/srep13944.
- Chitimia-Dobler, L., Bestehorn, M., Bröker, M., Borde, J., Molcanyi, T., Andersen, N. S., et al. (2017). Morphological anomalies in *Ixodes ricinus* and *Ixodes inopinatus* collected from tick-borne encephalitis natural foci in Central Europe. *Exp. Appl. Acarol.* 72, 379–397. doi:10.1007/s10493-017-0163-5.
- Chitimia-Dobler, L., Rieß, R., Kahl, O., Wölfel, S., Dobler, G., Nava, S., et al. (2018). *Ixodes inopinatus* – Occurring also outside the Mediterranean region. *Ticks Tick-Borne Dis.* 9, 196–200. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.09.004.
- Chitimia-Dobler, L., Schaper, S., Rieß, R., Bitterwolf, K., Frangoulidis, D., Bestehorn, M., et al. (2019). Imported Hyalomma ticks in Germany in 2018. *Parasit. Vectors* 12, 134. doi:10.1186/s13071-019-3380-4.
- Clifford, C. M., and Anastos, G. (1960). The use of chaetotaxy in the identification of larval ticks (Acarina: Ixodidae). *J. Parasitol.* 46, 567–578. doi:10.2307/3274939.
- Colwell, D. D., Dantas-Torres, F., and Otranto, D. (2011). Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet. Parasitol.* 182, 14–21. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.012.

- Croxatto, A., Prod'hom, G., and Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 380–407. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- Cuellar, J., Dub, T., Sane, J., and Hytönen, J. (2019). Historical perspective on the seroprevalence of Lyme borreliosis in Finland. International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease ; 8-11 septembre 2019; Vienne, Autriche.
- Cuisance, D., and Antoine Rioux, J. (2004). Current status of medical and veterinary entomology in France: endangered discipline or promising science? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 377–392. doi:10.1016/j.cimid.2004.03.007.
- Daniel, M., Danielová, V., Kríz, B., Jirsa, A., and Nozicka, J. (2003). Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 22, 327–328. doi:10.1007/s10096-003-0918-2.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., and Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- Dantas-Torres, F., and Otranto, D. (2013a). Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* on ground level and higher vegetation in a preserved wooded area in southern Europe. *Vet. Parasitol.* 192, 253–258. doi:10.1016/j.vetpar.2012.09.034.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., and Otranto, D. (2013b). Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasit. Vectors* 6, 213. doi:10.1186/1756-3305-6-213.
- Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., and Kahl, O. (2008). Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 50–54. doi:10.1016/j.ijmm.2008.01.010.
- Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., and Schettler, E. (2006). Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of Rickettsia sp. RpA4. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 149–156. doi:10.1016/j.ijmm.2006.01.013.
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, 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. doi:10.2741/3200.
- de la Fuente, J., Contreras, M., Estrada-Peña, A., and Cabezas-Cruz, A. (2017). Targeting a global health problem: Vaccine design and challenges for the control of tick-borne diseases. *Vaccine.* 17, S0264-410X(17)31023-X.
- DeFoliart, G. R., Grimstad, P. R., and Watts, D. M. (1987). Advances in Mosquito-Borne Arbovirus/Vector Research. *Annu. Rev. Entomol.* 32, 479–505. doi:10.1146/annurev.en.32.010187.002403.
- Dessau, R. B., Dam, A. P. van, Fingerle, V., Gray, J., Hovius, J. W., Hunfeld, K.-P., et al. (2018). To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 118–124. doi:10.1016/j.cmi.2017.08.025.
- Diarra, A. Z., Almeras, L., Laroche, M., Berenger, J.-M., Koné, A. K., Bocoum, Z., et al. (2017). Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria in Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.*



11, e0005762. doi:10.1371/journal.pntd.0005762.

