

Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 09 octobre 2023

Par

BISSERIER Emilien

Né le 25 février 1997 à Saint-Junien (87)

MALADIES VECTORIELLES A TIQUES EN LIMOUSIN

Thèse dirigée par Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ

Examineurs :

Me. Pr. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Université de Limoges, présidente

Mr. Pr. Benoît JAULHAC, PU-PH, Université de Strasbourg, Juge

Mr. Dr. Aurélien MERCIER, MCU, Université de Limoges, Juge

Mr. Pr. Sébastien HANTZ, PU-PH, Université de Limoges, Directeur



Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 9 octobre 2023

Par

BISSERIER Emilien

Né le 25 février 1997 à Saint-Junien (87)

MALADIES VECTORIELLES A TIQUES EN LIMOUSIN

Thèse dirigée par Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ

Examineurs :

Me. Pr. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Université de Limoges, présidente

Mr. Pr. Benoît JAULHAC, PU-PH, Université de Strasbourg, Juge

Mr. Dr. Aurélien MERCIER, MCU, Université de Limoges, Juge

Mr. Pr. Sébastien HANTZ, PU-PH, Université de Limoges, Directeur



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} septembre 2022

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*) Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. JOST JérémY Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*) Chimie analytique et bromatologie

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme DELEBASSÉE Sylvie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Elise (*) Pharmacologie

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland Pharmacologie

M. LÉGER David Biochimie et biologie moléculaire

Mme MARRE-FOURNIER Françoise Biochimie et biologie moléculaire

M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l’Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Assistant Hospitalo-Universitaire

Mme MARCELLAUD Elodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d’Enseignement et de Recherche

M. DELMON Cédric	Pharmacognosie, botanique et mycologie
Mme KENE MALAHA Angéladine	Épidémiologie, statistique, santé publique

Enseignants d’anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Aux membres de ce jury,

À Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, vous me faites l'honneur de juger mon travail et de présider ce jury. Vous avez été présente tout au long de mes études supérieures et vous m'avez transmis la passion de la microbiologie ayant grandement contribué à mon choix de carrière. Je vous remercie pour vos enseignements sur les bancs de la faculté, votre engagement et votre bienveillance. Je vous remercie également pour vos connaissances transmises par la suite au cours de mon internat. Veuillez recevoir l'expression de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Benoît JAULHAC, je vous remercie de me faire l'honneur d'être membre de ce jury. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre déplacement en avril avec Laurence pour nous transmettre vos connaissances sur le terrain. Merci pour votre enthousiasme à la participation de cette thèse et ce déjeuner typiquement limousin partagé à Saint-Pardoux. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Aurélien MERCIER, merci d'avoir accepté d'être membre de ce jury, et de juger ce travail. Je vous remercie d'apporter votre expérience et votre œil critique sur ce projet. Merci d'avance pour vos retours sur ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ, directeur de ce travail de thèse, quel chemin parcouru depuis le moment où vous m'avez présenté ce sujet. Un sujet qui sort de l'ordinaire et qui m'a tout de suite plu. Sur les chemins du Limousin, à faire du « off-road », à draguer des tiques à la pince à épiler (nos genoux et nos dos s'en souviennent encore) ou tard le soir au laboratoire, je vous remercie pour votre disponibilité, votre bienveillance et votre bonne humeur. Merci pour cet encadrement et votre enthousiasme. Merci pour ces longues conversations sur des sujets multiples et variés entre deux validations. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude et de mon profond respect.

À toutes les personnes ayant participé au projet,

À Gerhard Dobler, merci pour votre aide concernant ce projet. Je vous remercie d'avoir accepté de partager généreusement un témoin positif TBEV. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Au CNR Arbovirus de Marseille, et notamment à Guillaume Durand, merci pour votre aide concernant ce projet. Je vous remercie pour votre temps et vos analyses ayant permis d'avancer sur ce travail. Croyez en mes plus sincères remerciements.

À Laurence Zilliox, merci énormément pour ton aide, ta disponibilité incroyable et ta patience. Tu as su répondre à toutes mes questions et m'aider à distance dans l'entreprise de ce travail. Trouve à travers ces mots, l'expression de toute ma reconnaissance et mes remerciements.

À tous mes dragueurs de tiques en herbe, Aurélie, Alix, Marie-Fleur, Fabien, Chloé, Marie, Annabelle, Hélène, Charline, Aurore, Myriam, Mickael, Elodie, Marion, Sandra, Sandrine, Valérie, Anita, Lucas, Sophie, Delphine, Tibo, Etienne et ceux que j'oublie certainement, merci infiniment de vous être portés volontaires pour la capture de tiques en tous genres. Je suis malgré moi devenu « *mister tique* » et j'espère avoir fait honneur à votre participation à travers ce travail. Veuillez accepter mes sincères remerciements (et non, je prends plus de tiques... pour le moment 😊).

Aux services de Bactériologie-Virologie-Hygiène et Parasitologie-Mycologie, un peu comme une deuxième maison tellement j'y ai passé du temps depuis ces deux dernières années. Merci infiniment à tous les biologistes (**Sophie, Sébastien, Sylvain, Sylvie, Marie-Cécile, Marine, Aurélie, Christian, Nadia, Olivier, Fabien, Marie-Fleur, Hélène, Elodie, Nathalie**) pour m'avoir transmis vos connaissances. Un grand merci également à toute les équipes techniques, la parasito/myco (**Annabelle, Hélène, Valérie, les Micks, Vicky**) d'ailleurs Mick ça y est j'ai réussi à les dézinguer ces foutues tiques, la séro (**Aurore, Marion, Jess, Pauline et Zara**) qui m'ont vu pleurer du sang sur ce Shrek infernal (aussi c'est quoi cet automate qui ne sait rien faire de ses dix cônes), la biomol (**Guillaume, Damien, Mathieu, Charlène, Delphine, Vi, Véro, Soraïa, Clément** ...) désolé pour avoir bouché l'Easymag avec ma purée de tiques. A toute l'équipe de bactério (**Emilie, Emilie, Emilie, Delphine, Aurélie, Karine, Marie, Gaëlle, Morgane, Myriam, Samuel, Amélie, Marion, Mélanie, Sophie, Chloé**...) merci pour ces heures de paillasse et votre bonne humeur, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

À mes co-internes, tous semestre confondu, **Nico** le plasmio, **Uiui** (tu te reconnaitras), **MMA** (j'espère que bibou va bien), **Fifounette, StarMAX², Sarirah** (très beau virage), **Léa la fan de génét, Maïna, Lucie** (une grande modo ahah), **Intissar, Antoine, Le Marv'** (Marwal ?), **Alice** le reine des chats (je crois que tu as littéralement sauvé ma thèse, merci infiniment !), **Vicos le tacos, Léo, Walid, Damien Thomas** (ou Thomas d'Amiens), le **Tibz** (je n'oublie pas BioOccitanie), **Camouille** (tu vas trop loin...), **Lucas** de la Vega (le futur géniteur du Limousin), **Nisrin** (je ne t'ai jamais vu dire non à un bout de gâteau), à **Arnus** (même si on a jamais été co-interne, sache que c'est toujours un plaisir de partager des moments avec toi), **Tomiche la Merguez** (là c'est chaud quand même), **Inès le Z** (la survivante des épidémies et des séismes), **Sarah D** (aka la pro ballerines), **Francky la bonne patoune** (tu aurais été mieux dans l'A1 jaune pipi et dans son jus comme Rennes Rouen), **Gus** (Désiré, tu veux pas faire

un inter-chu à Toulouse ?). Et à tous les autres internes et jeunes chefs avec qui je n'ai pas eu la chance de partager un semestre (**Cassandra, Séléno, Maxime** le Pmiste, **Benjamin, Adrien, Alex** de Nice et les **petits nouveaux** de cette année) Merci à tous pour ces supers moments passés dans et en dehors du labo, cette période va certainement me manquer.

Une spéciale dédicace à **MSC Croisière** et **Alix pré-fermé**, on ne se connaissait pas avant de passer le concours, mais la préparation d'un concours, ça rapproche, et nous voilà dans la même spé 3 ans plus tard, à faire les anciens après avoir fait notre 1^{er} semestre de BVH ensemble. **Marie-Sarah** merci pour ton enthousiasme à toute épreuve, ta bonne humeur bien dans son jus. Bravo pour cette belle progression au baby mais par pitié, arrête de vouloir démarrer la tronçonneuse à chaque tir... **Alix**, on a fait quasiment toute notre infectio ensemble, mais tu as préféré les champignons et les parasites, c'est vrai que c'est plus visuel, et je trouve que cela te correspond bien, toi la grande amatrice de bébêtes en tous genre, au point de même les manger (les bons sushis). A notre victoire ECRASANTE au premier grand tournoi amicale de baby de l'internat 😊.

À ma famille,

Maman, papa, quelle aventure n'est-ce pas ? Déjà 8 ans que je suis rentré dans ces études et pourtant tout est passé si vite. Il est loin le temps où je vous lisais mes cours de PACES pendant le repas.

Maman, merci infiniment pour ton amour et tes bons petits plats, je me souviens encore de tous ces dimanches soir à rentrer à Limoges avec de quoi manger comme à la maison pour toute la semaine. Merci pour ton soutien, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours poussé vers l'avant.

Papa, mon MacGyver, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, le soucis du détail lors des différents déménagements me fera toujours rire, je crois que je ne deviendrai jamais aussi manuel que toi, même avec du beurre et du pain je ne suis pas sûr de réussir à faire un sandwich. Merci pour ton soutien et pour ne jamais avoir douté de mes capacités.

Je ne vous remercierai jamais assez pour votre patience, votre amour et votre soutien. Merci d'avoir été présents dans les bons comme dans les mauvais moments, je me souviens les dimanches de veille de partiels à vous voir débarquer avec tous ce qu'il fallait pour me remonter le moral. Si je suis devenu la personne que je suis aujourd'hui, c'est grâce à vous. Je vous aime.

A mon frère, **Aurélien**, nos chemins se sont séparés tôt quand tu as décidé de t'expatrier à Niort mais mon amour pour toi est resté le même. Je me souviens de ces moments quand on était petit, le campement de la pierre qui roule, des deux sapins, de l'eau qui coule, des longues soirées sous la couette pour jouer à la DS ou à GW sur la table à repasser... Merci pour ces vacances à Limoges dans votre premier appart avec Miléna, merci d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir sorti la tête des études avec des soirées cinés et des soirées bouffes. Merci pour ta patience et ton soutien tout au long de ces études, à mon tour de te soutenir dans ta nouvelle aventure à venir, et j'oublie...à bientôt sur Satisfactory ? 😊

Miléna, tu fais partie de la famille depuis bien longtemps maintenant ! Merci infiniment pour ta gentillesse et ton soutien, merci pour tous ces bons moments passés et à venir ! Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle entreprise !

A toute ma famille côté **Nélia** et **Bisserier**, à tous mes oncles, tantes, cousins, cousines qui m'ont encouragé et qui ont cru en moi, merci infiniment pour votre soutien, chaque réunion de famille a été une bouffée d'oxygène.

À mes amis,

Matthew (presque aussi fast qu'Hamilton), **Antoine** (mamour !!), **Youri** (Yourick le golem du goulag), **Jérémy** (le petit œuf de caille), **Victor** (la force tranquille), **Romain** (le savoureux butineur), **Baptiste** (Bapeutisse). Merci infiniment pour votre bonne humeur, votre générosité et nos longues soirées passées ensemble. Des souvenirs pleins la tête autour d'une petite bière du vendredi, à l'Antre Jeux, sur discord, ou encore à Montpellier. Je ne suis pas très doué pour garder le contact mais malgré ça, à chaque fois qu'on se voit c'est comme si l'on s'était quitté la veille ! Ne changez rien et à très vite ! Petite dédicace à **Ghis** le surfeur fou, peut être que bientôt on se retrouvera dans les Landes autour d'un banger de burgew pour surfer la Nord d'Hossegor, bon d'abord j'essaierai de me lever sur une planche en mousse.

A la team internat de Limoges qui a maintenant envahi la France, **Anna**, **Igor**, **Lucie**, **Romain**, **Pauline**, merci pour ces belles années sur les bancs de la fac. Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé un bout de chemin durant toutes ces années, je ne vous oublie pas.

A mes trekker favoris, **Charles**, **Albé** et bientôt **Charlène**, merci de m'avoir attendu en septembre (même si Alexa a répété tous le week-end qu'il faisait beau), j'espère qu'on va pouvoir partir la prochaine fois, sous une belle nuit étoilée à manger des tagliatelles au saumon à 2000 mètres d'altitude. Merci pour votre générosité, votre entrain et vos idées géniales.

Enfin, à toi ma **Manouze**, ma pile électrique tout droit venu de Carcassonne dopée au soleil, aux vignes et au sable de Gruissan. Merci de me soutenir et de partager ma vie. A tous nos voyages, et ceux à venir (promis on va le survoler l'Atlantique). A nos heures sur la route le vendredi soir direction Carcass à toute vitesse dans la cacahuète avec sa courroie toute neuve, finalement 3h30 de voiture c'est devenu la porte à côté. Merci pour ton énergie débordante et ton enthousiasme contagieux à l'idée de manger du fromage/manger dans un restau/manger une *pizza quattro formaggi*/manger des huitres, manger finalement. Ta capacité à t'intéresser à l'autre, ta curiosité sur absolument n'importe quel sujet m'inspirent chaque jour. Tu es pétillante, et tu as cette capacité de toujours m'enrôler dans des activités diverses et variées (ski, surf, la praluline). Je serai toujours là pour te rappeler ou tu as mis tes clé, ton chargeur, tes chaussures et ta tête. Nul doute que notre avenir sera entre mer et montagne, quelque part au soleil.

Merci également à **Thierry**, **Marie-Françoise**, **Mamy Fanfan**, **Quentin** et à toute ta famille pour leur soutien et leur bienveillance. C'est toujours un plaisir pour moi de descendre dans l'Aude.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Tables des illustrations	13
Table des tableaux	15
Liste des abréviations	16
Introduction	18
I. Étude bibliographique	19
I.1. Le virus de l'encéphalite à tiques	19
I.1.1. Caractères généraux	19
I.1.1.1. Taxonomie.....	19
I.1.1.2. Historique	20
I.1.2. Épidémiologie	21
I.1.3. Structure et organisation génomique.....	23
I.1.4. Cycle viral	27
I.1.5. Cycle de transmission	28
I.1.6. Pathogénicité	30
I.1.6.1. Physiopathologie	30
I.1.6.2. Signes cliniques	31
I.1.7. Outils diagnostics	33
I.1.8. Prise en charge et mesures préventives	36
I.1.8.1. Traitement	36
I.1.8.2. Prévention	37
I.2. La tique, vecteur principal	39
I.2.1. Caractères généraux	39
I.2.2. Description morphologique.....	40
I.2.2.1. Anatomie externe	40
I.2.2.1.1. Les adultes.....	40
I.2.2.1.2. Les nymphes.....	42
I.2.2.1.3. Les larves.....	42
I.2.2.2. Anatomie interne	42
I.2.2.2.1. Le système tégumentaire.....	42
I.2.2.2.2. Le système respiratoire.....	43
I.2.2.2.3. Le système circulatoire	43
I.2.2.2.4. Le système nerveux.....	43
I.2.2.2.5. Les glandes salivaires.....	44
I.2.2.2.6. Le système digestif	44
I.2.2.2.7. Le système génital	45
I.2.3. Cycle de développement	46
I.2.3.1. Place dans l'environnement	46
I.2.3.2. Le cycle	48
I.2.4. Importance médicale et vétérinaire	50
I.2.4.1. Arachnide hématophage	50
I.2.4.2. Transmission d'agents infectieux	52
I.2.4.2.1. Bactéries	52
I.2.4.2.2. Virus.....	54
I.2.4.2.3. Parasites	55

II. Objectifs et déroulé de l'étude expérimentale	56
III. Matériels et Méthodes	57
I. Dépistage sérologique TBEV.....	57
I.1. Échantillons de l'étude.....	57
I.2. Tests sérologiques	57
I.2.1. Trousse de dépistage.....	57
I.2.2. Test de confirmation des échantillons positifs.....	58
I.3. Facteurs de risques	58
II. Prévalence du TBEV et de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato dans le vecteur	59
II.1. Échantillonnage des tiques.....	59
II.1.1. Récolte sur sites ciblés.....	59
II.1.2. Collecte sur la base du volontariat	60
II.2. Extraction d'acides nucléiques totaux	61
II.3. Amplification de l'ARN16S ribosomal d' <i>Ixodes ricinus</i>	62
II.4. Amplification du TBEV	62
II.5. Amplification de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	63
II.6. Analyses statistiques	64
II.6.1. Tests sérologiques	64
II.6.2. Biologie moléculaire	65
IV. Résultats	66
I. Dépistage sérologique TBEV.....	66
I.1. Données sérologiques des patients inclus	66
I.2. Données sérologiques des cas positifs et équivoques.....	66
I.3. Données épidémiologiques des cas positifs et équivoques	67
II. Dépistage moléculaire du TBEV et de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	69
II.1. Description de la population de tiques récoltées	69
II.2. Validation de l'extraction d'ADN et d'ARN totaux	70
II.3. Amplification de l'ARN16S ribosomal d' <i>Ixodes ricinus</i>	71
II.4. Amplification du TBEV	72
II.5. Amplification de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	73
V. Discussion	77
VI. Conclusion et perspectives	80
Références bibliographiques	81
Annexes	89
Serment De Galien	101

Tables des illustrations

Figure 1 : Classification des virus de l'encéphalite à tiques (Selon Ecker et al. 1999)	19
Figure 2 : Distribution des différents sous-types du TBEV (blanc : Européen, rouge : Sibérien, gris : Asiatique) (20).....	21
Figure 3 : Carte de la distribution d' <i>Ixodes ricinus</i> en Europe (gauche) associée à la carte du taux de notification du TBEV (droite) (30).....	22
Figure 4 : Distribution des cas confirmés d'encéphalites à tique par mois (A) et distribution cumulée 2016-2020 des cas confirmés (B) (22)	22
Figure 5 : Lieu probable d'infection par le TBE des cas autochtones déclarés en France entre mai 2021 et mai 2023 (n=61) (28).....	23
Figure 6 : Virions de l'encéphalite à tiques matures (flèche blanche) et immatures (flèche noire) observés en cryo-microscopie électronique (33)	24
Figure 7 : Organisation génomique du virus de l'encéphalite à tiques (44)	24
Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'un virion immature (gauche) et mature (droite) d'un Flavivirus (32)	25
Figure 9 : Structure et organisation de la protéine E (haut) et de l'hétérotétramère (bas) avec deux protéines M (orange) (33).....	26
Figure 10 : Représentation schématique du cycle viral du TBEV(44).....	27
Figure 11 : Cycle de transmission du TBEV(47)	28
Figure 12 : Principes du co-feeding, transmission virémique (haut) bloquée par l'immunité innée de l'hôte et non virémique (bas) insensible à la réponse humorale de l'hôte(55).....	29
Figure 13 : Cinétique de la virémie TBEV et des anticorps anti-TBEV dans le sang (d'après Holzmann, Vaccine 2003)	35
Figure 14 : Schéma d'administration des deux vaccins disponibles en France (traduit de Ruzek et al., 2019).....	38
Figure 15 : Genres de tique les plus communs en France(99)	39
Figure 16 : Différentes stases d' <i>Ixodes ricinus</i> (100)	40
Figure 17 : Rostre de tique <i>Ixodes ricinus</i> , chélicères non visibles (photo du CNR Lyme de Strasbourg).....	41
Figure 18 : Organes externes antérieurs d'une tique <i>Ixodes ricinus</i> (photo du CNR Lyme de Strasbourg).....	42
Figure 19 : Schéma de l'anatomie interne d'une tique femelle prenant un repas sanguin(108)	45
Figure 20 : Carte de score des habitats favorables à la tique <i>Ixodes ricinus</i> en France métropolitaine », produite par l'INRAE, Vetagrosup, et l'ANSES 2022, HSI élevé = habitat adéquat pour la tique(117)	47
Figure 21 : Densité mensuelle moyenne en nymphes <i>Ixodes ricinus</i> en Alsace depuis 2013(119).....	48