- Dietrich, M., Gómez-Díaz, E., and McCoy, K. D. (2011). Worldwide distribution and diversity of seabird ticks: implications for the ecology and epidemiology of tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 11, 453–470. doi:10.1089/vbz.2010.0009.
- Durden, L., Beati, L., Sonenshine, D. E., and Roe, R. M. (2013). “Modern tick systematics,” in *Biology of ticks* (Oxford Univ. Press New York), 17–58.
- Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., *et al.* (2018). Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr. Biol. CB* 28, 1896-1902.e5. doi:10.1016/j.cub.2018.04.038.
- Duvallet, G., Boulanger, N., and Robert, V. (2018). “Arthropods: Definition and Medical Importance,” in *Skin and Arthropod Vectors*, ed. N. Boulanger (Academic Press), 29–54. doi :10.1016/B978-0-12-811436-0.00002-2.
- Eisen, L. (2020). Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: A review. *Ticks Tick-Borne Dis.* 11, 101359. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101359.
- Ergönül, Ö. (2006). Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect. Dis.* 6, 203–214. doi:10.1016/S1473-3099(06)70435-2.
- Estrada-Peña, A., and Jongejan, F. (1999). Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 685–715.
- Estrada-Peña, A., Nava, S., and Petney, T. (2014). Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 734–743. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.05.003.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D., and Petney, T. eds. (2017). *Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification*. Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-319-63760-0.
- Farkas, R., Estrada-Peña, A., Jaenson, T. G. T., Pascucci, I., and Madder, M. (2013). “Basic biology and geographical distribution of tick species involved in the transmission of animal pathogens, including zoonoses,” in *Ticks and tick-borne diseases: geographical distribution and control strategies in the Euro-Asia region*, eds. M. Salman and J. Tarrés-Call (Wallingford: CABI), 6–26. doi:10.1079/9781845938536.0006.
- Feltens, R., Görner, R., Kalkhof, S., Gröger-Arndt, H., and von Bergen, M. (2010). Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *BMC Evol. Biol.* 10, 95. doi:10.1186/1471-2148-10-95.
- Ferquel, E., Garnier, M., Marie, J., Bernede-Bauduin, C., Baranton, G., Perez-Eid, C., *et al.* (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme Borreliosis endemicity in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3074–3078. doi:10.1128/AEM.72.4.3074-3078.2006.
- Fotso Fotso, A., Mediannikov, O., Diatta, G., Almeras, L., Flaudrops, C., Parola, P., *et al.* (2014). MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crocidurae/Ornithodoros sonrai* paradigm. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2984. doi:10.1371/journal.pntd.0002984.
- Francischetti, I. M. B., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., and Ribeiro, J. M. C. (2009). The role of

- saliva in tick feeding. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 2051–2088. doi:10.2741/3363.
- Geer, L. Y., Markey, S. P., Kowalak, J. A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D. M., *et al.* (2004). Open mass spectrometry search algorithm. *J. Proteome Res.* 3, 958–964. doi:10.1021/pr0499491.
- Gern, L., and Humair, P. F. (2002). “Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe,” in *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*, eds. J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, and G. Stanek (Wallingford: CABI), 149–174. doi:10.1079/9780851996325.0149.
- Gilot, B., Beaucournu, J. C., and Chastel, C. (1997). Collecte « au drapeau » et fixation sur l’homme d’Ixodes (Trichotoixodes) frontalis (Panzer, 1795). *Parasite* 4, 197–199. doi:10.1051/parasite/1997042197.
- Grandi, G., Chitimia-Dobler, L., Choklikitumnuey, P., Strube, C., Springer, A., Albihn, A., *et al.* (2020). First records of adult *Hyalomma marginatum* and *H. rufipes* ticks (Acari: Ixodidae) in Sweden. *Ticks Tick-Borne Dis.* 11, 101403. doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101403.
- Grandjean, F. (1969). Stasis. Actinopiline. Explanation of my mites classification into three major groups. Terminology of -soma. *Acarologia* 11, 796–827.
- Grankvist, A., Sandelin, L. L., Andersson, J., Fryland, L., Wilhelmsson, P., Lindgren, P.-E., *et al.* (2015). Infections with *Candidatus Neohhrlichia mikurensis* and Cytokine Responses in 2 Persons Bitten by Ticks, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1462–1465. doi:10.3201/eid2108.150060.
- Gray, J. S. (1998). Review The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Exp. Appl. Acarol.* 22, 249–258. doi:10.1023/A:1006070416135.
- Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., and Lindgren, E. (2009). Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009. doi:10.1155/2009/593232.
- Grillon, A., Westermann, B., Cantero, P., Jaulhac, B., Voordouw, M. J., Kapps, D., *et al.* (2017). Identification of *Borrelia* protein candidates in mouse skin for potential diagnosis of disseminated Lyme borreliosis. *Sci. Rep.* 7, 16719. doi:10.1038/s41598-017-16749-9.
- Guadagno, N. A., and Progida, C. (2019). Rab GTPases: Switching to Human Diseases. *Cells* 8. doi:10.3390/cells8080909.
- Guglielmone, A. A., and Robbins, R. G. (2018). *Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) Parasitizing Humans: A Global Overview*. Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-319-95552-0.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., *et al.* (2010). The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: *Ixodida*) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528, 1–28.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., and Horak, I. G. (2014). *The Hard Ticks of the World: (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. Springer Netherlands Available at: [//www.springer.com/gp/book/9789400774964](http://www.springer.com/gp/book/9789400774964) [Accessed June 4, 2018].
- Hansmann, Y., Jaulhac, B., Kieffer, P., Martinot, M., Wurtz, E., Dukic, R., *et al.* (2019). Value of PCR, Serology, and Blood Smears for Human Granulocytic Anaplasmosis Diagnosis, France. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 996–998. doi:10.3201/eid2505.171751.



- Harris, S., and Thompson, G. B. (1978). Populations of the ticks *Ixodes* (Pholeoixodes) *hexagonus* and *Ixodes* (Pholeoixodes) *canisuga* infesting suburban foxes, *Vulpes vulpes*. *J. Zool.* 186, 83–93. doi:10.1111/j.1469-7998.1978.tb03358.x.
- Hauck, D., Springer, A., Pachnicke, S., Schunack, B., Fingerle, V., and Strube, C. (2019). *Ixodes inopinatus* in northern Germany: occurrence and potential vector role for *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., and *Anaplasma phagocytophilum* in comparison with *Ixodes ricinus*. *Parasitol. Res.* 118, 3205–3216. doi:10.1007/s00436-019-06506-4.
- Hauser, G., Rais, O., Morán Cadenas, F., Gonseth, Y., Bouzelboudjen, M., and Gern, L. (2018). Influence of climatic factors on *Ixodes ricinus* nymph abundance and phenology over a long-term monthly observation in Switzerland (2000–2014). *Parasit. Vectors* 11. doi:10.1186/s13071-018-2876-7.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., and Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 14812–14817. doi:10.1073/pnas.0406166101.
- Henningsson, A. J., Asgeirsson, H., Hammas, B., Karlsson, E., Parke, Å., Hoornstra, D., et al. (2019). Two Cases of *Borrelia miyamotoi* Meningitis, Sweden, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1965–1968. doi:10.3201/eid2510.190416.
- Heylen, D., De Coninck, E., Jansen, F., and Madder, M. (2014). Differential diagnosis of three common *Ixodes* spp. ticks infesting songbirds of Western Europe: *Ixodes arboricola*, *I. frontalis* and *I. ricinus*. *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 693–700. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.05.006.
- Holman, R. C., Paddock, C. D., Curns, A. T., Krebs, J. W., McQuiston, J. H., and Childs, J. E. (2001). Analysis of risk factors for fatal rocky mountain spotted fever: evidence for superiority of tetracyclines for therapy. *J. Infect. Dis.* 184, 1437–1444. doi:10.1086/324372.
- 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. *Parasit. Vectors* 5, 8. doi:10.1186/1756-3305-5-8.
- 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 Tick-Borne Dis.* 2, 44–49. doi:10.1016/j.ttbdis.2010.10.006.
- Jaenson, T. G. T., Tälleklint, L., Lundqvist, L., Olsen, B., Chirico, J., and Mejlön, H. (1994). Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden. *J. Med. Entomol.* 31, 240–256. doi:10.1093/jmedent/31.2.240.
- 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 Negl. Trop. Dis.* 10, e0005042. doi:10.1371/journal.pntd.0005042.
- Jahfari, S., and Sprong, H. (2016). “Emerging tick-borne pathogens: ticking on Pandora’s box,” in *Ecology and prevention of Lyme borreliosis Ecology and Control of Vector-borne Diseases*. (Wageningen Academic Publishers), 127–147. doi:10.3920/978-90-8686-838-4\_9.