Figure 22 : Mue de larve en nymphe(120)	49
Figure 23 : Cycle de vie d' <i>Ixodes ricinus</i> (108)	50
Figure 24 : Schéma d'une piqûre d' <i>Ixodes</i> avec poche de lyse permettant le repas sanguin(106)	51
Figure 25 : Organigramme de la sérologie anti-TBEV	56
Figure 26 : Échantillons inclus dans le protocole VITAL	57
Figure 27 : Points de collecte de tiques du CNR Borrelia en 2005, prélevés à nouveau en 2023	59
Figure 28 : Points de récolte de tiques exploités (flèches rouges) et non exploités (flèche bleus) basés sur le volontariat.....	60
Figure 29 : Densité mensuelle moyenne en nymphes <i>Ixodes ricinus</i> en Limousin entre avril et juillet 2023	70
Figure 30 : Distribution des concentrations d'ADN et ARN des extraits ayant subi une ou deux extractions	71
Figure 31 : RT-PCR ARN 16S ribosomal <i>Ixodes ricinus</i> (T+ : courbe rouge ; T- courbe verte)	72
Figure 32 : Courbes d'amplification des extraits (T+ : courbe rouge, T- : courbe verte)	72
Figure 33 : Courbes d'amplification de la PCR <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato sur de l'ADN de <i>B.garinii</i> , <i>B. afzelii</i> et <i>B.burgdorferi</i> sensu lato (pur, 10 ^{ème} , 100 ^{ème}).....	73
Figure 34 : Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification de l'expérience avec une concentration majorée en enzyme	74
Figure 35 : (A) Fragment amplifié avec une quantité d'ADN de 0,5 pg (puits positifs : 3 et 4) ; (B) Fragment amplifié avec une quantité d'ADN de 50 pg (puits positifs : 2,3 et 4).....	74
Figure 36 : Révélation sur gel d'agarose de l'amplification du fragment du gène <i>FlaB</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (extraits positifs en rouge).....	76
Figure 38 : Espèces de <i>Borrelia</i> majoritairement isolées en Limousin en 2006 (Selon le rapport annuel de l'institut Pasteur, 2006).....	79

Table des tableaux

Tableau 1 : Définition clinique et critères de diagnostic de l'encéphalite à tiques en Europe(66)	32
Tableau 2 : Mix de la RT-PCR en temps réel 16S rRNA <i>Ixodes ricinus</i> (pour un essai)	62
Tableau 3 : Mix de la RT-PCR en temps réel TBEV (pour un essai)	63
Tableau 4 : Mix de la PCR en temps réel <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (pour un essai)	64
Tableau 5 : Données sérologiques Lyme/TBEV des patients positifs et équivoques en IgG TBEV	66
Tableau 6 : Données épidémiologiques des patients positifs et équivoques en IgG TBEV...	68
Tableau 7 : Sites retenus pour la recherche du TBEV et de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato et numéro d'extrait associé	69
Tableau 8 : Concentration en ADN et en ARN totaux de chaque extrait (exprimé en ng/uL)	71

Liste des abréviations

OMS : Organisation mondiale de la Santé
OMSA : Organisation mondiale de la Santé Animale
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat
TBEV : *Tick-Borne encephalitis virus*
DGS : Direction Générale de la Santé
HCSP : Haut Conseil de la Santé Publique
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
ICTV : Comité International de Taxonomie des Virus
MBFV : *Mosquito-Borne Flaviviruses*
TBFV : *Tick-Borne Flaviviruses*
NKV : *No Known Flaviviruses*
M-TBFV : *Mammalian Tick-Borne Flaviviruses*
S-TBFV : *Seabird Tick-Borne Flaviviruses*
TBE : *Tick-Borne encephalitis*
TBEV-EU : Sous type Européen du virus de l'encéphalite à tiques
TBEV-FE : Sous type Asiatique du virus de l'encéphalite à tiques
TBEV-SIB : Sous type Sibérien du virus de l'encéphalite à tiques
TBEV-HIM : Sous type Himalayen du virus de l'encéphalite à tiques
TBEV-BKL : Sous type Baïkalien du virus de l'encéphalite à tiques
URSS : Union des républiques socialistes soviétiques
RSSE : *Russian Spring Summer Encephalitis*
ECDC : *European Centre for Disease prevention and Control*
ARN : Acide ribonucléique
UTR : *Untranslated Region*
NS : *Non structural*
RE : Réticulum endoplasmique
pH : Potentiel Hydrogène
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
CCR5 : Récepteur à C-C chimiokine de type 5
LCS : Liquide cérébro-spinal
IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

RT-PCR : *Reverse Transcriptase – Poly Chain Reaction*

ELISA : *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

CO₂ : Dioxyde de carbone

EIA : Enzyme Immuno Assay

IFI : Immunofluorescence Indirecte

TIBOLA : Tick-Borne LymphAdenopathy

ADN : Acide Désoxyribonucléique

FSME : Frühsommer-Meningo-Enzephalitis

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

Introduction

Le début des années 2000 marque la prise de conscience de l'Humanité du lien étroit existant entre la santé humaine, animale, végétale et environnementale. C'est dans ce contexte que naît le concept « d'approche OneHealth » visant à décloisonner les différentes approches sanitaires et à promouvoir une approche pluridisciplinaire et globale des enjeux sanitaires. Ce concept est d'autant plus mis en avant en 2010, lorsque les principaux acteurs, c'est-à-dire l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA) et l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) en font l'objet d'un accord.

Aujourd'hui, au moins 60% des maladies humaines infectieuses ont une origine animale. Cette proportion est étroitement liée à l'activité humaine qui explose depuis la découverte du pétrole en Pennsylvanie aux Etats-Unis en 1859 marquant le passage à l'ère pétrolière moderne, alimentant un cercle vicieux. En effet, la démographie est exponentielle, les villes se développent au prix d'une déforestation massive favorisant le contact entre les animaux sauvages, les animaux d'élevages et l'être humain. L'intensification et la diversification des modes de transports pour répondre à la demande croissante de la population mondiale, permettent dans un second temps de propager ces nouveaux pathogènes, revers de la médaille d'une mondialisation sans limites. Enfin et non des moindres, le changement climatique actuel est le témoin d'une dégradation chronique et vraisemblablement durable de l'environnement. En effet, la hausse de la température globale d'1,2°C à l'échelle globale, mise en avant par le Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC) en 2022, favorise l'adaptation de différents vecteurs à de nouveaux environnements et notamment des arthropodes (moustiques, tiques...) responsables de la transmission d'agents infectieux dans de nouvelles zones géographiques.

En France, des arboviroses habituellement retrouvées dans les régions du Sud comme le West-Nile virus ou encore le virus Usutu ont émergé en Nouvelle-Aquitaine en 2023. L'incidence d'autres arboviroses est également en augmentation du fait de la période d'activité étendue des tiques dû aux conditions climatiques favorables. C'est par exemple le cas du virus de l'encéphalite à tiques (Tick Borne Encephalitis Virus » TBEV), agent étiologique de l'encéphalite à tiques qui, depuis sa découverte dans les années 30 affiche une incidence croissante en Europe touchant également la France avec un premier cas rapporté en Alsace en 1968, puis plus récemment en 2017 en Auvergne-Rhône-Alpes et en 2020, dans le département de l'Ain.

La liste de maladies infectieuses sévissant en France ne cesse de croître, montrant la complexité de mise en place de plans de lutte efficace. Il est alors d'intérêt public de prendre connaissance de ces nouveaux agents pathogènes, permettant de mettre en place une surveillance, de mener des actions de préventions et de recherche dans le but de limiter leur impact. C'est ainsi que la Direction Générale de la Santé (DGS) a saisi le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) en 2019 pour inscrire l'encéphalite à tiques sur la liste des maladies devant faire l'objet d'une déclaration obligatoire à l'autorité sanitaire.

L'objectif de ce travail est double, réaliser une étude de séroprévalence TBEV chez des patients ayant bénéficié d'un dépistage sérologique de la maladie de Lyme dans le cadre du soin entre janvier 2020 et janvier 2023 au CHU de Limoges puis une étude de prévalence du TBEV et de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les tiques, vecteur commun à ces deux agents infectieux en région Limousin.

I. Étude bibliographique

I.1. Le virus de l'encéphalite à tiques

I.1.1. Caractères généraux

I.1.1.1. Taxonomie

Le virus de l'encéphalite à tiques appartient, d'un point de vue taxonomique, au royaume des *Riboviria*, au règne des *Orthornavirae*, au phylum des *Kitrinoviricota*, à la classe des *Flasuviricetes*, à l'ordre des *Amarillovirales*, de la famille des *Flaviviridae*, au genre *Orthoflavivirus* et à l'espèce *encephalitidis* selon le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV).

Cette famille comprend un grand nombre de virus (Annexe 1). Le genre *Orthoflavivirus*, infecte à la fois les vertébrés et les invertébrés, une caractéristique qui n'est pas partagée par les membres du genre *Pestivirus* et *Hepacivirus*(1).

La phylogénétique a permis de classer ce genre en trois groupes : les virus transmis par les moustiques (MBFV : *mosquito-borne flaviviruses*), parmi lesquelles on retrouve *Orthoflavivirus denguei* agent de la Dengue, *Orthoflavivirus japonicum* responsable de l'encéphalite japonaise, *Orthoflavivirus zikaense*, agent du Zika ou encore *Orthoflavivirus flavi* responsable de la fièvre jaune, ceux transmis par les tiques (TBFV : *tick-borne flaviviruses*) et, enfin, le troisième groupe dont le vecteur n'est pas encore connu (NKV : *no known flaviviruses*). Le groupe des TBFV est quant-à-lui scindé en deux sous-groupes : les virus transmis par les tiques de mammifères (M-TBFV : *mammalian tick-borne flaviviruses*) et les virus transmis par les tiques d'oiseaux de mer (S-TBFV : *seabird tick-borne flaviviruses*)(2).

Le groupe des M-TBFV, anciennement « sérocomplexe TBE », contient lui-même plusieurs agents pathogènes comme le virus Powassan, le virus Looping ill, ainsi que le virus de l'encéphalite à tiques. Ce dernier est divisé en 3 sous-types majeurs (Figure 1) : le sous-type Européen (TBEV-EU), Asiatique (TBEV-FE) et Sibérien (TBEV-SIB). La détermination de ces différents sous-types a été réalisée par analyse phylogénétique de la glycoprotéine d'enveloppe E(3). Cette protéine ayant l'avantage de ne pas être sujette aux variations antigéniques majeurs(4). Récemment, deux nouveaux sous-types ont été découverts, le sous-type Baïkalien(5) (TBEV-BKL) isolé autour du lac Baïkal au Nord de la Mongolie et le sous-type Himalayen(6) (TBEV-HIM) isolé chez l'espèce de marmotte *Marmota himalayana* sur le plateau tibétain, dont l'impact clinique reste cependant encore à évaluer.

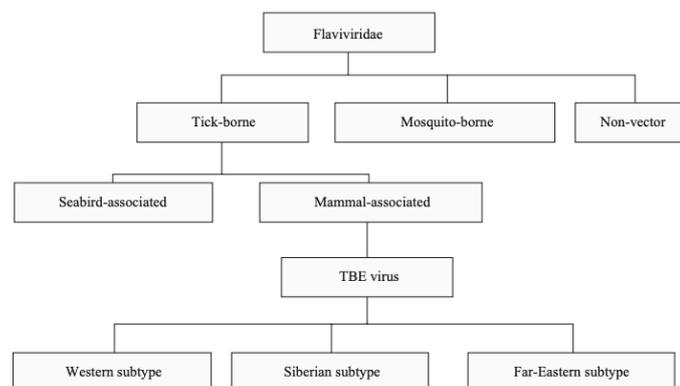


Figure 1 : Classification des virus de l'encéphalite à tiques (Selon Ecker et al. 1999)

I.1.1.2. Historique

Une entité clinique comparable à une infection par le virus de l'encéphalite à tiques a été décrite pour la première fois dans des registres paroissiaux des îles d'Åland en Finlande au 18^{ème} siècle. Mais ce n'est que deux siècles plus tard, en 1931 que la première description médicale fût faite par un physicien Autrichien du nom de Schneider(7). En effet, le scientifique a observé à cette période, chez des individus du district de Neunkirchen, au sud de Vienne, une incidence régulière d'une maladie qu'il nommera « *Epidemische akute Meningitis serosa* » comprendre « méningite épidémique aiguë ». Cependant, l'agent causal et le mode de transmission sont restés, à l'époque, inconnus.

Durant cette même décennie, dans un contexte de tension militaire entre l'URSS et le Japon, s'est propagée une mystérieuse maladie à l'issue régulièrement fatale au sein des troupes armées soviétiques. Les neurologues militaires de l'époque ont observé des épidémies d'encéphalites et ont incriminé l'encéphalite japonaise ou la poliomyélite. Devant l'augmentation du nombre de cas au sein des bataillons, une expédition a été menée sur ordre de Moscou, par le virologue à la tête du premier laboratoire de virologie du pays : Lev Zilber(8). Cette mission s'est déroulée à l'Est du territoire (Annexe 2). Une des patientes, alors examinée, a évoqué des piqûres de tiques deux semaines avant l'apparition de ses symptômes, conduisant Zilber à émettre l'hypothèse que ces arthropodes pouvaient être à l'origine des infections. Dès lors, des tiques du genre *Ixodes persulcatus* ont été récoltées par l'entomologiste du groupe, A. Gutsevich en exposant ces avant-bras dans la Taïga, ces tiques ont ensuite été broyées puis le broyat injecté à des souris. Cette approche a permis l'isolement du virus : une première mondiale, de plus le virus a également été isolé de tiques ayant pris un repas sanguin sur des rongeurs virémiques. Il a ainsi été démontré que la tique était le vecteur de cette maladie inconnue. Après la publication de cette découverte, deux zoologues spécialisés en acarologie ont été dépêchés sur le terrain pour étudier ce vecteur(9) permettant une meilleure compréhension du cycle de la tique *Ixodes persulcatus*, le principal vecteur. Les zoologues ont décrit son habitat naturel en relevant l'hygrométrie la température, le type de sol, la végétation, nécessaire à sa survie. Fort de leur expérience, ils ont contribué à promouvoir les premières actions préventives contre les piqûres de tiques. C'est ainsi que le 15 septembre 1937, l'article scientifique concernant les résultats de cette étude a été publié, au prix de nombreuses infections et décès au sein des membres des différentes expéditions. La maladie a alors porté le nom de Russian Spring Summer Encephalitis (RSSE).

Ces travaux ont également mis en lumière la seule méthode de traitement « spécifique » toujours disponible aujourd'hui : la transfusion de sérum de patient convalescent. Ces scientifiques ont ouvert la voie des vaccins anti-TBEV et ont développé un vaccin inactivé ayant prouvé son efficacité dans certains districts en faisant chuter l'incidence de cette maladie.

Par la suite, ce virus a été isolé pour la première fois en Europe en 1948 en Tchécoslovaquie chez un jeune garçon malade(10) ainsi que dans le vecteur majoritaire européen : *Ixodes ricinus*(11). Le premier cas décrit en France remonte à 1968 chez un garde forestier en Alsace(12). En Asie de l'Est, c'est en Chine que le premier cas a été décrit, en 1943, puis isolé en 1953 dans les tissus cérébraux d'un patient(13) puis au Japon en 1993 avec un cas d'encéphalite sévère chez la femme d'un producteur laitier du pays(14). Plus récemment, le virus a été détecté dans des tiques du genre *Ixodes ricinus* au nord de l'Afrique, en Tunisie en 2021(15). A noter qu'aucun cas autochtone n'a été décrit en Océanie et en Amérique à l'heure actuelle.

I.1.2. Épidémiologie

L'encéphalite à tiques est l'arbovirose affectant le système nerveux central la plus fréquente en Europe et en Asie du Nord-Est. Ce virus est transmis dans la très grande majorité des cas de façon vectorielle par piqûres de tiques dures du genre *Ixodes* avec *I. ricinus* en Europe (TBEV-EU) et *I. persulcatus* en Eurasie et en Asie (TBEV-SIB, TBEV-FE). Il est important de noter que les deux espèces cohabitent dans les pays Baltes, en Finlande et en Biélorussie mais d'autres genres de tiques dures, s'attaquant moins à l'Homme, comme *Haemaphysalis* et *Dermacentor*, également compétentes pour le TBEV, sont décrites dans le maintien de la circulation du virus(16). Plus rarement (environ 1% des cas) la transmission du virus peut survenir par consommation de lait ou fromage cru, particulièrement d'ovins et de caprins(17,18) et dans de rares cas, la transmission peut survenir au cours d'une transplantation d'organe solide(19). Il n'existe pas de données concernant la transmission à partir de produits sanguins labiles, mais l'Établissement Français du Sang préconise une éviction de don en cas de piqûres dans les 28 jours précédant le don. L'incidence du TBEV ne cesse de croître au fil des ans avec une progression multifactorielle et difficile à caractériser.

Étant donné l'incidence majoritairement Eurasienne, peu de données sont disponibles à l'échelle mondiale. Cependant, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 50 millions d'individus vivent en zone d'endémie et le TBEV représente 10 000 à 12 000 cas par an répartis selon le gradient Est-Ouest de Vladivostok (prédominance du sous-type Sibérien) à l'Alsace-Lorraine (prédominance du sous-type Européen) et selon le gradient Nord-Sud de Scandinavie à l'Italie(20) (Figure 2) mais ce nombre est probablement sous-estimé.