- Jongejan, F., and Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14. doi:10.1017/s0031182004005967.
- Kahl, O. (2018). Hard ticks as vectors—some basic issues. *Wien. Klin. Wochenschr.* 130, 479–483. doi:10.1007/s00508-018-1360-x.
- Kahl, O., Gern, L., Eisen, L., and Lane, R. S. (2002). “Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: terminology and some methodological pitfalls.” in *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*. (CABI; First edition), 29–46.
- Karger, A., Bettin, B., Gethmann, J. M., and Klaus, C. (2019). Whole animal matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry of ticks - Are spectra of *Ixodes ricinus* nymphs influenced by environmental, spatial, and temporal factors? *PloS One* 14, e0210590. doi:10.1371/journal.pone.0210590.
- Karger, A., Kampen, H., Bettin, B., Dautel, H., Ziller, M., Hoffmann, B., et al. (2012). Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Ticks Tick-Borne Dis.* 3, 78–89. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.11.002.
- Keirans, J. E., Needham, G. R., and Oliver Jr, J. H. (1999). The *Ixodes ricinus* complex worldwide: diagnosis of the species in the complex, hosts and distribution. *Acarol.* IX 2, 341–347.
- Kilpatrick, A. M., and Randolph, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet* 380, 1946–1955. doi:10.1016/S0140-6736(12)61151-9.
- Kingry, L. C., and Petersen, J. M. (2014). Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4. doi:10.3389/fcimb.2014.00035.
- Klompen, J. S. H. (1992). Comparative morphology of argasid larvae (Acari: Ixodida: Argasidae), with notes on phylogenetic relationships. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85, 541–560. doi:10.1093/aesa/85.5.541.
- Korenberg, E., Gorelova, N., and Kovalevskii, Y. (2002). “Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia,” in 175–200. doi:10.1079/9780851996325.0175.
- Korenberg, E. I. (2000). Seasonal population dynamics of ixodes ticks and tick-borne encephalitis virus. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 665–681. doi:10.1023/A:1010798518261.
- Kumsa, B., Laroche, M., Almeras, L., Mediannikov, O., Raoult, D., and Parola, P. (2016). Morphological, molecular and MALDI-TOF mass spectrometry identification of ixodid tick species collected in Oromia, Ethiopia. *Parasitol. Res.* 115, 4199–4210. doi:10.1007/s00436-016-5197-9.
- Lindgren, E., and Gustafson, R. (2001). Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet Lond. Engl.* 358, 16–18. doi:10.1016/S0140-6736(00)05250-8.
- Lindgren E, Tälleklin L, and Polfeldt T (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ. Health Perspect.* 108, 119–123. doi:10.1289/ehp.00108119.
- López-Fernández, H., Santos, H. M., Capelo, J. L., Fdez-Riverola, F., Glez-Peña, D., and Reboiro-Jato, M. (2015). Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics* 16. doi:10.1186/s12859-015-0752-4.

- Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Chen, Y., Feng, C., Yuan, X., *et al.* (2014). Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the *Ixodida* (Acari: *Ixodida*). *Parasit. Vectors* 7, 93. doi:10.1186/1756-3305-7-93.
- Mangold, A. J., Bargues, M. D., and Mas-Coma, S. (1998). Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastricata* (Acari: *Ixodidae*). *Parasitol. Res.* 84, 478–484. doi:10.1007/s004360050433.
- 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.
- Matet, A., Flèche-Matéos, A. L., Doz, F., Dureau, P., and Cassoux, N. Ocular *Spiroplasma ixodetis* in Newborns, France - Volume 26, Number 2—February 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. doi:10.3201/eid2602.191097.
- Matuschka, F. R., Richter, D., Fischer, P., and Spielman, A. (1990). Nocturnal detachment of the tick *Ixodes hexagonus* from nocturnally active hosts. *Med. Vet. Entomol.* 4, 415–420. doi :10.1111/j.1365-2915.1990.tb00459.x.
- McCoy, K. D., and Boulanger, N. (2015). *Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive, épidémiologie*.
- Mccooy, K. D., Boulonier, T., Tirard, C., and Michalakis, Y. (2001). Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *J. Evol. Biol.* 14, 395–405. doi:10.1046/j.1420-9101.2001.00290.x.
- Meddeb, M., Koebel, C., Jaulhac, B., and Schramm, F. (2016). Comparison between a broad-range real-time and a broad-range end-point PCR assays for the detection of bacterial 16S rRNA in clinical samples. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 46, 18–25.
- 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. *Parasit. Vectors* 6, 1. doi:10.1186/1756-3305-6-1.
- Monks, D., Fisher, M., and Forbes, N. A. (2006). *Ixodes frontalis* and avian tick-related syndrome in the United Kingdom. *J. Small Anim. Pract.* 47, 451–455. doi:10.1111/j.1748-5827.2006.00031.x.
- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F. H., Devillers, E., *et al.* (2016). Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLOS Negl Trop Dis* 10(3), e0004539. doi :10.1371/journal.pntd.0004539.
- Müller, P., Pflüger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., *et al.* (2013). Identification of cryptic anopheles mosquito species by molecular protein profiling. *PLOS ONE* 8, e57486. doi:10.1371/journal.pone.0057486.
- Nakao, R., Abe, T., Nijhof, A. M., Yamamoto, S., Jongejan, F., Ikemura, T., *et al.* (2013). A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. *ISME J.* 7, 1003–1015. doi:10.1038/ismej.2012.171.
- Nava, S., Guglielmone, A. A., and Mangold, A. J. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 2857–2877. doi:10.2741/3418.