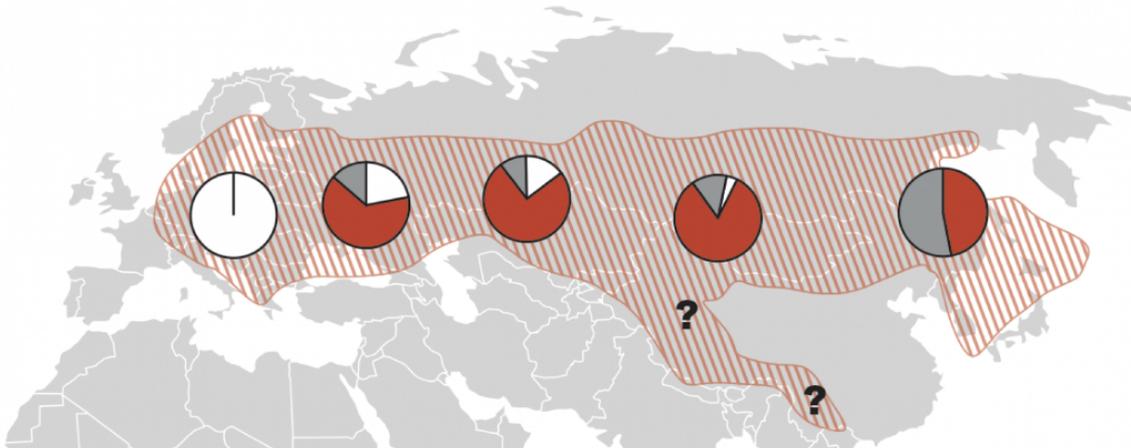


Figure 2 : Distribution des différents sous-types du TBEV (blanc : Européen, rouge : Sibérien, gris : Asiatique) (20)

A l'échelle européenne le TBEV est devenu en 2012 une maladie à déclaration obligatoire et depuis cette date, est sous la surveillance de l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), ce qui a permis de centraliser le recueil des données épidémiologiques à l'échelle de l'Europe concernant ce virus. La situation tout comme la séroprévalence des populations est hétérogène selon les pays et à l'intérieur de ceux-ci, en fonction des politiques vaccinales et des activités humaines. En Europe la séroprévalence varie de 1 à 30% selon les pays(21) et en 2020 en Europe, l'ECDC rapporte 3 734 cas d'encéphalite à tiques(22) dont 16 décès incriminant le TBEV (létalité : 0,5%) répartis sur 24 pays. Le taux de notification est de 0,9 cas pour 100 000 habitants, en augmentation par

rapport à 2018 et 2019, avec 0,6 et 0,7 respectivement. Les répartitions géographiques du virus de l'encéphalite à tiques sont superposables à la répartition sur les territoires de ces différents vecteurs (figure 3) ainsi qu'à leur période d'activité.

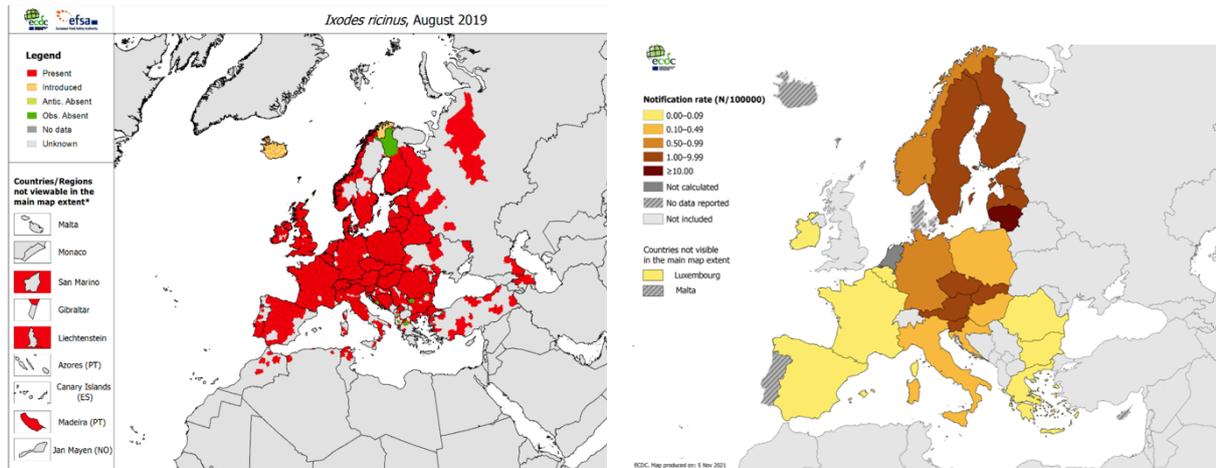


Figure 3 : Carte de la distribution d'*Ixodes ricinus* en Europe (gauche) associée à la carte du taux de notification du TBEV (droite) (30)

En effet, en Europe, l'activité des tiques débute au printemps quand la température avoisine les 6°C et se termine autour du mois de novembre aux premières gelées. Cette activité est intrinsèquement liée aux deux pics de déclaration de cas d'encéphalites à tiques (Figure 4A), en effet les tiques possèdent une activité bimodale durant l'été dans les pays tempérés, avec un pic d'activité au début de la saison et un à la fin. Il est intéressant de noter que ces pics de déclaration sont en décalage par rapport aux pics d'activité du vecteur, cet intervalle de temps, d'environ deux à quatre semaines correspond à la durée d'incubation de la maladie (Figure 4B). Selon l'ECDC, cette pathologie touche préférentiellement les hommes, notamment ceux dont l'âge est compris entre 45 et 64 ans, probablement dû aux profils de travailleurs en extérieur majoritairement masculin et aux loisirs exposant davantage aux piqûres de tiques (chasse, pêche, cueillette...). Cette observation s'inscrit dans la tendance mise en évidence dans les pays scandinave(23), en effet les femmes semblent être mieux éduquées concernant les risques encourus après une piqûre, et sont plus à même de se prémunir de ces piqûres lors d'activité exposant fortement au vecteur.

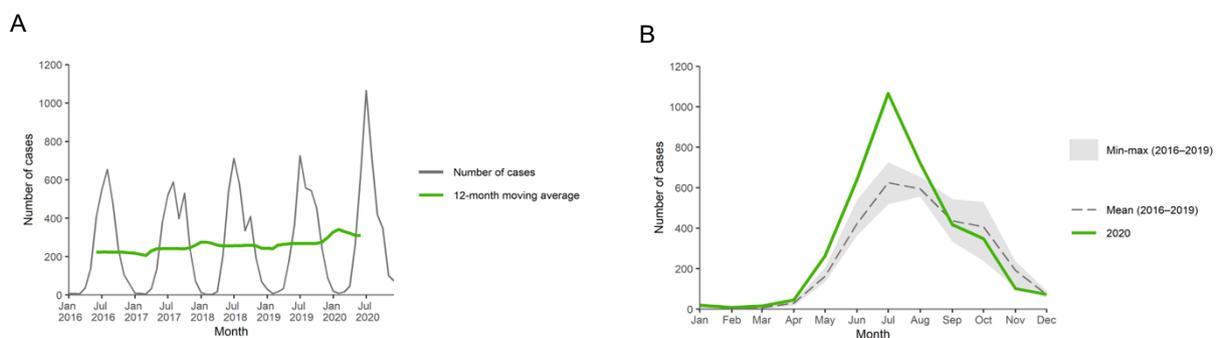


Figure 4 : Distribution des cas confirmés d'encéphalites à tique par mois (A) et distribution cumulée 2016-2020 des cas confirmés (B) (22)

En France métropolitaine, la majorité des cas provient de la région Alsace avec entre 1968 et 2006, 64 cas diagnostiqués dans cette région(12). Quelques cas autochtones ont été décrit dans d'autres régions : un cas en région Bordelaise en 2007(24), puis d'autres en Auvergne-Rhône-Alpes en 2017(25) et dans l'Ain en 2020(26) avec une séroprévalence dans la population générale estimée à 5.89%(27). Le cas décrit en région Nouvelle-Aquitaine est cependant à discuter car depuis cette date, aucun autre cas autochtone dans la région n'a été recensé. Par ailleurs, Santé Publique France a publié le 07 juillet 2023 son premier bilan des cas recensés par la déclaration obligatoire entre mai 2021 et mai 2023(28). On y apprend, entre autres, que les infections acquises sur le territoire dépassent les infections acquises lors de voyage en zone d'endémie. Concernant les chiffres clés, 71 cas ont été notifiés dont 86% de cas « autochtones », avec un pourcentage d'hospitalisation de 94%. 15% d'entre eux exerçaient un emploi les exposants particulièrement aux piqûres de tiques (éleveur, forestier...). Le département de la Haute-Savoie est le plus touché, classant ainsi la région Auvergne-Rhône Alpes comme une zone majeure de circulation du virus devant la région Grand-Est (figure 5). Il est intéressant de notifier l'expansion d'Est en Ouest des nouvelles zones à risques identifiées et l'absence de description du virus en Limousin à ce jour.



Figure 5 : Lieu probable d'infection par le TBE des cas autochtones déclarés en France entre mai 2021 et mai 2023 (n=61) (28)

I.1.3. Structure et organisation génomique

Le virus de l'encéphalite à tiques est considéré comme le plus ancien des Flavivirus. En effet le dernier ancêtre commun avec les autres Flavivirus aurait divergé il y a plus de 9600 ans(29). Cependant comme les autres Flavivirus, le virion mesure environ 50 nanomètres et se retrouve au sein de l'hôte sous deux formes. Une première dite immature, spiculée et non infectieuse et une seconde, mature, lisse et infectieuse (Figure 6).

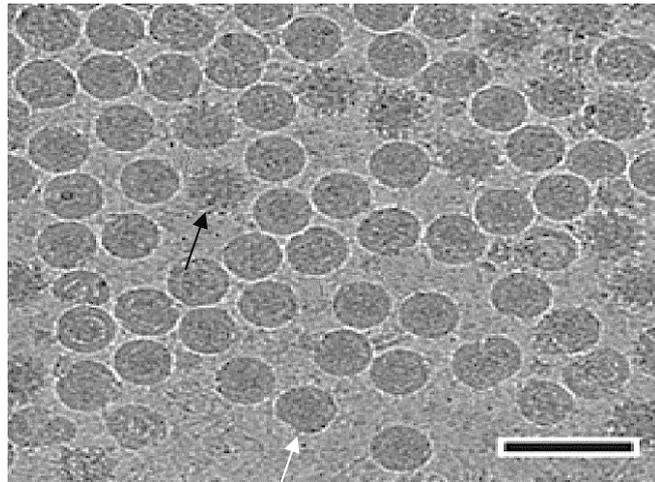


Figure 6 : Virions de l'encéphalite à tiques matures (flèche blanche) et immatures (flèche noire) observés en cryo-microscopie électronique (33)

Le virion possède un génome composé d'un ARN simple brin de polarité positive contenu dans une capsidie icosaédrique, elle-même enveloppée d'une membrane lipidique. Le génome viral d'environ 10 800 paires de base est constitué d'un unique cadre de lecture flanqué de deux régions non codantes (UTR : *untranslated region*) : une en 5' de longueur fixe, très conservée au sein des différentes souches et une en 3' de longueur variable(30). Le génome code une unique polyprotéine (Figure 7) de 3414 acides aminés, clivée de manière co-traductionnelle et post-traductionnelle(31) par des protéases virales et cellulaires en trois protéines structurales (C, prM et E) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Malgré un génome à ARN, le TBEV mute très peu avec pour le sous-type Européen un score de $1,3 \times 10^{-5}$ mutations par sites par an soit une substitution par cadre de lecture tous les 7,5 ans. Certaines hypothèses semblent indiquer que ce faible taux est dû aux effets contraignants du système à deux hôtes (invertébrés et vertébrés) et à la longue espérance de vie des tiques. En effet la longue durée de vie d'une tique permet d'avoir un titre en virion plus élevé et un cycle de vie plus long que chez le moustique par exemple, entraînant moindre pression de sélection(29).

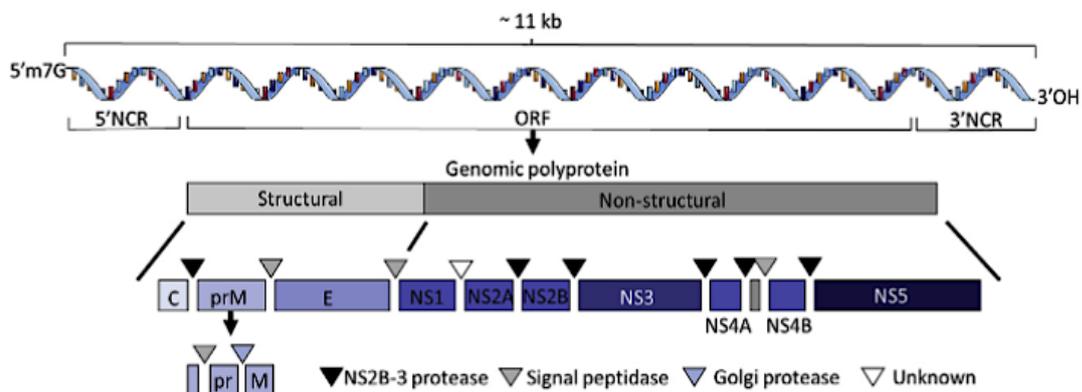


Figure 7 : Organisation génomique du virus de l'encéphalite à tiques (44)

L'organisation structurale est complexe, le virion sous sa forme inactive est peu étudié mais semble se comporter comme les autres Flavivirus(32). La particule virale non infectieuse est recouverte de trimères d'hétérodimères de protéines prM-E, se présentant alors sous une forme « spiculée » contrastant avec la forme mature (Figure 8). Le précurseur de la protéine M (prM) est indispensable à ce stade, en effet cette protéine recouvre et masque les boucles de fusion des protéines E et empêche ainsi la fusion prématurée et irréversible du virus avec les membranes intracellulaires(33). A contrario, la particule virale infectieuse est caractérisée par une forme « lisse », le clivage de la protéine prM entraîne une libération des protéines E qui se regroupent sous forme d'homodimère et s'ancrent de manière « tête-bêche » à deux protéines M pour former un hétérotétramère en surface du virion, caractéristique des enveloppes des flavivirus.

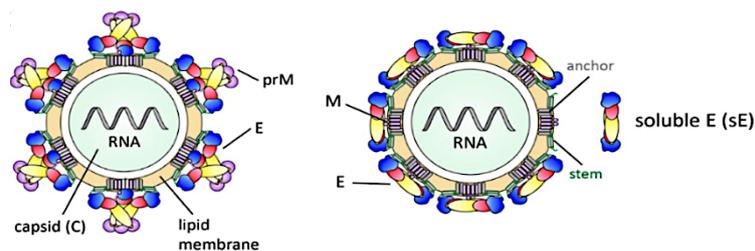


Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'un virion immature (gauche) et mature (droite) d'un Flavivirus (32)

La protéine E d'une longueur de 496 acides aminés est le principal composant de la particule virale (Figure 9), en effet on en retrouve 180 copies par virion. Elle joue un rôle essentiel dans l'entrée du virus dans les cellules de l'hôte en se fixant aux récepteurs cellulaires des endosomes. L'importance de cette protéine est d'autant plus marquée du fait de la grande homogénéité de séquence au sein d'un même sous-type mais surtout entre les différents sous-types avec une variabilité maximale en acides aminés observée de 5,6%(3). Cette protéine est également une cible privilégiée de la réponse immunitaire humorale.

Structurellement elle est composée de 4 sous-unités. Ses 3 domaines N-terminal ont une structure secondaire majoritairement composée de feuillets β et forment ainsi un ectodomaine recouvrant la surface du virion. Dans une conformation tridimensionnelle, le domaine I présentant un tonneau- β , se retrouve en position centrale entre les domaines II et III et possède le seul site de glycosylation du TBEV, l'asparagine en position 154 (Asn154). Cette glycosylation joue deux rôles majeurs : dans un premier temps elle augmente la sécrétion virale avec une élévation pouvant aller jusqu'à 4 fois la normale, et dans un deuxième temps, semble aussi être impliquée dans le pouvoir neuro-invasif du virus(34). Le domaine II, composé de 2 feuillets β connectés par des boucles et 2 hélices α , est le site de dimérisation. Il porte également une boucle de fusion hautement conservée sur la pointe de l'ectodomaine. Cette boucle est essentielle pour l'entrée du virus et la fusion de celui-ci avec les endosomes permettant le transport des particules virale jusqu'au cytoplasme. La fonction du domaine III reste incomprise mais il possède une forte affinité avec les immunoglobulines de l'hôte et est la cible privilégiée pendant la réponse humorale. Ce domaine semble également jouer un rôle dans le changement conformationnel de la protéine E pH-induit car cette activité semble être bloquée par des anticorps neutralisants ciblant le domaine III(35). Enfin le domaine IV se compose de 5 hélices α , 3 périmembranaires et 2 transmembranaires et agit comme point d'ancrage dans la bicouche lipidique de la protéine E.

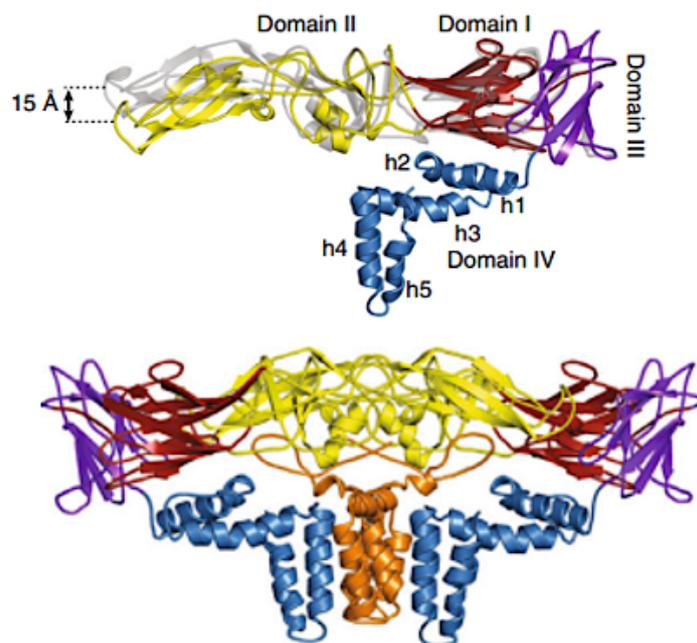


Figure 9 : Structure et organisation de la protéine E (haut) et de l'hétérotétramère (bas) avec deux protéines M (orange) (33)

La protéine M (Figure 9) est une protéine plus petite, de seulement 75 acides aminés issue d'un précurseur prM (162 acides aminés). Elle est également présente à hauteur de 180 copies par virion pour assurer la formation des hétérotétramères. Sa structure secondaire comporte une boucle en N-terminal, une hélice α péri-membranaire et deux hélices α transmembranaires. Étant donné sa taille, elle n'est pas exposée à la surface du virion mais son rôle est double : elle interagit avec les deux protéines E permettant de stabiliser le dimère et sa boucle N-terminal interagit avec le domaine II de la protéine E et semble prévenir la réorganisation précoces des dimères en trimère fusogénique(36).

Enfin, parmi les protéines de structure, il existe également la protéine C qui compose la nucléocapside. Cette protéine présente à hauteur de 540 copies par virion est composé de 96 acides aminés(37). Elle est organisée en 4 hélices α , d' α 1 à α 4. Cette protéine forme des dimères antiparallèles entre les hélices α 2 et α 4 de chaque sous-unité, et dans chaque monomère se forme une surface hydrophobe entre α 1 et α 3 disposées en faisceaux. Cette configuration favorise l'interaction entre la capsid et la membrane virale et donc la fusion avec le cellule cible(38).