- Nebbak, A., Willcox, A. C., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P., and Almeras, L. (2016). Standardization of sample homogenization for mosquito identification using an innovative proteomic tool based on protein profiling. *Proteomics*. doi:10.1002/pmic.201600287.
- Nebbak, A., El Hamzaoui, B., Berenger, J.-M., Bitam, I., Raoult, D., Almeras, L., *et al.* (2017). Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. *Med. Vet. Entomol.* doi:10.1111/mve.12250.
- Nebbak, A., Dahmana, H., Almeras, L., Raoult, D., Boulanger, N., Jaulhac, B., *et al.* (2019). Co-infection of bacteria and protozoan parasites in *Ixodes ricinus* nymphs collected in the Alsace region, France. *Ticks Tick-Borne Dis.* 10, 101241. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.06.001.
- Obsomer, V., Wirtgen, M., Linden, A., Claerebout, E., Heyman, P., Heylen, D., *et al.* (2013). Spatial disaggregation of tick occurrence and ecology at a local scale as a preliminary step for spatial surveillance of tick-borne diseases: general framework and health implications in Belgium. *Parasit. Vectors* 6, 190. doi:10.1186/1756-3305-6-190.
- Ocias, L. F., Wilhelmsson, P., Sjöwall, J., Henningsson, A. J., Nordberg, M., Jørgensen, C. S., *et al.* (2020). Emerging tick-borne pathogens in the Nordic countries: A clinical and laboratory follow-up study of high-risk tick-bitten individuals. *Ticks Tick-Borne Dis.* 11, 101303. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101303.
- Ogden, N. (2013). Changing geographic ranges of ticks and tick-borne pathogens: drivers, mechanisms and consequences for pathogen diversity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00046.
- Ogden, N. H., Lindsay, L. R., Morshed, M., Sockett, P. N., and Artsob, H. (2009). The emergence of Lyme disease in Canada. *CMAJ* 180, 1221–1224. doi:10.1503/cmaj.080148.
- Okeyo, M., Hepner, S., Rollins, R. E., Hartberger, C., Straubinger, R. K., Marosevic, D., *et al.* (2020). Longitudinal study of prevalence and spatio-temporal distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from three defined habitats in Latvia, 1999-2010. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.15100.
- Parola, P., Paddock, C. D., and Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 719–756. doi:10.1128/CMR.18.4.719-756.2005.
- Pascal, C., Arquembourg, J., Vorilhon, P., and Lesens, O. (2020). Emergence of Lyme disease as a social problem: analysis of discourse using the media content. *Eur. J. Public Health* 30, 475–481. doi:10.1093/eurpub/ckz198.
- 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. *Nat. Commun.* 8. doi:10.1038/s41467-017-01550-z.
- Perera, M., Flores Vargas, R., and Jones, M. (2005). Identification of aphid species using protein profiling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Entomol. Exp. Appl.* 117, 243–247. doi:10.1111/j.1570-7458.2005.00353.x.
- Pérez-Eid, C. (2007). *Les tiques. Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Lavoisier.

- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.
- Petney, T., Moser, E., Littwin, N., Pfäffle, M., Muders, S., and Taraschewski, H. (2015). Additions to the " Annotated Checklist of the Ticks of Germany " : *Ixodes acuminatus* and *Ixodes inopinatus*. *Exp. Appl. Acarol.* 20, 221–224. doi:10.11158/saa.20.2.9.
- Petney, T. N., Pfäffle, M. P., and Skuballa, J. D. (2012). An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Syst. Appl. Acarol.* 17, 115–170. doi:10.11158/saa.17.2.2.
- Pfäffle, M., Petney, T., Skuballa, J., and Taraschewski, H. (2011). Comparative population dynamics of a generalist (*Ixodes ricinus*) and specialist tick (*I. hexagonus*) species from European hedgehogs. *Exp. Appl. Acarol.* 54, 151–64. doi:10.1007/s10493-011-9432-x.
- Pichon, B., Rogers, M., Egan, D., and Gray, J. (2005). Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 5, 172–180. doi:10.1089/vbz.2005.5.172.
- 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. doi:10.3201/eid1710.101474.
- Poupon, M.-A., Lommano, E., Humair, P.-F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., *et al.* (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensus Lato in Ticks Collected from Migratory Birds in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 976–979. doi:10.1128/AEM.72.1.976-979.2006.
- Predel, R., Roth, S., Neupert, S., and Picker, M. (2005). New insect order Mantophasmatodea: species differentiation by mass fingerprints of peptide hormones? *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 43, 149–156. doi:10.1111/j.1439-0469.2004.00280.x.
- Pritt, B. S., Mead, P. S., Johnson, D. K. H., Neitzel, D. F., Respcio-Kingry, L. B., Davis, J. P., *et al.* (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 556–564. doi:10.1016/S1473-3099(15)00464-8.
- Rees, D. J., Dioli, M., and Kirkendall, L. R. (2003). Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African Hyalomma (Acari: Ixodidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 131–142. doi:10.1016/s1055-7903(02)00374-3.
- Rigaud, E., Jaulhac, B., Garcia-Bonnet, N., Hunfeld, K.-P., Femenia, F., Huet, D., *et al.* (2016). Seroprevalence of seven pathogens transmitted by the *Ixodes ricinus* tick in forestry workers in France. *Clin. Microbiol. Infect.*, 735.e1–735.e9. doi:10.1016/j.cmi.2016.05.014.
- Rizzoli, A., Hauffe, H. C., Tagliapietra, V., Neteler, M., and Rosà, R. (2009). Forest Structure and Roe Deer Abundance Predict Tick-Borne Encephalitis Risk in Italy. *PLoS ONE* 4. doi:10.1371/journal.pone.0004336.
- Rothen, J., Githaka, N., Kanduma, E. G., Olds, C., Pflüger, V., Mwaura, S., *et al.* (2016). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for comprehensive indexing of East African ixodid tick species. *Parasit. Vectors* 9. doi:10.1186/s13071-016-1424-6.



- Schnell, G., Boeuf, A., Westermann, B., Jaulhac, B., Lipsker, D., Carapito, C., *et al.* (2015). Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies infected by *Borrelia* to investigate lyme disease. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 14, 1254–1264. doi:10.1074/mcp.M114.046540.
- Schouls, L. M., Van De Pol, I., Rijpkema, S. G., and Schot, C. S. (1999). Detection and identification of Ehrlichia, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2215–2222.
- Severo, M. S., Stephens, K. D., Kotsyfakis, M., and Pedra, J. H. (2012). *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol.* 7, 719–731. doi:10.2217/fmb.12.45.
- Sonenshine, D. E., and Roe, R. M. (2013). “Ticks, people, and animals,” in *Biology of Ticks Volume 1*, eds. D. E. Sonenshine and R. M. Roe (Oxford University Press), 3–16.
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., and Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *Lancet Lond. Engl.* 379, 461–473.
- Strle, F., and Stanek, G. (2009). “Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis,” in *Lyme borreliosis : biological and clinical aspects* (Karger), 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. doi:10.1128/AEM.00609-17.
- Szekeres, S., Coipan, E. C., Rigó, K., Majoros, G., Jahfari, S., Sprong, H., *et al.* (2015). Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. *Parasit. Vectors* 8, 309. doi:10.1186/s13071-015-0922-2.
- Tälleklint, L., and Jaenson, T. G. T. (1998). Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (acari: ixodidae) in central and northern sweden. *J. Med. Entomol.* 35, 521–526. doi:10.1093/jmedent/35.4.521.
- Tijssse-Klasen, E., Koopmans, M. P. G., and Sprong, H. (2014). Tick-borne pathogen – reversed and conventional discovery of disease. *Front. Public Health* 2. doi:10.3389/fpubh.2014.00073.
- Vial, L., Stachurski, F., Leblond, A., Huber, K., Vourc’h, G., René-Martellet, M., *et al.* (2016). Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks Tick-Borne Dis.* doi:10.1016/j.ttbdis.2016.08.002.
- Vogelgesang, J. R., Walter, M., Kahl, O., Rubel, F., and Brugger, K. (2020). Long-term monitoring of the seasonal density of questing ixodid ticks in Vienna (Austria): setup and first results. *Exp. Appl. Acarol.* 81, 409–420. doi:10.1007/s10493-020-00511-4.
- Wagemakers, A., Staarink, P. J., Sprong, H., and Hovius, J. W. R. (2015). *Borrelia miyamotoi* : a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 31, 260–269. doi:10.1016/j.pt.2015.03.008.
- Welker, M., and Moore, E. R. B. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 2–11. doi:10.1016/j.syapm.2010.11.013.
- Wennerås, C. (2015). Infections with the tick-borne bacterium *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis. *Clin.*

*Microbiol. Infect.* 21, 621–630. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.030.