Les protéines non structurales du virus assurent également plusieurs fonctions au sein du virion. La protéine NS1 est une glycoprotéine multifonctionnelle existant sous forme dimérique ou hexamérique, sa forme dimérique, associée aux cellules, joue un rôle dans la réplication de l'ARN viral tandis que la forme hexamérique, co-sécrétée avec les particules virales, permet une immunomodulation par réduction de la formation du complexe d'attaque du complément en se fixant sur C4(39). Les protéines NS2A et NS2B sont des protéines membranaires et jouent un rôle dans l'assemblage des virions. NS2A est impliquée dans la réplication et l'immunomodulation tandis que NS2B est un cofacteur de NS3. En effet le complexe NS2B-NS3 joue à la fois le rôle de protéase et d'hélicase, c'est l'enzyme virale clé responsable du clivage de la polyprotéine(40). NS4A régule, quant-à-elle, le domaine hélicase

de NS3. NS4B est lié à un peptide signal nommé peptide 2k qui dirige la protéine dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et le clivage de ce peptide par une peptidase de l'hôte induit une activation de NS4B qui reste enchâssée dans la membrane du RE pour induire la formation du complexe de réplication (41). Enfin la protéine NS5 joue le rôle d'ARN polymérase ARN-dépendante à son extrémité C terminal et de méthyl-transférase en N-terminal synthétisant la coiffe de l'ARN viral(42). Cette protéine essentielle pour le virus joue également un rôle majeur dans l'immunomodulation en étant capable d'inhiber à la fois l'immunité innée et l'immunité acquise en se comportant comme un antagoniste de la synthèse d'interféron essentiel à la réponse immunitaire(43).

I.1.4. Cycle viral

L'infection débute par l'attachement de la particule virale à un récepteur spécifique non encore clairement identifié en surface de la cellule cible (Figure 10-1). Le virus est ensuite internalisé et emprunte la voie des endosomes (Figure 10-2). La diminution progressive du pH au sein de ce compartiment provoque un changement conformationnel des dimères de protéines E en trimères fusogéniques entraînant la fusion du virus avec l'enveloppe de l'endosome (Figure 10-3). L'ARN viral encapsidé est ainsi libéré dans le cytosol, la capside se dissout et l'ARN migre vers le réticulum endoplasmique (RE). La réplication virale s'exécute avec en premier lieu la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative qui sert de « modèle » pour la synthèse d'ARN génomique (Figure 10-4). La suite de la réplication s'effectue au sein de la membrane du RE avec la synthèse de nombreuses nucléocapsides qui acquièrent leur enveloppe lipidique par bourgeonnement au sein de la lumière du RE (Figure 10-5). Les virions nouvellement formés sont ensuite dirigés dans l'appareil de Golgi et plus spécifiquement dans le réseau trans-golgien (Figure 10-6), où ces particules acquièrent leur pouvoir infectieux par un clivage de la protéine prM et une réorganisation de la protéine E en hétérotétramères compétentes pour la fusion (Figure 10-7). Ainsi, le virion néo-formé passe d'une forme immature hérissé à une forme mature lisse puis est internalisé dans une vacuole cytoplasmique avant d'être externalisé par exocytose (Figure 10-8) afin de reprendre son cycle.

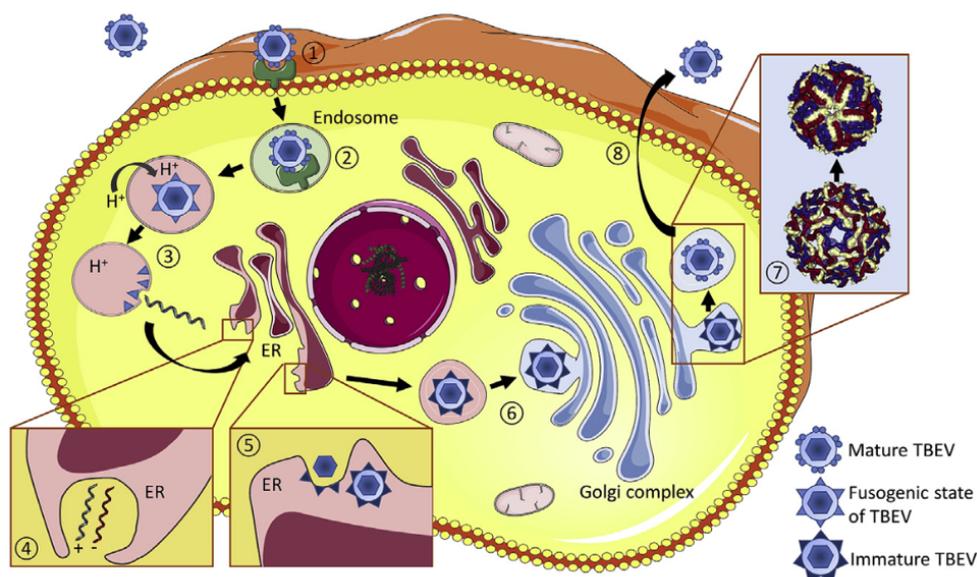


Figure 10 : Représentation schématique du cycle viral du TBEV(44)

I.1.5. Cycle de transmission

Comme vu précédemment, la transmission du virus peut se dérouler de différentes façons, à la fois entre le vecteur et l'hôte, entre les vecteurs eux-mêmes, par consommation d'aliments contaminés ou bien par exposition au sang. En effet, le cycle biologique (Figure 11) est entretenu par plusieurs mécanismes permettant ainsi une dissémination et une survie du virus dans le temps et la prévalence du virus est étroitement liée à l'écosystème dans laquelle le vecteur évolue (présence et activités des hôtes), si bien que l'identification du virus se fait généralement par foci et non dans des zones étendues(45). Quelques études confirment cette hypothèse avec des prévalences du virus dans les vecteurs comprises entre 3 et 43% en Asie(21), entre 0,1% et 5% en Europe selon les pays et les régions. En France, une étude franco-allemande retrouve un taux d'infection minimal de 0,11% en Alsace(46).

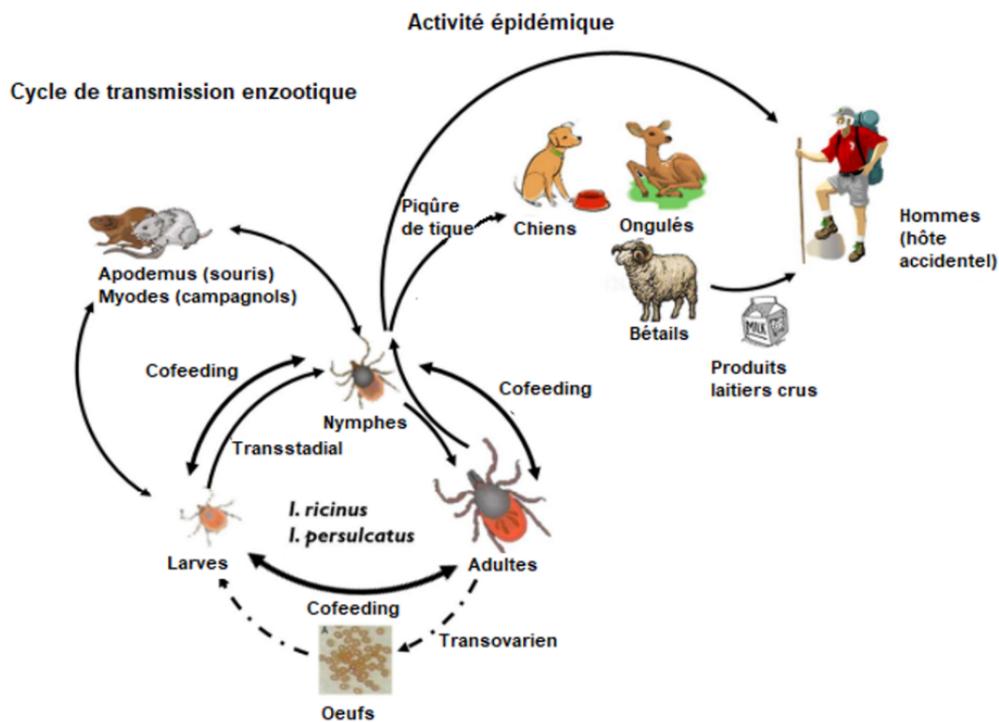


Figure 11 : Cycle de transmission du TBEV(47)

Le premier mode de transmission, le plus connu et le plus étudié correspond à la transmission vectorielle direct lors de repas sanguin. En effet, chaque stase (larve, nymphe, adulte) a la capacité de transmettre le virus lors de repas sanguin. Les hôtes privilégiés sont les petits et grands mammifères ainsi que les oiseaux. Les petits mammifères sont de petits rongeurs appartenant majoritairement au genre *Apodemus* et *Myodes*(48) mais également des hérissons, qui sont les hôtes préférentiels des larves et des nymphes. Leur faible durée de vie et leur taux de reproductivité élevé constitue une population naïve idéale pour une circulation efficace du virus dans l'environnement. Les adultes, s'attaquent essentiellement aux grands mammifères comme les cervidés et les ruminants qui participent activement à la dissémination du virus sur les territoires grâce à leur grande mobilité, si bien que la densité de tiques est corrélée à celle des cervidés. Les oiseaux, tout comme les grands mammifères, et spécifiquement les oiseaux migrateurs sont également de très bons hôtes pour disséminer le virus sur de longue distance, en effet ceux-ci sont porteurs de tiques infectées à hauteur de

4%(49) qui une fois gorgées n'ont qu'à se laisser chuter pour continuer leur cycle. Ce sont donc majoritairement les nymphes qui entretiennent ce cycle en milieu naturel. Les Hommes, quant-à-eux, sont des hôtes accidentels et ne participent que très peu au cycle de transmission.

Contrairement à la transmission de *Borrelia burgdorferi* qui nécessite 24 à 48h de repas sanguin, la transmission du virus de l'encéphalite à tiques débute quelques minutes après le début du repas sanguin(50) du fait de sa concentration dans les glandes salivaires du vecteur. Il est acquis dans l'histoire des transmissions vectorielles que le vecteur transmet le pathogène au cours d'un repas sanguin, l'hôte développant une virémie à la suite de cette infection, et un vecteur naïf s'infecte en prenant son repas sur ce même hôte. Mais paradoxalement, ce mode de transmission n'est pas le plus efficace. En effet, la période de virémie de l'hôte est courte et peu intense(51) ce qui statistiquement réduit la probabilité qu'un nouveau vecteur s'infecte.

Mais dans les années 1990, le docteur Labuda décrit pour la première fois la notion de transmission non-virémique(52), s'effectuant par *cofeeding* (co-repas) entre deux ou plusieurs tiques dont au moins une est infectée prenant leur repas dans un même intervalle spatio-temporel (Figure 12). La salive de tiques joue un rôle clé dans ce mode de transmission en étant très immunogène(53) et est régulée qualitativement par le virus pour sa propre survie(54). Ainsi la piqûre déclenche une cascade de réponse immunitaire aboutissant à un afflux de leucocytes sur site, utilisés comme transporteur du virus. Les leucocytes infectés et le virus libéré dans la salive peuvent alors être ingurgités par une tique voisine. Cette méthode est d'autant plus efficace qu'il a été décrit jusqu'à 66% de transmission entre les tiques lors d'un *cofeeding*, ignorant totalement l'immunité innée de l'hôte.

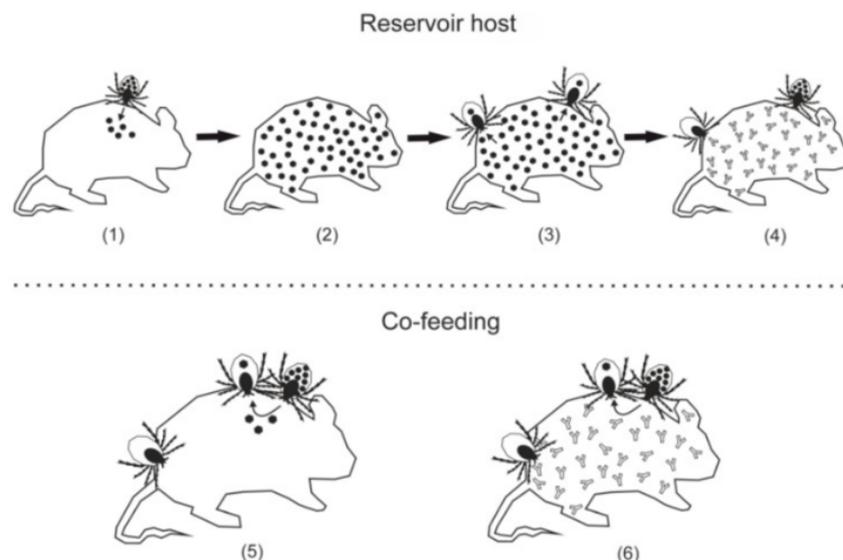


Figure 12 : Principes du co-feeding, transmission virémique (haut) bloquée par l'immunité innée de l'hôte et non virémique (bas) insensible à la réponse humorale de l'hôte(55)

Enfin le virus, dans une moindre mesure, se transmet également de deux autres façons : par voie transstadiale et transovarienne. La voie transstadiale est défini par la survie du virus au cours des différentes stases de la tique. Le pourcentage de survie du virus a chaque mue a été expérimentalement estimé entre 30% et 100%(56). Le délai entre les repas sanguin (pouvant parfois atteindre plusieurs années) semble favoriser la multiplication et la

dissémination du virus dans l'organisme de la tique, lui permettant de survivre aux changements de stade. La communauté scientifique s'est accordée à dire qu'une tique qui s'infecte par le virus de l'encéphalite à tiques à un moment de sa vie, reste infectée tout au long de celle-ci. Concernant la transmission transovarienne, elle a été très étudiée dans les années 1960. Le virus a été isolé d'ovaires et d'ovocytes de tiques adultes femelles et le pourcentage de transmission maternelle a été évalué à 20% avec un pourcentage d'infection verticale de 0,23% à 0,75%(57).

I.1.6. Pathogénicité

I.1.6.1. Physiopathologie

La pathogénèse est différente selon la souche virale concernée, la charge virale inoculée et l'état physiopathologique du patient. Nous nous intéressons ici au cas le plus fréquent de transmission à l'Homme, c'est-à-dire par piqûre de tique. Le virus ne pénètre pas instantanément le flux circulatoire après une piqûre de tique malgré sa présence dans les glandes salivaires qui accélère sa transmission, le virus doit traverser plusieurs barrières physiologiques.

La barrière cutanée est très rapidement traversée grâce à la brèche provoquée par la piqûre. Il s'en suit une multiplication locale du virus dans les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques et les polynucléaires de la peau. La salive de la tique, qui est inoculée en même temps que les particules virales, joue un rôle important en exerçant une immunomodulation locale. De plus la protéine virale NS5, comme décrite précédemment, limite la maturation des cellules dendritiques et donc inhibe la présentation d'antigène aux lymphocytes T. L'immunité innée se met tout de même en place et les monocytes/macrophages répondent au chimiotactisme local. Le virus est alors transporté via le système lymphatique vers les ganglions lymphatiques environnant par le biais de ces leucocytes afin de déclencher la réponse immunitaire adaptative. Cette étape clé conditionne le devenir de l'infection. Si le virus survie à cette deuxième barrière, alors il est capable d'induire une virémie lors de la première phase clinique de la maladie avec atteintes de différents organes, en particulier le système réticulo-endothélial (rate, foie, thymus). Cependant l'infection est le plus souvent maîtrisée à ce stade et la séroconversion se met en place de manière totalement asymptomatique(58).

Il existe, par ailleurs, une troisième barrière physiologique à dépasser : la barrière hémato-encéphalique (BHE). Le TBEV n'est pas connu pour avoir un fort pouvoir neuro-invasif mais la manière dont le TBEV traverse la BHE reste à l'heure actuelle inconnue. Néanmoins quatre grandes hypothèses sont avancées résultant d'une combinaison de mécanismes. Tout d'abord, l'entrée du virus dans l'encéphale ne perturbe pas directement la structure de la BHE mais c'est la synthèse massive de cytokines induite par la multiplication virale intracrânienne qui perméabilise la barrière(59). Le virus semble également user de la stratégie du « Cheval de Troie », dans laquelle les particules virales atteignent le système nerveux central en étant transportées dans les leucocytes transitant dans ce dernier(60). Le virus semble également être capable de suivre par contiguïté le nerf olfactif démunie de BHE par voie rétrograde(61) au niveau des muqueuses nasales richement vascularisées. Mais l'atteinte la plus probable semble être une multiplication dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux aboutissant à un passage de la BHE par contiguïté.

Cette atteinte du système nerveux central signe la deuxième phase clinique de la maladie. Le virus se multiplie au sein de l'encéphale, de cellules en cellules par transport axonal, le neurotropisme du virus cible préférentiellement les neurones des cornes antérieures, la *medulla oblongata*, le pont, le noyau dentelé du cervelet, les cellules de Purkinje et le striatum(62). Macroscopiquement, cela se traduit par une hyperémie du parenchyme associée à des pétéchies hémorragiques disséminés, des œdèmes et des foyers de nécrose. Cependant il est important de noter que l'étude histopathologique cérébrale n'est pas spécifique et similaire à d'autres étiologies d'encéphalites virales.

La pathogénicité au niveau cérébral est due principalement à la réaction immunitaire explosive elle-même plutôt qu'à un rôle direct du virus lors de la réplication virale, en effet le fort relargage de la granzyme B par les lymphocytes T cytotoxiques et la microglie contribue grandement à la destruction du parenchyme cérébral(63). De plus le virus est rarement détecté dans le liquide cérébro-spinal à la phase aiguë de la maladie(64).

Mais certains individus semblent plus exposés, et cela semble s'expliquer par une prédisposition génétique responsable d'une augmentation de fréquence des formes graves de méningo-encéphalite à tiques. Il s'agit de la présence de l'allèle $\Delta 32$ du gène *CCR5*(65) codant les récepteurs *CCR5* des leucocytes. Ces récepteurs à chimiokines régulent le trafic des leucocytes vers le système nerveux central et donc par extension, contrôle la capacité de clairance virale de celui-ci. La présence de l'allèle $\Delta 32$ sur le gène de manière hétérozygote ou homozygote conduit à la synthèse d'une protéine défectueuse, inhibant ainsi l'afflux de leucocytes vers le système nerveux central et par extension l'épuration virale.

I.1.6.2. Signes cliniques

Après une piqûre de tique infectée et en capacité de transmettre le virus, il est nécessaire que l'inoculum viral soit suffisant pour induire la maladie. Malgré le fait que la transmission puisse se faire dans les premières minutes après le début du repas sanguin de la tique, il est possible de réduire ce risque en retirant celle-ci le plus précocement possible, en effet la charge virale dans les glandes salivaires du vecteur augmente de 50 à 100 fois le niveau de base dans les 48 heures suivant le début du repas.

Si toutefois, la maladie se déclare, il est nécessaire de la définir grâce au consensus de 2017 ayant établi un tableau définissant les critères de diagnostic de l'encéphalite à tiques (Tableau 1). En effet, un cas d'encéphalite à tiques est confirmé quand une personne présente à la fois des symptômes d'inflammation du système nerveux central (méningite, méningo-encéphalite, encéphalo-myélite, encéphalo-radiculite), une pléiocytose supérieure à 5 leucocytes/ μ L dans le liquide cérébro-spinal (LCS), une histoire clinique pertinente, et au moins un des critères suivants : détection d'IgM et IgG anti-TBEV dans le sérum, détection d'IgM dans le LCS, séroconversion avec une augmentation de 4X sur deux échantillons sériques, détection de l'ARN viral dans un échantillon biologique. Un cas probable se définit comme la présence de critères cliniques sans critères sérologiques/moléculaires mais avec un lien épidémiologique fort. En l'absence de critère épidémiologique, la présence d'IgM anti-TBEV dans un sérum est nécessaire pour affirmer une infection probable.

Tableau 1 : Définition clinique et critères de diagnostic de l'encéphalite à tiques en Europe(66)

	Confirmed TBE	Probable TBE	
Clinical criteria	Symptoms of CNS inflammation: meningitis, meningoencephalitis, or encephalomyelitis	Symptoms of CNS inflammation: meningitis, meningoencephalitis, or encephalomyelitis	Symptoms of CNS inflammation: meningitis, meningoencephalitis, or encephalomyelitis
Epidemiological link	Yes	Yes	No
CSF findings	Pleocytosis $> 5 \times 10^6$ cells/l	Pleocytosis $> 5 \times 10^6$ cells/l	Pleocytosis $> 5 \times 10^6$ cells/l
Microbiological/serological criteria	TBE-specific IgM and IgG antibodies* in serum; or TBE-specific IgM antibodies in CSF; or seroconversion or 4-fold increase in TBE-specific IgG antibodies in paired serum samples; or detection of TBE viral nucleic acid in a clinical specimen	No	TBE-specific IgM antibodies in a single serum sample

Les différents sous-types du virus de l'encéphalite à tiques ne sont pas équivalents en termes de pathogénicité. Le sous-type Asiatique possède une forte capacité neuro-invasive et provoque une atteinte du système nerveux central plus sévère avec une tendance pour le patient à développer une méningo-encéphalite avec troubles neurologiques focaux (troubles visuels, aphasie, paresthésie...), une encéphalite, une myélite du tronc cérébral et de la moelle épinière se traduisant par des paralysies accompagnées d'une perte de connaissance. Il existe cependant dans 50% des cas, des formes totalement asymptomatiques. Le taux de mortalité pour ce sous-type se situe entre 20 et 60%, avec une forme plus sévère chez l'enfant que chez l'adulte(67). De plus, c'est le seul sous-type qui présente un développement monophasique avec un début de maladie aigu et sévère(68).

Le sous-type Sibérien induit une présentation clinique moins sévère et plus insidieuse que le sous-type Asiatique avec des formes asymptomatiques plus fréquentes de l'ordre de 70%. La période d'incubation est prolongée de 15 à 24 jours et la forme clinique classique se traduit par un développement progressif d'une encéphalite fébrile non paralytique pouvant entraîner une épilepsie partielle, des syndromes extrapyramidaux et une paralysie des membres. La récupération est lente et dans certains cas les symptômes sont irréversibles. Le taux de mortalité se situe entre 6 et 8% et touche préférentiellement les enfants(69).

Le sous-type Européen est responsable majoritairement d'infections asymptomatiques, estimées à 70-98% des cas(70). La période d'incubation est comprise entre 2 et 28 jours après la piqûre, plus fréquemment comprise entre 7 et 14 jours. Durant la première phase virémique, les symptômes dominants sont non spécifiques, se rapprochant de ceux d'un syndrome pseudo-grippal associant hyperthermie aux alentours de 38-39°C, asthénie, céphalées, myalgies et troubles gastro-intestinaux durant environ 5 jours. A ce stade la séroconversion peut avoir lieu mais dans 30% des cas la deuxième phase apparaît après environ 7 jours de « guérison apparente ».

La seconde virémie atteint l'encéphale, c'est la phase neurologique. 25% des cas déclarent la maladie durant cette phase, sans que la première phase n'ait été détectée(71). Environ 50% des patients vont présenter une méningite typique d'évolution favorable et spontanée. 40% d'entre eux vont avoir une méningoencéphalite associée à des signes neurologiques aspécifiques de gravité variable comme des troubles psychomoteurs, des troubles de l'équilibre, un syndrome cérébelleux, des troubles phasiques, des tremblements et des paresthésies. Enfin 10% des cas vont déclarer une méningoencéphalomyélite, une forme sévère associée à des parésies et paralysies flasques, pouvant toucher également le nerf phrénique et le bulbe rachidien et engageant le pronostic vital par risque d'arrêt cardio-respiratoire. Ces différents signes neurologiques s'accompagnent d'une hyperthermie brutale aux alentours des 40-41°C, d'une altération de l'état général et d'un score de Glasgow inférieur à 7 chez un tiers des patients(72), on parle alors de syndrome méningé fébrile. Les crises

épileptiques, à l'instar des déficits moteurs sont quant-à-eux possibles mais rares. La létalité dépend de la gravité de la phase neurologique mais est en moyenne inférieure à 2%(44).

Une forme atypique de la maladie est particulièrement redoutée. Décrite en 1999 à l'oblast de Novossobirsk en Sibérie occidentale, elle est due à une souche proche du sous-type Asiatique (94,7% d'homologie) ayant provoquée le décès de 8 patients. Le tableau clinique correspond en une période d'incubation d'environ 13 jours, suivie de signes neurologiques classiquement décrits précédemment. La particularité réside dans le fait que des signes hémorragiques majeurs accompagnent ces symptômes, avec des saignements digestifs, des hémorragies cutanéomuqueuses et une hématurie (détectable 7 jours après la piqûre). Le décès survient 2 à 3 jours après le syndrome hémorragique(73). Aucun autre cas n'a été décrit depuis.

Le pronostic et la récupération dépendent de la gravité du tableau initial. Le sous-type viral asiatique, l'âge avancé, la forte concentration sérique en leucocytes et en protéine C-réactive, le faible taux d'anticorps anti-TBEV au moment du diagnostic sont des facteurs de mauvais pronostic(74).

La population pédiatrique est également touchée et représente 6 à 20% des cas rapportés par les pays Européens, mais les formes cliniques sont souvent bénignes avec une évolution favorable et une mortalité faible. Les principales différences cliniques se trouvent dans le déroulé de l'infection qui semble être biphasique dans 90% des cas (contre 75% chez les adultes), avec une moins bonne tolérance à l'hyperthermie entraînant des crises épileptiques chez 20 à 100% des enfants indépendamment de leur âge(75). Les nausées et vomissements semblent également être plus fréquents à contrario de l'encéphalite, moins fréquente mais plus sévère nécessitant un recours aux soins intensifs.

Mais ce qui est le plus redouté dans cette maladie, aussi bien dans la population pédiatrique que chez les adultes, est incontestablement la morbidité à long terme. En effet les séquelles neurologiques sont fréquentes et touchent 20 à 50% des adultes et 5% des enfants(76) plus de 18 mois après une infection à TBEV avec expression méningée. L'expression la plus commune est le syndrome post-encéphalitique se traduisant par des troubles psychiatriques, des troubles cognitifs et de la mémoire, une plus grande fatigabilité et irritabilité chez les adultes. Dans la population pédiatrique, cela se traduit plutôt par des troubles de la concentration et de la mémoire ayant un retentissement sur les performances scolaires avec un risque de persistance à vie dans 2% des cas(77). Pour les cas les plus graves, les paralysies et parésies peuvent subsister plusieurs années, être partiellement restaurées où entraîner un handicap à vie.

I.1.7. Outils diagnostics

La principale difficulté rencontrée pour poser le diagnostic d'encéphalite à tiques est la faible prévalence du virus et la distribution en foci sur les territoires entraînant une faible connaissance du virus par les professionnels de santé. En effet, le tableau clinique est peu évocateur et des diagnostics différentiels plus fréquents (Herpes-simplex virus, Varicelle-Zona, Entérovirus...) peuvent être explorés en première intention devant des tableaux neurologiques. La notion de piqûre de tique en zone d'endémie dans les 4 semaines précédant le début des symptômes et l'évolution biphasique de la maladie restent importantes pour orienter le diagnostic. Mais cette notion de piqûre n'est retrouvée que dans 50% des cas(30).

L'intérêt des dosages biologiques est limité durant la première phase de la maladie, il est classiquement décrit une légère leucopénie, une thrombopénie et une élévation des transaminases. Un syndrome inflammatoire biologique peut s'observer lors de l'atteinte méningé avec leucocytose et augmentation de la protéine C-réactive. L'analyse du LCS à ce stade révèle une pléïocytose modérée avec environ 70% des patients présentant moins de 100 leucocytes/ μ L à prédominance lymphocytaire mais pouvant être panachée, la glycorachie y est normale associée à une hyperprotéïnorachie(72).

Les examens paracliniques sont peu contributifs, en effet l'imagerie par résonance magnétique (IRM) n'est pathologique que dans 18% des cas de méningite ou méningo-encéphalite avec une atteinte visible du thalamus, du cervelet et des noyaux caudés(78). L'électroencéphalogramme montre des tracés pathologiques dans 77% des cas mais sont non spécifiques et peu contributifs.

Les outils diagnostics virologiques reposent sur la biologie moléculaire et la sérologie. En s'intéressant à la place des outils moléculaires dans le diagnostic de l'infection, on se rend compte qu'ils sont très rapidement limités par la faible circulation du génome viral. Cependant l'amplification du génome viral par RT-PCR permet de poser le diagnostic spécifique d'une infection par le virus de l'encéphalite à tiques, mais ce virus n'est détectable dans le sang total qu'à l'apparition des symptômes pseudo-grippaux pendant environ 5 jours. Il est donc hautement improbable de réaliser la recherche d'ARN de l'encéphalite à tiques dans le sang total devant ce tableau, du fait que le virus soit rarement détectable dans le sang et le liquide cébrospinal lors des manifestations méningées(79). L'intérêt de la biologie moléculaire réside alors en *post-mortem* pour établir la cause d'un décès, par recherche direct dans les tissus cérébraux.

La méthode de référence est la sérologie, mais celle-ci peut être mise en défaut du fait de l'appartenance du virus de l'encéphalite à tiques à la famille des *Flaviviridae*. En effet, cette famille présente une grande homogénéité génétique avec une variabilité d'environ 6% sur l'ensemble du génome. Cette particularité se traduit par une grande homologie protéique entre les différents virus (encéphalite japonaise, fièvre jaune, dengue...), aboutissant à de potentielles réactions croisées en sérologie. Concernant la cinétique d'apparition des anticorps anti-TBEV après une infection naturelle (Figure 13), la réponse humorale est détectable au début de la phase neurologique, période à laquelle les patients consultent généralement. Les immunoglobulines M (IgM) sont détectables dans le sérum à partir de la deuxième-troisième semaine post-infection et la durée de détection de ces anticorps est soumise à une variabilité inter-individuelle : classiquement de plusieurs semaines jusqu'à 10 mois après le contage. Les immunoglobulines G (IgG), quant-à-elle, apparaissent plus tardivement à partir de la troisième semaine, sont protectrices et peuvent persister durant toute la vie du patient prévenant ainsi les risques de réinfection(80).

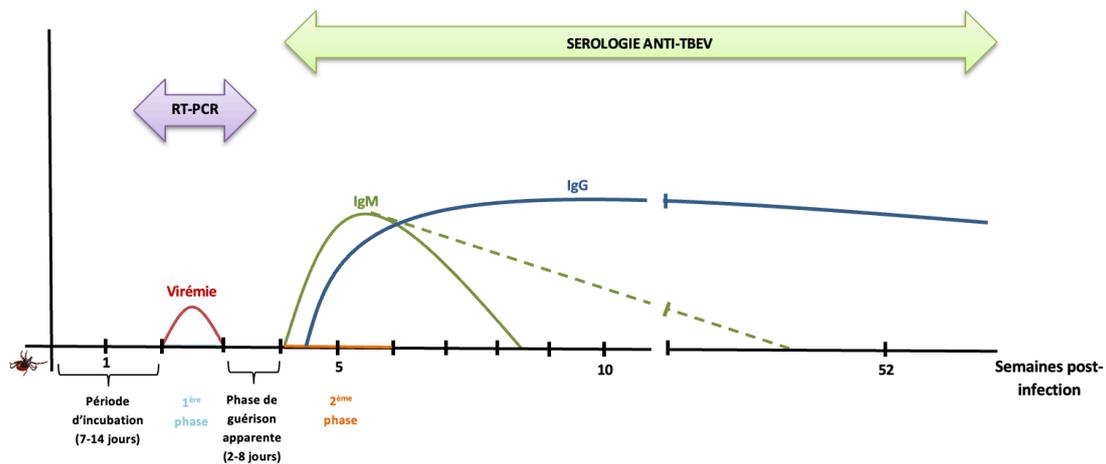


Figure 13 : Cinétique de la virémie TBEV et des anticorps anti-TBEV dans le sang (d'après Holzmann, Vaccine 2003)

Ces anticorps sont détectés par technique ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) majoritairement disponibles sous forme de trousse commerciale. Ces kits utilisent du virus entier inactivé de différents sous-types comme antigène avec une très bonne sensibilité (>90%)(81). La spécificité, quant-à-elle, varie selon les kits pour les raisons évoquées précédemment. L'interprétation des résultats de sérologie doit donc être prudente pour les patients vaccinés contre d'autres flavivirus, vivants ou ayant voyagé dans des zones de circulations de flavivirus. La spécificité non optimale des kits oblige, en cas de séropositivité dans des zones de co-circulation avérée d'autres flavivirus, à avoir recours à une technique de confirmation dans un deuxième temps. Cette étape se fait par séroneutralisation du virus et nécessite un laboratoire confiné de niveau de sécurité biologique 3 permettant d'évaluer l'immunité spécifique contre le virus de l'encéphalite à tiques. En France, cette étape de confirmation est réalisable au Centre National de Référence des Arbovirus à Marseille.

La détection d'IgM dans le LCS est réalisable, apparaissant généralement 10 jours après le début de la phase méningée(80). Néanmoins il faut être vigilant sur le fait que seules certaines trousse sont validées par leur fabricant pour la détection d'anticorps dans cette matrice. En effet, la conférence de consensus européenne de 2017 précise la place de la synthèse intrathécale, qui s'avère utile pour confirmer le diagnostic uniquement chez les patients vaccinés contre le TBEV qui développeraient une phase méningée. Chez ces patients, l'apparition des IgM peut être retardée tandis qu'une ascension rapide des IgG dans le sérum peut être observée(66) et seule la démonstration d'une synthèse intrathécale d'anticorps TBEV permet de confirmer le diagnostic.

Il existe cependant des difficultés pour différencier un patient vacciné d'un patient ayant fait une réelle infection, mais récemment une nouvelle technique ELISA a été développée. Il s'agit du dosage spécifique d'IgG anti-NS1 du virus de l'encéphalite à tiques(82). Cette protéine essentielle à la réplication virale n'est présente qu'au cours d'une infection par le virus. Cette nouvelle méthode permet, en pratique, de distinguer les séroconversions infectieuses de celles vaccinales avec une sensibilité similaire aux kits conventionnels et moins de réactions croisées. Cette augmentation de la spécificité peut s'expliquer par une moindre homologie en acide aminé de la protéine NS1 entre les flavivirus. Cependant cette technique reste plutôt un outil de suivi épidémiologique car seule la séroneutralisation apporte une confirmation sur les sérologies de dépistage positives.

I.1.8. Prise en charge et mesures préventives

I.1.8.1. Traitement

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique contre le virus de l'encéphalite à tiques et la seule prise en charge proposée est symptomatique malgré le fait que 90% des cas nécessite une hospitalisation dont 10% en unité de soins intensifs(76), avec une durée moyenne de 10 jours. Il est important de noter que l'isolement du patient est inutile car il n'existe pas de transmission interhumaine. Partant de ce constat, plusieurs approches thérapeutiques ont été expérimentées pour lutter contre cette maladie avec plus ou moins de succès à la clé.

Parmi les essais les plus notables, il a été démontré que l'usage de corticoïdes seuls n'apporte pas d'amélioration clinique significative, et contribue même à un allongement de la durée d'hospitalisation. Cependant associés aux échanges plasmatiques, cette classe médicamenteuse a permis de réduire la symptomatologie d'un patient(83).

Les traitements par immunothérapie n'ont pas non plus montré d'intérêt majeur, les immunoglobulines totales ont amélioré certains symptômes mais pas les symptômes neurologiques(84). Les injections d'immunoglobulines spécifiques anti-TBEV qui avaient un réel intérêt, étaient encore pratiquées en Europe dans les années 2000 avant d'être suspendue par précaution après la découverte d'une facilitation de l'infection par les anticorps dans le cadre d'une immunothérapie spécifique contre le virus de la fièvre jaune et de la dengue (85). Cependant, une étude récente relance le débat de l'immunothérapie en décrivant un anticorps chimérique du nom de « *chFVN145* », protecteur à hauteur de 100% sans risque de facilitation de l'infection sur modèles murins(86).

De nombreux essais *in vitro* ont également été réalisés pour inhiber la polymérase virale avec des analogues non nucléosidiques et nucléosidiques. Cette classe d'antiviral ayant malheureusement une barrière génétique faible, de nombreux mutants résistants ont été découverts *in vitro* suite à ces tests(44). Cependant une molécule, la « *7-deaza-2'-C-methyladenosine* » qui est un analogue nucléosidique, possède des propriétés intéressantes contre le virus Zika et le West-Nile virus en modèle murin, avec une efficacité thérapeutique proche de 100% et une toxicité cellulaire quasi inexistante(87).

Enfin l'umifenovir, un antiviral à large spectre utilisé en Russie et en Chine dans le traitement et la prophylaxie antigrippal a récemment été testé sur une souche européenne de TBEV. Cette molécule a démontré un effet antiviral sur culture cellulaire nécessitant de plus ample investigation sur modèle animal(88).

Finalement ces différents axes de recherche soulignent la faiblesse de l'arsenal thérapeutique pour traiter efficacement une infection par le virus de l'encéphalite à tiques. En l'absence de traitement efficace, l'adage « mieux vaut prévenir que guérir » prend tout son sens et l'attitude à développer est celle de la médecine préventive, reposant sur la lutte antivectorielle, la vaccination, la surveillance épidémiologique des foyers naturels de TBEV et l'information aux populations locales.