- Xu, B., Liu, L., Huang, X., Ma, H., Zhang, Y., Du, Y., *et al.* (2011). Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. *PLoS Pathog.* 7, e1002369. doi:10.1371/journal.ppat.1002369.
- Xu, G., Fang, Q. Q., Keirans, J. E., and Durden, L. A. (2003). Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J. Parasitol.* 89, 452–457. doi:10.1645/0022-3395(2003)089[0452:MPAITT]2.0.CO;2.
- Yssouf, A., Flaudrops, C., Drali, R., Kernif, T., Socolovschi, C., Berenger, J.-M., *et al.* (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J. Clin. Microbiol.* 51, 522–528. doi:10.1128/JCM.02665-12.
- Yssouf, A., Almeras, L., Berenger, J.-M., Laroche, M., Raoult, D., and Parola, P. (2015a). Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. *Ticks Tick-Borne Dis.* 6, 579–586. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.04.013.
- Yssouf, A., Almeras, L., Terras, J., Socolovschi, C., Raoult, D., and Parola, P. (2015b). Detection of *Rickettsia* spp in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003473. doi:10.1371/journal.pntd.0003473.
- Yssouf, A., Almeras, L., Raoult, D., and Parola, P. (2016). Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol.* 11, 549–566. doi:10.2217/fmb.16.5.
- Zahler, M., Gothe, R., and Rinder, H. (1995). Diagnostic DNA amplification from individual tick eggs, larvae and nymphs. *Exp. Appl. Acarol.* 19, 731–736. doi:10.1007/BF00052084.



**LES MALADIES TRANSMISES PAR LES TIQUES : PATHOGÈNES ÉMERGENTS ET OUTILS  
INNOVANTS APPLIQUÉS À L'ÉPIDÉMIOLOGIE VECTORIELLE ET HUMAINE.**

**Résumé :**

Les tiques représentent les premiers vecteurs d'agents infectieux pour la médecine vétérinaire et humaine dans le monde. De nombreux microorganismes peuvent être détectés dans les tiques. Cependant, seules certaines tiques peuvent être vectrices de microorganismes et seuls certains microorganismes peuvent être transmis par les tiques et présenter un risque pour l'homme. Ce travail de thèse s'articule autour de trois axes concernant les tiques et les maladies vectorielles à tiques. Le premier axe s'intéresse au développement de la technologie MALDI-TOF pour l'identification des tiques vectrices de microorganismes. Le deuxième axe étudie deux agents infectieux émergents transmis par les tiques : *Borrelia miyamotoi* et *Neoehrlichia mikurensis* décrits comme responsables de fièvres après piqûre de tique. Enfin, le troisième axe est un travail préliminaire de mise au point d'une technique diagnostique par protéomique des fièvres après piqûre de tique (collab. LSMBO Pr L. Sabatier).

**Mots clé :** Tique, *Ixodes*, Maladies vectorielles à tiques, syndromes fébriles après piqûre de tique, MALDI-TOF, Protéomique, Stratégie innovante, *Borrelia miyamotoi*, *Neoehrlichia mikurensis*

**Abstract :**

Ticks are the primary vectors of microorganisms for veterinary and human medicine in the world. Many microorganisms can be detected in ticks. However, only a few ticks can be considered as vectors and only some microorganisms may be transmitted by ticks and present a risk to humans. Three axes concerning ticks and tick-borne diseases are developed in this PhD work. The first axis focuses on the development of the MALDI-TOF technology for tick vectors' identification. The second axis investigate two emerging tick borne pathogens *Borrelia miyamotoi* and *Neoehrlichia mikurensis*, responsible for post-tick bite fevers. Finally, the third axis is a preliminary work on the development of a proteomic-based diagnostic technique of post-tick bite fevers (collaborator LSMBO Pr L. Sabatier).

**Keywords :** Ticks, *Ixodes*, Tick-borne diseases, post-tick bite fever, MALDI-TOF, proteomic, innovative strategy, *Borrelia miyamotoi*, *Neoehrlichia mikurensis*