I.1.8.2. Prévention

La lutte antivectorielle consiste en une série de règles simples à appliquer en cas de fréquentation de zones à risques. Elle consiste à éviter les zones de hautes herbes et les zones forestières avec beaucoup de feuilles mortes, porter des vêtements couvrants et clairs permettant de repérer les tiques plus facilement. Un examen minutieux du corps (avec une attention particulière aux oreilles, cuir chevelu, plis, organes génitaux, nombril) rapidement après le retour de zone infestée est fortement recommandé. La prévention peut se faire également par les répulsifs cutanés, substances chimiques désorientant l'arthropode dans son repérage de l'hôte sans pour autant le tuer. Cependant ces répulsifs doivent être correctement appliqués et à la bonne concentration pour être efficace, au risque sinon de voir l'effet totalement annulé. Si malgré toutes ces préventions une piqûre de tique survient, alors l'extraction mécanique est la plus efficace et doit être pratiquée le plus rapidement possible. L'usage d'un tire-tique ou d'une pince fine est particulièrement adapté (Annexe 3). L'utilisation de produits tel que l'alcool, l'éther, l'huile est totalement inutile voire contre-productif avec un risque de régurgitation de la tique augmentant les risques de transmission d'agents infectieux. Enfin la prévention est aussi collective et passe par un entretien des espaces verts et le maintien à distance de la faune sauvage(89).

La vaccination demeure le moyen de prévention le plus efficace. Elle est utilisée depuis plus de 30 ans en Europe et notamment en Autriche(90). En France, la vaccination anti-TBEV a été introduite en 2005 et est recommandée chez les personnes résidant en zone d'endémie et chez les voyageurs devant séjourner en zone rurale ou boisée dans les régions d'endémie. Deux vaccins non remboursés sont disponibles en France, Ticovac® indiqué chez l'enfant à partir de 1 an et chez l'adulte et Encepur® indiqué à partir de 12 ans. Tous deux sont composés de virus inactivés de sous-type européen, souche Neudörfl et K23 respectivement. Les schémas d'administrations classiques sont quasiment similaires entre les deux vaccins avec trois doses à J0, puis entre M1-M3 puis entre M5-M12 (Ticovac®) ou M9-M12 (Encepur®), de plus ceux-ci sont interchangeables au cours de la vaccination (Figure 14). Des schémas de vaccination accélérée en 1 mois sont réalisables permettant durant la période d'activité des tiques d'immuniser les patients rapidement ; cependant la réponse immunitaire est moins importante et la concentration en anticorps à tendance à décroître plus rapidement(91). Le premier rappel est à administrer 3 ans après la troisième dose puis les rappels ultérieurs peuvent être administrés tous les 5 ans ou tous les 3 ans chez les populations plus âgées. Les deux vaccins sont hautement immunogènes avec un taux de séroconversion de 92-100% après une vaccination complète. De plus ces vaccins confèrent une protection croisée avec les autres souches TBEV-FE et TBEV-Sib(92).

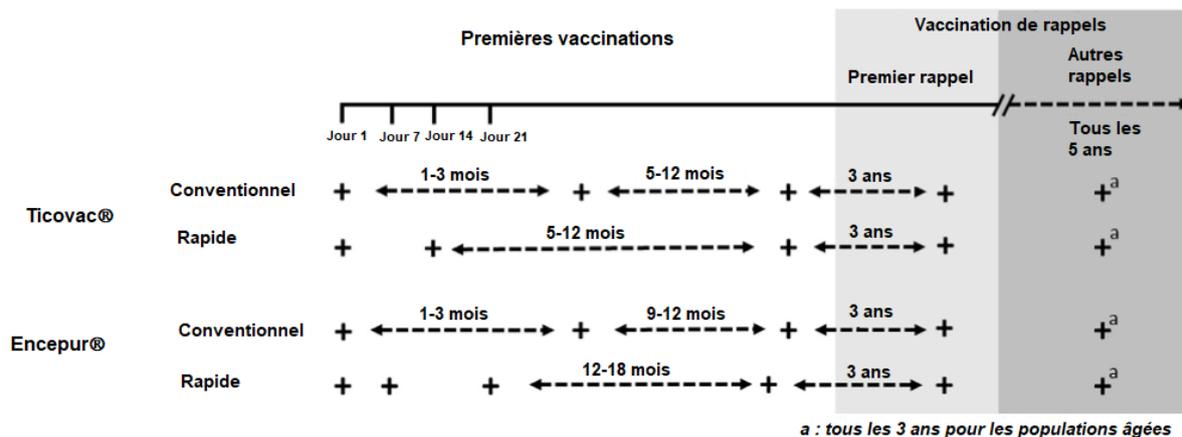


Figure 14 : Schéma d'administration des deux vaccins disponibles en France (traduit de Ruzek et al., 2019)

En Europe, la surveillance épidémiologique est dirigée par l'ECDC qui demande à tous les états membres de l'Union Européenne de communiquer un bilan annuel des cas observés. Cette vigilance permet d'évaluer l'évolution du virus sur les territoires et d'identifier rapidement les zones à haut risques. Cependant cette méthode a ses limites et les nouvelles zones endémiques sont identifiées à posteriori, à la suite de la déclaration de plusieurs cas. C'est pourquoi, à l'échelle nationale et parfois régionale, des projets émergent, comme en France, une étude menée par la Mutuelle Sociale Agricole en 2003 mettant en évidence une séroprévalence anti-TBEV de 3,4% chez les forestiers(93). Des projets « sur le terrain » sont également menés avec une surveillance s'organisant selon deux axes majeurs, la recherche du virus dans les vecteurs et l'utilisation d'animaux sauvages comme outils sentinelles. Ces méthodes prospectives permettent de mettre en évidence des foyers de circulation de virus et donc d'identifier des zones à risque avant même qu'il n'y ait de cas. C'est ainsi que le virus peut être mis en évidence par RT-PCR sur vecteur dans différents foci avec une prévalence allant de 0,01% à plus de 40% pour certaines régions d'Europe. Cette méthode présente comme avantage d'être facilement réalisable et permet de typer les souches, cependant ce n'est pas un indicateur très sensible dans les zones de faible circulation du virus et la sérologie sur animaux sauvages semble être plus appropriée, bien que plus compliquée à mettre en place(94). Les petits mammifères tout comme les cervidés sauvages sont des hôtes de choix pour les tiques et leur sérologie anti-TBEV permet d'identifier rapidement les zones d'endémies(55) avec des séroprévalence comprise entre 0 et 80% selon les zones.

Enfin, une approche originale a été expérimentée. En effet la transmission du virus par consommation de lait et fromages crus d'ovins et de caprins étant bien connue, certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'une surveillance été possible via une sérologie anti-TBEV sur un échantillon de tanks à lait(95). Cette technique non invasive et facilement réalisable du fait de la collecte journalière de lait s'est avérée robuste et fiable garantissant un grand échantillonnage par région. Cette méthode semble être un bon outil de surveillance et permet ainsi de cartographier les « points chauds » de circulation du virus.

« *Connais ton ennemi et connais-toi toi-même* » relatait Sun Tzu dans l'Art de la guerre. En effet, une bonne connaissance du vecteur est primordiale et s'inscrit totalement dans un plan de lutte contre le virus de l'encéphalite. Ainsi, la description détaillée du vecteur est développée dans la partie suivante.

I.2. La tique, vecteur principal

I.2.1. Caractères généraux

La position systématique des tiques se présente comme suit : elle appartient à l'embranchement des *Arthropoda*, au sous embranchement des *Chelicerata*, à la classe des *Arachnida*, la sous classe des *Acarida*, à l'ordre des *Ixodida*(96). Il existe environ 900 espèces de tiques réparties en 2 grandes familles, les *Ixodidae* comprenant plus de 700 espèces et les *Argasidae* regroupant plus de 190 espèces. Les premières sont communément appelées « tiques dures » et les secondes « tiques molles ». Il existe également une troisième famille, les *Nuttalliellidae* ne comprenant qu'une seule espèce sans intérêt médical(97).

Ectoparasites des vertébrés et apparues il y a plus de 200 millions d'années, leur répartition est ubiquitaire et leur capacité vectrice de germes chez l'Homme et l'animal est très étudiée. En effet, au niveau mondial, les tiques sont le deuxième vecteur de maladies derrière les moustiques mais au niveau Européen et plus majoritairement au niveau de l'hémisphère Nord, celles-ci représentent le premier vecteur de maladies chez l'Homme.

En France, une quarantaine d'espèces ont été répertoriées parmi lesquelles on retrouve majoritairement quatre genres (Figure 15). Le genre *Ixodes* est largement répandu et représente quasiment la moitié des espèces présentes sur le territoire avec pas moins de 18 espèces, cependant l'espèce *I. ricinus* reste tout de même largement majoritaire. Cette fréquence s'explique par sa faible exigence en termes d'hôtes, en étant capable de se nourrir sur plus de 300 espèces comme les petits et grands mammifères, les oiseaux et les reptiles. En suivant, le genre *Dermacentor* avec *D. reticulatus* et *D. marginatus* plutôt thermophile et donc plus souvent retrouvé sur le pourtour méditerranéen. Ce genre a la particularité de piquer plus souvent au niveau du cuir chevelu. L'espèce *Rhipicephalus sanguineus* ou « tique du chien » est également présente sur le territoire, plutôt inféodé aux régions chaudes. Le genre *Argas* est également présent en France, surtout sur les oiseaux et chauves-souris. Récemment ce sont les tiques du genre *Hyalomma* pourvoyeuses du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo qui ont été découvertes dans le sud de la France(98) jusqu'au sud d'Angoulême.

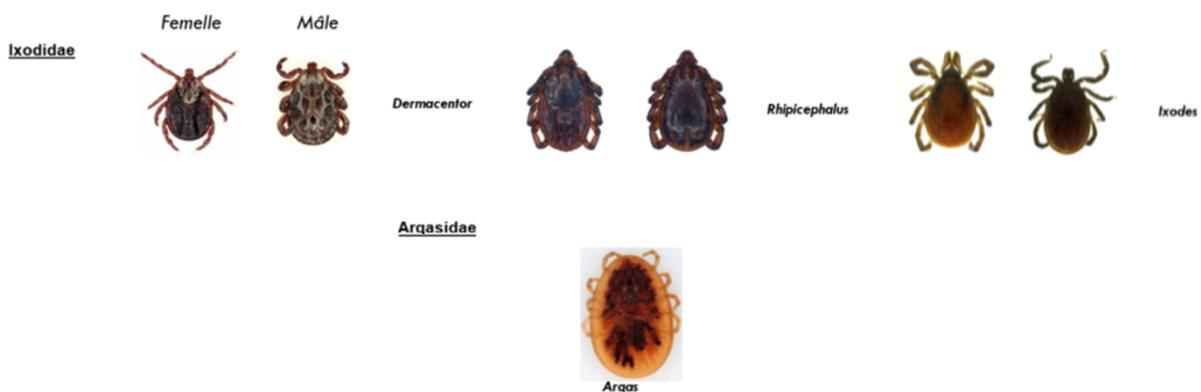


Figure 15 : Genres de tique les plus communs en France(99)

Comme vu précédemment ce sont les tiques du genre *Ixodes* et notamment *Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus* qui transmettent en grande majorité le virus de l'encéphalite à tiques. La suite de la description du vecteur est donc axée sur ce genre.

I.2.2. Description morphologique

Les tiques font parties de la classe des Arachnides, de la sous-classe des Acariens et de l'ordre des Parasitiformes. Les tiques se distinguent facilement des insectes par leur aspect globuleux, en effet les insectes ont trois segments bien différenciés (tête, thorax, abdomen). Les tiques en revanche présentent deux parties, l'idiosome et le capitulum et n'ont pas de tête à proprement parler mais des pièces piqueuses faisant partie du capitulum (gnathosome) dont la morphologie est utile pour différencier les genres. Les tiques sont donc des acariens de grandes tailles pouvant atteindre 3 cm de long présentant un cycle de vie en trois stases actives : la larve, la nymphe et l'adulte (Figure 16). La croissance se fait par des mues successives indispensables à l'évolution des stases.

La stase larvaire est dite hexapode (3 paires de pattes) quand les nymphes et les adultes sont octopodes (4 paires de pattes). La différenciation de ces trois stases se fait également par la taille (prise non gorgées), en effet les larves sont de l'ordre de l'inframillimétrique avec une taille variant de 0,5 à 1 mm. Les nymphes sont, quant-à-elle un peu plus grande que les larves avec une taille moyenne de 1 à 2 mm. Enfin la stase adulte, qui est la stase ultime, est un peu plus grande que la stase précédente avec une taille d'environ 3 à 4 mm pour les mâles et 5 à 6 mm pour les femelles. Ces tiques, dans la majorité de cas, ont une reproduction sexuée obligatoire et sont gonochoriques (dimorphisme sexuel marqué).



Figure 16 : Différentes stases d'*Ixodes ricinus*(100)

I.2.2.1. Anatomie externe

I.2.2.1.1. Les adultes

Chez la tique adulte en position terminale avant se situe le capitulum portant les pièces piqueuses sur sa partie distale (Figure 17). Ces pièces piqueuses à proprement parler constituent le rostre (longirostre ou brévirostre selon les genres) lui-même composé d'un hypostome axial ventral denticulé en forme de harpon indispensable à l'ancrage de la tique sur son hôte. Par ailleurs, le rostre est également constitué de deux chélicères axiales en position dorsale, également denticulées en partie terminale reliées à de puissants muscles permettant de lacérer la peau de l'hôte. Enfin en partie latérale se situent deux pédipalpes entourant les pièces buccales au repos servant de stabilisateur lors de la piqûre et d'organes sensoriels par l'action de chémorécepteurs et de soies sensorielles.

Cet organe permet à la tique dans un premier temps de pénétrer la peau de son hôte en 3 à 5 minutes et de s'ancrer grâce à la sécrétion d'un ciment solidifiant. Ainsi dans une deuxième phase, elle peut continuer sa progression permettant d'obtenir une fixation complète en 30 à 60 minutes. Les femelles possèdent en arrière du capitulum des aires poreuses utiles lors de la ponte des œufs(101).



Figure 17 : Rostre de tique *Ixodes ricinus*, chélicères non visibles (photo du CNR Lyme de Strasbourg)

L'idiosome est relié au capitulum par une membrane articulaire souple appelée emargination permettant la flexion-extension du gnathosome. L'idiosome est lui-même divisé en deux parties : la podosome, en face ventrale avant où se situent l'insertion des pattes et le pore génital et l'opisthosoma en arrière de la quatrième paire de pattes portant les stigmates respiratoire servant à la respiration et l'ouverture anale. Dans l'axe médial ventral se trouve l'orifice génital situé entre la troisième paire de pattes. L'idiosome est recouvert en quasi-totalité d'une cuticule, cette membrane est élastique mais insuffisante pour contenir l'ensemble d'un repas sanguin, la tique synthétise donc sa cuticule au fur et à mesure de son gorgement(102). La différenciation entre les sexes, outre la taille, se fait par le scutum (écusson chitinisé et dur). En effet chez le mâle le scutum recouvre l'idiosome dorsal de l'individu tandis que chez la femelle, ce même scutum ne se retrouve qu'au tier supérieur de la partie dorsale facilitant le gonflement de la cuticule (alors nommée alloscutum) lors du repas sanguin. Cependant, d'autres plaques sclérifiées se retrouvent chez les individus des deux sexes, notamment au niveau ventral.

Les pattes portées par le podosome sont divisées en six segments et articulées par des hanches sclérifiées (ou coxae). La partie la plus distale, le tarse porte un organe nommé le pulvile. Cette structure sécrète en surface un composé lipidique permettant à la tique une adhésion optimale sur toute les surfaces même à la verticale. Le premier article de la première paire de pattes porte sur sa face dorsale un organe sensoriel indispensable à la recherche d'un hôte, l'organe de Haller (Figure 18) capable de détecter l'ammoniac présent dans la sueur et l'urine ainsi que le CO₂ et le sulfure d'hydrogène présent dans les gaz dégagés. Cet organe est également capable de détecter les mouvements et les variations rapides de température grâce à de nombreux chémorécepteurs et cils sensitifs.

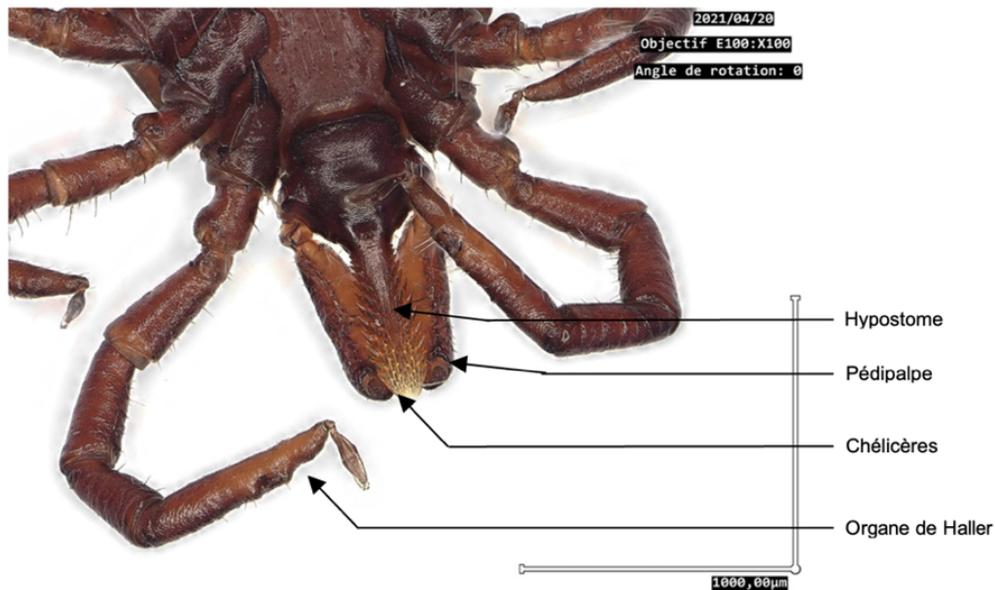


Figure 18 : Organes externes antérieurs d'une tique *Ixodes ricinus* (photo du CNR Lyme de Strasbourg)

I.2.2.1.2. Les nymphes

Les nymphes, quant-à-elle sont semblables aux formes adultes femelles, mais de taille plus petite. Elles ne sont pas sexuées et donc ne possèdent pas de pore génital ni d'aires poreuses. Cependant elles présentent également une paire de stigmates en position latéro-ventrale permettant la respiration.

I.2.2.1.3. Les larves

Les larves ne possèdent pas de pore génital ni d'aires poreuses. Elles possèdent trois paires de pattes et n'ont pas de stigmates, la respiration se fait directement en transcutanée à travers la cuticule. Cette méthode de respiration les rend cependant très sensibles à la dessiccation.

I.2.2.2. Anatomie interne

I.2.2.2.1. Le système tégumentaire

La couche externe des tiques est formée d'une cuticule représentant le squelette externe sécrétée par un épiderme à couche unique de cellule. Cette cuticule se divise en deux parties : l'épicuticule une couche externe très fine d'un à quatre microns d'épaisseur divisée en trois couches et une partie interne la procuticule d'une épaisseur d'un à cent microns, elle aussi divisée en trois couches. La couche la plus externe de la procuticule est l'exocuticule très sclérifiée et dure, suivi de la mésocuticule souple et élastique et de l'endocuticule constituée de protéines peu tannées. Ce système tégumentaire complexe permet de répondre aux besoins de la tique lors du repas sanguin. En effet la prédominance du mésocuticule rend le tégument élastique idéal lors du gorgement. A l'inverse lorsque le procuticule est majoritairement composé d'exocuticule alors le tégument devient très sclérifié et résistant, c'est ce que l'on observe au niveau du scutum, des coxae et des plaques ventrales.

Chez les larves, le système tégumentaire se réduit uniquement à l'épicuticule expliquant sa transparence, sa sensibilité à la dessiccation et sa capacité de respiration transcutanée.

I.2.2.2.2. Le système respiratoire

Comme vu précédemment, les larves respirent simplement à travers la cuticule. Cependant, les nymphes et les adultes ont un système respiratoire plus complexe. Tout d'abord de part et d'autre de la tique, juste derrière la quatrième paire de pattes se trouve des stigmates respiratoires (ou spiracles) recouverts de plaques stigmatiques jouant le rôle de filtre hydrophobes retenant la poussière et autres débris. Des pores dans ces plaques permettent de capter l'air environnant dans de multiples chambres sous-jacentes directement reliées à une trachée faisant transiter l'air vers un système trachéolaire très ramifié au contact des organes internes. Les pores en surface s'ouvrent et se referment grâce à une valve semblable à une valve auriculaire sensible à la concentration en dioxyde de carbone dans les chambres. La disposition en multiples chambres permet de lutter contre la dessiccation pendant la respiration en retenant les molécules d'H₂O expirées, ce qui explique en partie comment les tiques sont capables de survivre un long moment sans repas sanguin. Les tiques sont également capables grâce aux plaques stigmatiques de survivre totalement immergées pendant neuf à quinze jours(103)

I.2.2.2.3. Le système circulatoire

Les arthropodes n'ont pas de sang à proprement parler mais de l'hémolymphe, un liquide remplissant la cavité interne, aussi appelé hémocoèle dans laquelle baignent l'ensemble des organes internes. L'hémolymphe maintient la paroi sous tension, conférant ainsi une résistance à l'écrasement, ainsi qu'une pression osmotique en plus d'être une réserve hydrique importante. Par ailleurs, elle joue le rôle de transporteur de neurotransmetteurs, de métabolites, de cellules phagocytaires et de peptides antimicrobiens, si bien qu'elle est considérée comme le principal système de défense immunitaire innée. Ce liquide circule au sein de la tique grâce à un vaisseau dorsal renflé en cœur situé en position dorsal postérieur(104).

I.2.2.2.4. Le système nerveux

Le système nerveux central des tiques est concentré en une masse ganglionnaire antéro-ventral en arrière de l'ouverture génitale. Cet organe est péri-œsophagien et appelé ganglion cérébroïde ou synganglion(105). On distingue alors la partie pré-œsophagienne comportant les ganglions innervant les chélicères, les palpes et les glandes salivaires associées à un nerf œsophagien unique, un nerf stomacal unique et des nerfs innervant les organes de Haller. La partie post-œsophagienne comprend les ganglions innervant les quatre autres paires de pattes. De plus un cordon nerveux se détache vers l'arrière et se divise en deux branches allant innerver les muscles et les organes sensoriels.

Le système nerveux périphérique est également développé et permet à la tique d'être alerte sur l'environnement qui l'entoure. Cela passe par de nombreuses soies disposées sur l'ensemble du corps avec une grande concentration au niveau des palpes portant le nom de sensilles permettent de renseigner la tique sur la qualité de son environnement par mécano-proprio-réception et chimio-réception.

Enfin, les tiques, comme beaucoup d'animaux répondent à de nombreux médiateurs chimiques. Il en existe trois catégories. Les phéromones sont divisées en deux groupes : les sexuelles favorisant la rencontre des sexes et celles de rassemblement conduisant les individus immatures et matures des deux sexes à se rassembler sur l'hôte ou sur la végétation(106). En effet le comportement de rassemblement permettrait une meilleure survie de l'espèce dans l'environnement, diminuerait le stress, concentrerait les individus dans des sites favorables à la rencontre avec un hôte. La deuxième catégorie correspond aux allomones, qui sont des substances riches en hydrocarbures sécrétées par les tiques face à un prédateur, permettant de neutraliser temporairement l'agressivité de celui-ci(107). Enfin il existe les kairomones intervenant dans l'identification et la perception de l'hôte comme le CO₂ ou encore l'ammoniac typiquement retrouvés dans l'air expiré chez les hôtes.

I.2.2.2.5. Les glandes salivaires

En raison de leur implication dans la transmission d'agents pathogènes, les glandes salivaires représentent un organe important suscitant un grand intérêt. Elles sont au nombre de deux, de part et d'autre de la tique, multilobées et formées d'acini de trois types chez la femelle et quatre types chez le mâle. Le type I est impliqué dans l'osmorégulation, les types II et III dans le transport hydrique, la synthèse et la sécrétion protéique. Enfin le type IV est uniquement présent chez les mâles et permet de lubrifier le spermatophore pour faciliter le transfert à la femelle lors de l'accouplement(108). Ces glandes sont reliées à un système de canaux salivaires aboutissant à une cavité pré-orale nommé salivarium isolée par un mécanisme de trappe. Quand le salivarium est ouvert, la salive s'écoule dans l'hôte, à l'inverse lorsqu'il est fermé, le sang est aspiré dans le système digestif sous l'action des muscles du pharynx. L'alternance de production de salive et de succion de sang est caractéristique, et retrouvée à la fois chez les tiques dures et molles.

Elles jouent un rôle crucial lors de l'attachement de la tique à son hôte en sécrétant un liquide visqueux, le ciment, capable de solidifier et ainsi d'ancrer l'arthropode pendant son repas sanguin. Ces glandes sont également capables de changer de rôle pendant l'alimentation, en effet en dehors de l'hôte et en période de chasse elles synthétisent un sel hygroscopique sur les pièces buccales capable de capter l'eau atmosphérique permettant une homéostasie hydrique. Cependant au cours du repas sanguin, ces glandes deviennent des organes d'osmorégulation renvoyant l'excès d'eau et d'ions dans l'hôte via la salive. Par ailleurs, ces glandes sécrètent une salive particulièrement riche en substances pharmacologiquement actives et immunomodulatrices ayant des propriétés cytolytiques, vasodilatatrices, anticoagulantes, anti-inflammatoires et immunosuppressives.

I.2.2.2.6. Le système digestif

Les tiques sont des hématophages stricts, c'est-à-dire qu'elles se nourrissent exclusivement de sang. L'appareil digestif est donc très bien adapté et débute en antérieur par la cavité buccale composée de l'hypostome et des chélicères. Il n'existe pas de canal alimentaire et de canal salivaire individuels ce qui a pour conséquence une aspiration de sang et une éjection de salive de façon alternée par le même canal. En arrière se trouve un pharynx musculaire court mais puissant qui commande ce phénomène d'alternance. Il débouche dans un court œsophage terminé par une valvule dont le rôle est de s'opposer au reflux sanguin lors de la succion. L'appareil digestif moyen en suivant est composé d'un estomac en partie centrale avec de nombreux diverticules très ramifiés en latéral qui sont indispensables à la digestion de l'hémoglobine, des protéines et autres cellules absorbées.

Le bol alimentaire avance à travers l'appareil digestif postérieur par péristaltisme composé d'un court intestin se dilatant en sac rectal débouchant dans le rectum s'ouvrant à l'extérieur par l'anus. Des ramifications appelées tubes de Malpighi s'enroulent autour des différents organes, recueillent et excrètent dans le sac rectal les produits nitrogénés rejetés par les organes et présents dans l'hémocoèle. Après transformation en guanine ces déchets sont ensuite évacués à l'extérieur. Il est intéressant de noter l'étroite relation entre les diverticules et les différents organes internes de tiques, et notamment avec les ovaires pouvant expliquer le phénomène de passage transovarien d'agents infectieux par contiguïté (Figure 19).

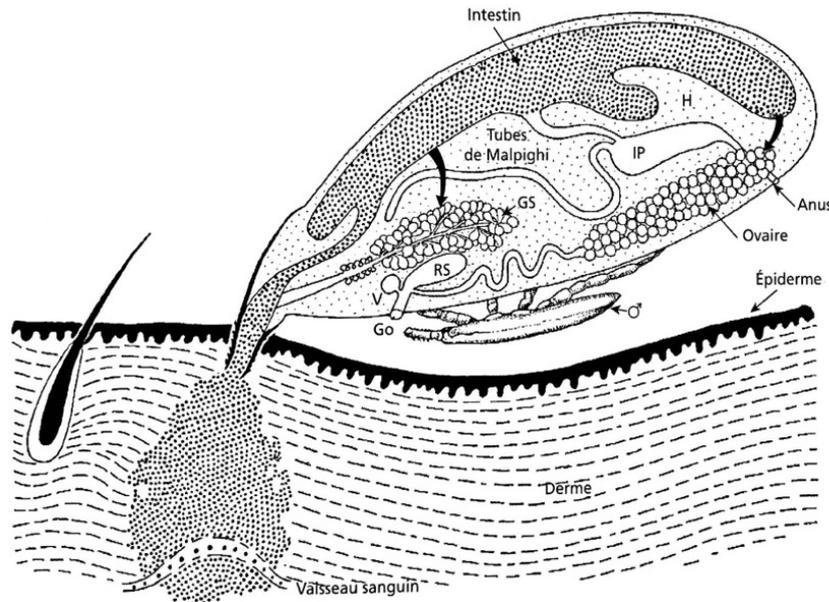


Figure 19 : Schéma de l'anatomie interne d'une tique femelle prenant un repas sanguin(108)

I.2.2.2.7. Le système génital

L'appareil génital de la femelle est très développé avec un ovaire unique en forme de chapelet disposé en position arrière du corps prenant l'apparence d'un fer à cheval. De chaque extrémité part un oviducte qui s'unissent pour former un utérus commun puis un vagin de taille importante servant également de spermathèque aboutissant au niveau de l'orifice génital externe en face ventrale. A proximité de cet orifice se trouve l'organe de Gené qui est un sac pouvant se dévagner lors de la ponte en sécrétant une cire riche en lipides saturés et insaturés sur les œufs. Les aires poreuses sécrètent des antioxydants inhibant la dégradation des graisses non saturés. Les œufs sont enduits par un mouvement combiné entre l'organe de Gené et les pièces buccales des adultes femelles.

L'appareil génital du mâle est lui formé de deux testicules tubulaires partiellement fusionnées suivies de canaux déférents, d'un conduit éjaculatoire s'ouvrant au niveau du pore génital. Une glande accessoire est présente au niveau du conduit éjaculatoire et permet la synthèse d'une substance nécessaire à la fabrication du spermatophore contenant les spermatozoïdes.

Lors de l'accouplement, qui peut être réalisé sur l'hôte pendant le gorgement de la femme ou directement à terre, le mâle se met ventre à ventre avec la femelle et introduit ces

pièces buccales dans le gonopore de celle-ci. Après un temps plus ou moins long, il retire son rostre et dépose un spermatophore qu'il expulse par son orifice sexuel. Le spermatophore a une forme de vessie avec entonnoir et seule la dernière partie est introduite permettant le déversement et la maturation des spermatozoïdes dans la spermathèque de la femelle pleine d'œufs(109). Après une période de « pré-oviposition », la femelle est apte à pondre ces œufs, pouvant attendre 20 000 œufs selon les espèces. La ponte est unique et la femelle meurt après celle-ci. Il est important de noter qu'en l'absence de rencontre entre une femelle gorgée et un mâle, un phénomène de parthénogénèse est possible(101).

I.2.3. Cycle de développement

I.2.3.1. Place dans l'environnement

La répartition spatiale des tiques dépend de plusieurs facteurs, à la fois biotiques et abiotiques. Chaque espèce de tiques est répartie dans des habitats favorables et les individus sont concentrés en foci, héritage de la ponte initial des œufs malgré la dispersion relative par les hôtes(110).

Parmi les facteurs biotiques, la couverture végétale est un élément essentiel à la survie des tiques très sensibles à la dessiccation. La canopée des arbres maintient une humidité relative au sol et la couverture créée par les feuilles caduques développe un microclimat humide idéal pour les tiques. A contrario, les forêts de conifères ne sont pas propices au développement des tiques à cause de l'absence de feuilles au sol et donc d'humidité. La densité de la végétation est également importante et permet de maintenir une humidité relative au sol, cependant dans certains cas la composition qualitative du couvert végétal l'est encore plus. En effet, certaines essences attirent certains hôtes et par conséquent offrent un terrain propice à la survie de ces arthropodes. Par exemple le chèvrefeuille de Maack aux Etats-Unis attire de nombreux cervidés et par conséquent permet le développement d'une densité importante de tiques(111). La grande majorité des milieux boisés sont favorables à la survie des tiques et il est possible de les retrouver dans les parcs publics, les jardins, trouvant alors comme hôte les oiseaux locaux et les rongeurs.

On retrouve également parmi les facteurs biotiques le facteur hôte. En effet, la faible capacité motrice des tiques rend la probabilité de rencontre tique-hôte majoritairement dépendante de la densité d'hôtes à disposition. Le genre *Ixodes* dispose d'une large gamme d'hôtes disponibles à parasiter cependant le choix de l'hôte pour une adulte femelle est crucial pour sa survie et la survie de la ponte en aval. En effet, les tiques sont amenées à rencontrer des animaux d'élevage proche des lisières de bois et des animaux sauvages. Les tiques gorgées sur des animaux domestiques vont majoritairement tombées au milieu des pâtures, peu végétalisés et fortement exposés aux aléas climatiques diminuant ainsi leur chance de compléter leur cycle. A contrario, les tiques s'étant gorgées sur des animaux sauvages auront une plus grande probabilité de tomber au milieu des bois et donc de terminer leur cycle(112). De plus les hôtes sont capables de transporter les tiques sur de longues distances, notamment les cervidés et oiseaux migrateurs participant ainsi à l'expansion du territoire des tiques.

Cependant, en milieu naturel la présence animale est multiple et les tiques sont également exposées à des prédateurs. Parmi ceux-ci, des hôtes peuvent également être des prédateurs comme certains oiseaux, les gallinacés ou les lézards. Les tiques sont aussi à la merci de certains invertébrés comme les fourmis, certains coléoptères et araignées

prédatrices. Certains hyménoptères comme ceux du genre *Ixodiphagus* sont dépendant des tiques pour effectuer leur cycle et sont dit hyperparasites. En effet ils pondent des œufs dans celles-ci qui après repas sanguin vont provoquer l'éclosion des œufs en larves qui consommeront la tique de l'intérieur. L'impact globale de la mortalité des tiques dû à ces prédateurs est peu connu et difficilement quantifiable mais semble moins important que la qualité de l'habitat et la probabilité de rencontre avec un hôte(113).

Mais les tiques dépendent également de facteurs abiotiques très importants et définissent les conditions d'habitabilité et de survie de ces arthropodes dans un milieu. En effet, parmi ces facteurs se trouve la température, un élément essentiel sachant que les tiques deviennent actives à partir d'environ 6-7°C(114). En dessous de cette température, les tiques s'enfouissent dans les sols et sous les feuilles pour effectuer une diapause comportementale et ainsi diminuer leur métabolisme en attendant la hausse des températures. Plus la température augmente, plus les stases se succèdent rapidement mais une température trop élevée, à partir de 29 degrés Celsius entraine un assèchement de l'air et une perte de cet effet vertueux(115). Par ailleurs, l'hygrométrie joue également un rôle central dans la survie des tiques. Ces arthropodes étant très sensible à la dessiccation, une humidité relative inférieure à 70% est déjà délétère pour les stases les moins évoluées. Ce besoin de lutter contre cette transpiration influence le comportement des tiques : la phase d'affût se retrouve amputée lorsque l'hygrométrie est basse les obligeant à quitter leur point haut pour se réhydrater dans la litière végétale. Il est ainsi possible de définir des niches climatiques propices au développement des tiques et ainsi de prédire la répartition géographique théorique d'une espèce(116). Par exemple, en France métropolitaine la répartition de la tique *Ixodes ricinus* est estimée et une carte est disponible (Figure 20).

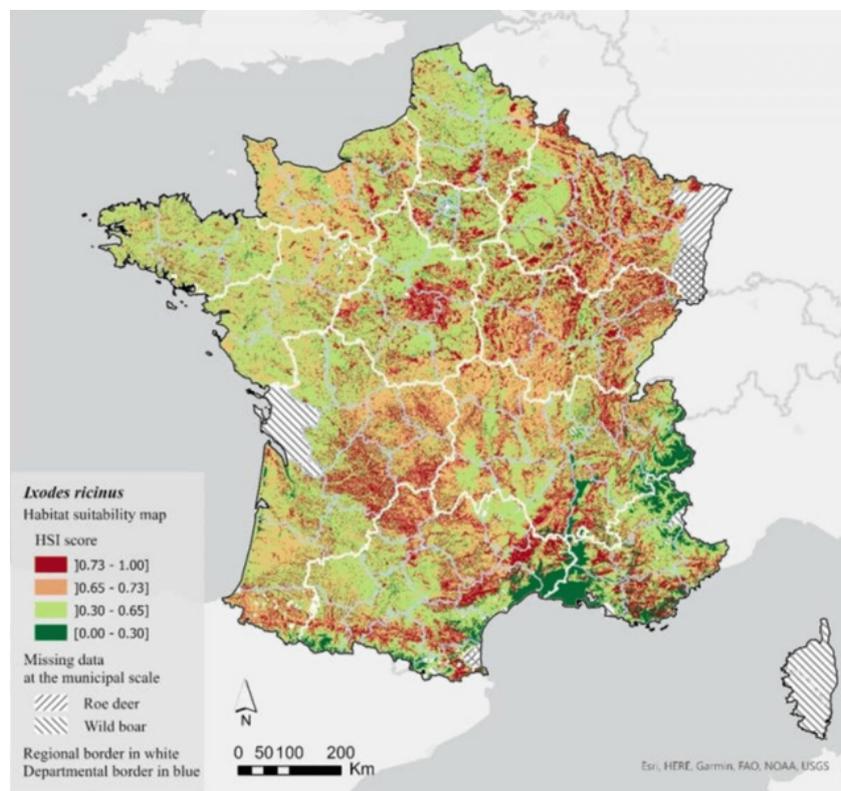


Figure 20 : Carte de score des habitats favorables à la tique *Ixodes ricinus* en France métropolitaine », produite par l'INRAE, Vetagrosup, et l'ANSES 2022, HSI élevé = habitat adéquat pour la tique(117)

La photopériode joue également un rôle important dans le déclenchement des diapauses. Les tiques longuement exposées à la lumière mues plus rapidement que celles exposées à l'obscurité(118). Il est important de noter également qu'en France les tiques sont majoritairement retrouvées à une altitude inférieure à 1500 mètres s'expliquant par une végétation pauvre et une température moyenne basse au-delà de cette altitude.

L'ensemble des adaptations physiologiques des tiques permettent de synchroniser leur activité avec celle de leur hôte et donc d'augmenter la probabilité de rencontre. Cela explique aussi les variations saisonnières, dans les pays tempérés, de tiques actives retrouvées sur le terrain, bien moins nombreuses en hiver et en été (Figure 21) due aux diapauses comportementales permettant de survivre aux températures négatives et à la sécheresse.

Pour un lieu donné, la densité et la répartition dans le temps des tiques varient d'une année sur l'autre et est un témoin fort de l'impact qu'à le climat sur leur activité.

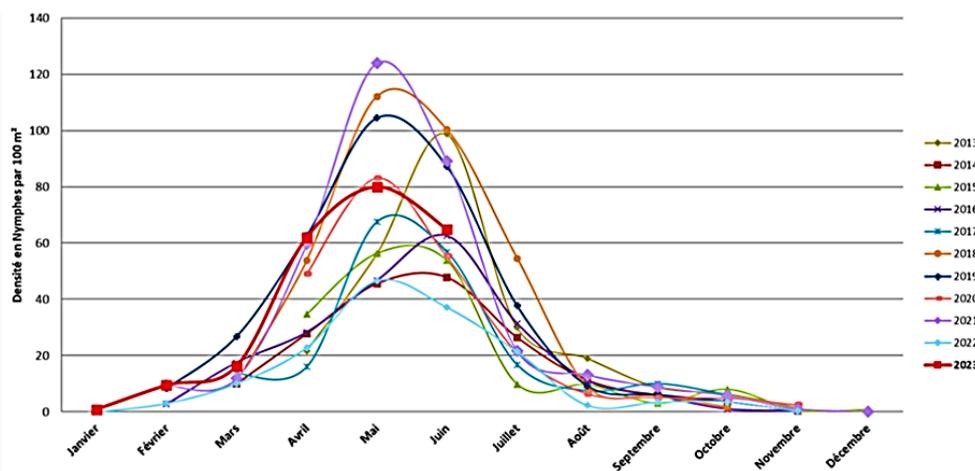


Figure 21 : Densité mensuelle moyenne en nymphes *Ixodes ricinus* en Alsace depuis 2013(119)

1.2.3.2. Le cycle

Le cycle d'*Ixodes ricinus* est exophile, signifiant que l'intégralité de son cycle biologique est réalisée dans des habitats ouverts (bois, prairies...) ou sur l'hôte. Son cycle est dit triphasique, c'est-à-dire que ces tiques ont un repas à chaque stase sur un hôte différent, et télotrope, chacune des stases ayant un tropisme pour un hôte différent. Elles sont également hémimétaboles, les mues sont successives sans stases immobiles et les phases de vie alternent entre des phases « libres » longues de plusieurs mois et « parasitaires » courtes de quelques jours. Cette tique observe une diapause hivernale en zone tempérée et sa période d'activité se situe entre mars et octobre selon les conditions environnementales. Très sensible à la dessiccation, ces individus se retrouvent dans des zones géographiques où l'hygrométrie est importante, notamment dans des zones forestières à feuilles caduques.

L'espérance de vie d'une tique accomplissant son cycle est en moyenne de 3 à 4 ans avec des extrêmes possibles entre 1 et 7 ans selon les conditions climatiques et la réussite dans la recherche d'un hôte. La durée du cycle peut être variable selon l'abondance des hôtes et les diapauses nécessaires à la survie de l'individu. Parmi celles-ci se retrouvent la diapause morphogénétique indispensable pour la métamorphose des stases et la diapause comportementale définie par une absence d'activité lorsque les conditions environnementales sont défavorables.

L'œuf est le premier stade de développement d'une tique en devenir. Il fait partie d'un ensemble d'œufs pondus au sol par une femelle adulte s'étend décrocher de son hôte après son repas sanguin. Au nombre de 1000 à 20 000 selon les espèces et la qualité du gorgement, ces œufs vont éclore en 20 à 50 jours selon les conditions climatiques.

Les larves hexapodes émergentes entrent dans une phase de durcissement qui dure de 3 à 10 jours. Elles ne se déplacent que très peu et se regroupent sous forme de « nids » à l'endroit de ponte de la femelle, elles s'accrochent à un hôte, généralement un petit mammifère comme *Apodemus* ou *Myodes*, lorsque celui-ci passe à proximité et prennent leur repas pendant 3 à 5 jours. Elles absorbent une quantité de sang 100 à 200 fois leur poids avant réplétion(102), puis elles se laissent tomber et entament leur mue.

Après 2 à 8 semaines de transformation, les nymphes octopodes voient le jour (Figure 22), elles se mettent « à l'affût » de mammifères un peu plus grands comme des renards, des lièvres et oiseaux. Le repas sanguin est en moyenne de 5 jours avec une absorption de 20 à 80 fois leur poids initial, puis elles se laissent à leur tour tomber une fois gorgées.



Figure 22 : Mue de larve en nymphe(120)

Après une mue de plusieurs mois, les nymphes se transforment en adultes sexués mâles ou femelles. La reproduction peut se réaliser au sol ou sur l'hôte, la femelle monte sur la végétation et recherche un dernier hôte généralement un grand mammifère, comme les cervidés car la spoliation sanguine est importante avec un repas sanguin d'environ 10 jours. Le mâle, lui, ne prend pas ou peu de repas sanguin, son rôle est centré sur la fécondation de femelles. La femelle, possède deux phases de gorgement, une lente et une rapide après fécondation et elle ne pourra terminer son repas que si elle est fécondée. La femelle tombe au sol et rentre dans sa phase de pré-oviposition le temps de digérer le sang et de mûrir les œufs qui dure entre 3 et 4 semaines. La ponte dure ensuite moins d'un mois, après laquelle la femelle meurt. Le cycle recommence ainsi (Figure 23).

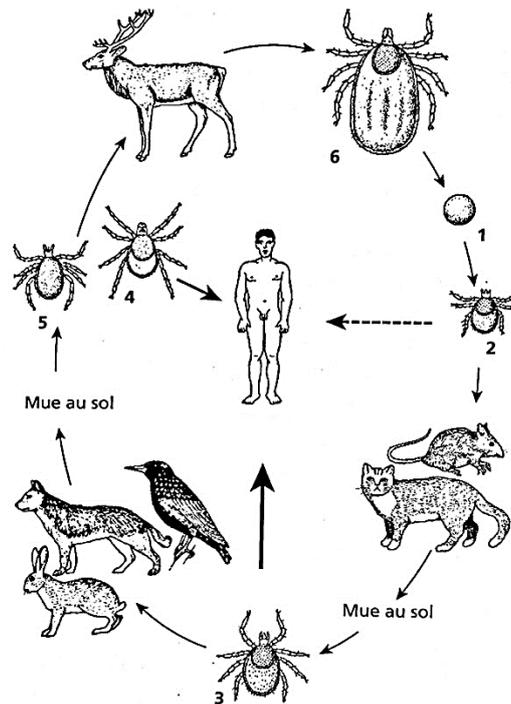


Figure 23 : Cycle de vie d'*Ixodes ricinus*(108)

Le nombre important d'œufs pondus laisse croire qu'une croissance exponentielle du nombre de tique est en cours, cependant les conditions sont rudes et un grand pourcentage d'œufs, de larves, de nymphes et d'adultes n'arrivent pas à maturité. Une étude démontre que sur 16 000 œufs pondus au printemps, 37% atteint le stade larvaire, environ 4% atteint le stade nymphal et seulement 0,4% atteint le stade adulte. La survie est encore moins bonne pour des œufs pondus en automne. De ce fait, environ 250 œufs au printemps et 10 000 en automne sont nécessaires pour obtenir un adulte, ce qui explique que la population de tiques à travers le monde reste globalement stable(114).

I.2.4. Importance médicale et vétérinaire

I.2.4.1. Arachnide hématophage

Les tiques sont des arachnides acariens hématophages et leur capacité vectrice vient essentiellement de cette dernière particularité. En effet, le fait de consommer le sang de plusieurs individus au cours du cycle multiple les risques de rencontrer des germes et de les redistribuer par la suite. De plus, la cavité interne des tiques est un excellent réservoir permettant une multiplication et une dissémination aisées aux différents organes internes. Cette acquisition se fait grâce aux repas sanguins et est primordial, commençant par la recherche d'un hôte grâce aux organes de Haller puis les tiques se fixent ensuite sur des zones cutanées à peau fine et protégées des frottements où elles peuvent se regrouper. Il s'en suit la pénétration du tissu cutané de l'hôte par l'hypostome et les chélicères qui découpent la peau, on parle alors de piqûre et non de morsure car il n'y a qu'un point d'impact correspondant à l'hypostome. La piqûre est dite telmophage car les tissus sont lacérés induisant ainsi un microhématome et une poche de lyse permettant à la tique de se gorger (Figure 24). La production de ciment va ensuite venir conforter l'accroche de la tique.

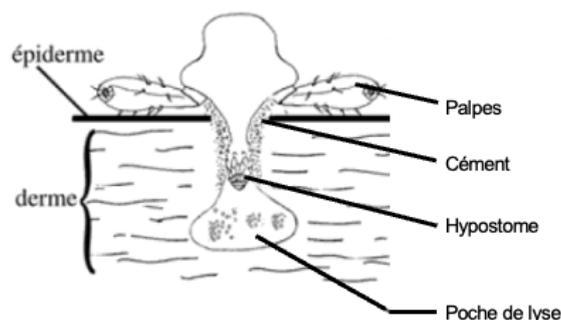


Figure 24 : Schéma d'une piqûre d'*Ixodes* avec poche de lyse permettant le repas sanguin(106)

La réponse inflammatoire de l'hôte va être inhibée par la composition chimique de la salive de la tique ainsi que la cascade de la coagulation et le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces processus vont permettre à la tique de passer inaperçue, de rester en place et ainsi de compléter son repas sanguin sans risque de se décrocher prématurément. A noter cependant qu'une exposition répétée à des piqûres de tiques peut induire la synthèse d'une réponse immunitaire et notamment une synthèse d'anticorps anti-protéine de salive(121).

Le repas sanguin va donc ainsi être réalisé et il existe deux risques directs de la piqûre de tiques pour l'hôte, la première concernant plutôt les animaux et étant liée au phénomène de spoliation sanguine. En effet les tiques femelles prélèvent environ 2 mL par repas et ces arthropodes ont tendance à se regrouper par grappe de plusieurs dizaines d'individus sous l'effet des phéromones de rassemblement multipliant ainsi la quantité de sang prélevée. Cela conduit à un affaiblissement notable de l'animal concerné, en provoquant anémie et diverses maladies liées à la diminution de l'immunité engendré par la spoliation. Le second risque concerne autant les animaux que les Hommes : il s'agit de la paralysie ascendante à tiques. En effet cette maladie est liée à des toxines sécrétées dans la salive d'uniquement certaines espèces de tiques femelles gorgées, probablement d'origine ovarienne. Ces toxines ont pour cible des récepteurs nerveux et entraînent une paralysie ascendante à type de Guillain-Barré pouvant si rien n'est fait atteindre les voies respiratoires et entraîner la mort(122). Les manifestations cliniques touchent préférentiellement les sujets jeunes et le retrait précoce des tiques reste le meilleur traitement.

Mais le risque pour l'Homme et l'animal reste majoritairement infectieux et la phase d'infection pour une tique correspond à la phase de repas, au contact d'un hôte dont le pathogène circule activement au niveau sanguin ou bien lors d'un repas proche d'une tique infectée (*co-feeding*). Une fois infectée, le pathogène circule dans l'intestin de la tique et du fait de la grande promiscuité des organes internes, peut après multiplication locale et par contiguïté se propager dans les glandes salivaires ou encore l'utérus permettant une transmission verticale du pathogène. Par ailleurs, plus une tique se contamine tôt dans son cycle plus elle a de risque d'être co-infectée par d'autres germes lors de repas suivant par phénomène de *co-feeding* (transmission horizontale). Selon les études, la prévalence de tiques co-infectées par au moins deux germes pathogènes pour l'Homme peut s'élever à 30%(123). Les tiques sont donc des vecteurs majeurs d'agents infectieux d'importance médicale et vétérinaire avec un panel de germes variés comprenant des bactéries, des virus et des parasites. Ces pathologies sont majoritairement des zoonoses dont l'Homme est un hôte accidentel et une impasse pour l'agent infectieux.

I.2.4.2. Transmission d'agents infectieux

I.2.4.2.1. Bactéries

Plusieurs bactéries pathogènes peuvent être transmises à l'Homme et l'animal, parmi celles-ci se trouve le groupe des *Borrelia* responsable de la maladie à tiques la plus connue du grand public et la plus importante de l'hémisphère Nord : la borréliose de Lyme. Les bactéries responsables de cette maladie sont un complexe de spirochètes, bactéries spiralées appartenant à l'ordre des *Spirochaetales* et à la famille des *Spirochaetaceae*, et au genre *Borrelia*. Ce genre est ensuite divisé en deux groupes : les *Borrelia* responsable de la borréliose de Lyme et les *Borrelia* impliqués dans les fièvres récurrentes. Actuellement environ 20 espèces de *Borrelia* responsables de borréliose de Lyme sont décrites transmises majoritairement par les tiques du genre *Ixodes*. Parmi celles-ci se trouvent *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis* majoritaires en Europe(124). Leur réservoir animal est vaste comprenant oiseaux, rongeurs et cervidés. Il est important de noter qu'au cours du repas sanguin infectieux, les borrélioses ne sont pas transmises dès le début du repas, car celles-ci se localisent initialement dans l'intestin attachées à l'épithélium via un récepteur et l'afflux sanguin stimule ces borrélioses induisant leur migration vers les glandes salivaires. Le retrait précoce de la tique est donc primordial pour prévenir cette maladie. Par ailleurs, cette bactérie est largement répandue au sein des tiques du genre *Ixodes*, en effet en Limousin, le rapport annuel de l'institut Pasteur de 2005 avait estimé que 12% des nymphes et 22% des adultes étaient porteuses de *B. burgdorferi* sensu lato(125).

Les manifestations cliniques apparaissent 3 à 30 jours après la piqûre, mais un retrait précoce dans les 24-48h réduit grandement les risques d'infection. Elle commence par un érythème migrant (présent dans 60 à 90% des cas) se caractérisant par une lésion érythémateuse indolore au site de piqûre de croissance annulaire et centrifuge. Le deuxième stade correspond à la phase précoce disséminée survenant plusieurs jours à plusieurs semaines après la piqûre pouvant se présenter sous une forme cutanée (multiples érythèmes migrants, lymphocytome borrélien), une forme neurologique (méningoradiculite, paralysie faciale...) et plus rarement une forme articulaire (arthrites), cardiaque ou ophtalmologique. Enfin plusieurs mois voire années après la piqûre et en l'absence de traitement antibiotique survient la phase tardive disséminée avec plusieurs atteintes possibles comme des atteintes articulaires, cutanées (acrodermatite chronique atrophiante) et/ou neurologiques (encéphalomyélites). De plus certains patients présentent un « syndrome post-Lyme », sujet controversé dans la communauté scientifique et en société, composé de symptômes aspécifiques comprenant algies diffuses, asthénie et plaintes cognitives. Cependant, aucune étude scientifique ne permet actuellement d'affirmer un lien entre ces symptômes et une infection à *Borrelia*(100).

Le diagnostic est uniquement clinique à la phase précoce et devient biologique à partir de la deuxième phase avec réalisation de sérologie de dépistage (ELISA, EIA, IFI...) suivi de test de confirmation (Western-Blot) en cas de sérologie de dépistage positive ou douteuse. La réalisation de technique de biologie moléculaire est possible mais réservée aux laboratoires spécialisés. Le traitement d'un adulte en phase primaire repose sur 14 jours de doxycycline (ou amoxicilline), et en phase secondaire et tertiaire précoce sur 14 jours de doxycycline (ou ceftriaxone) pouvant atteindre 21 jours pour les formes de neuroborrélioses tardives, les lymphocytomes borréliens et jusqu'à 28 jours pour les arthrites aiguës et l'acrodermatite chronique atrophiante(126). La meilleure prévention reste, en l'absence de vaccin disponible,

la même que pour toutes pathologies transmises par piqûres de tiques c'est-à-dire la protection individuelle et l'examen minutieux et complet du corps en retour de zone d'endémie.

Les tiques sont également susceptibles de transmettre d'autres *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes et notamment les tiques molles du genre *Ornithodoros*. 16 espèces différentes de *Borrelia* existent dont 11 sont impliquées en pathologie humaine dont *B. miyamotoi* transmis par *Ixodes ricinus*(127). La symptomatologie est une succession de pics fébriles dus à des modifications antigéniques de surface de la bactérie(108) majoritairement de découverte fortuite sur un frottis sanguin.

Parmi les bactéries transmises par les tiques se trouve le genre *Rickettsia*, bactéries à Gram négatif intracellulaires strictes. Ces bactéries sont regroupées en 25 espèces pathogènes réparties en trois groupes : typhus, fièvres pourprées et groupe intermédiaire. Parmi ces bactéries, les plus pathogènes sont *R. rickettsii* responsable de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses transmise majoritairement par le genre *Dermacentor* et *R. conorii* responsable de la fièvre boutonneuse méditerranéenne transmise en grande partie par le genre *Rhipicephalus*. Ces germes interagissent avec les cellules endothéliales augmentant la perméabilité vasculaire responsable des manifestations cliniques(128). Les symptômes sont une escarre d'inoculation au site de piqûre, une fièvre brutale >39°C, des myalgies puis une éruption maculo-papuleuse se généralisant à l'ensemble du corps en moins de 3 jours, épargnant la face. L'évolution est spontanément résolutive, mais 6% des malades contractent des formes sévères mortelles dans 30% des cas. Un cas particulier de rickettsiose a été décrit dans les années 90 en Europe dû à l'espèce *R. slovaca* provoquant le syndrome escarre-ganglion appelé également TIBOLA (Tick-Borne Lymphadenopathy). La symptomatologie comprend une escarre au point d'inoculation, généralement dans le cuir chevelu (endroit préférentiel de piqûre des tiques du genre *Dermacentor*) accompagné d'adénopathies cervicales douloureuses parfois associé à un syndrome pseudo-grippal. Cette pathologie est spontanément résolutive mais un traitement par doxycycline ou macrolides peut diminuer la durée de la symptomatologie. A noter qu'une asthénie et une alopecie séquellaire au point de piqûre est possible(129).

Différentes espèces du genre *Anaplasma* peuvent également être transmises. Il s'agit de bactéries endocellulaires des cellules sanguines dont la seule espèce zoonotique est *A. phagocytophilum* responsable de l'anaplasmose granulocytaire humaine. Ce germe cosmopolite est transmis par un grand nombre d'espèces de tiques, avec des prévalences pouvant atteindre 20% de tiques infectées en Europe. Cette bactérie infecte les leucocytes et provoque après 1 à 3 semaines d'incubation un syndrome pseudo-grippal, avec de rares cas de formes sévères multiviscérales et une mortalité inférieure à 1%(130).

Enfin d'autres bactéries peuvent également être transmises par piqûres de tiques provoquant des tableaux cliniques variés. C'est le cas de l'ehrlichiose provoquée par *Ehrlichia chaffeensis*, un bacille Gram négatif retrouvé sous forme de morula dans les monocytes et les macrophages se manifestant par un tableau pseudo-grippal avec atteintes neurologiques et un rash et une mortalité pouvant atteindre 3%(131). En 2010, un premier cas humain d'infection par *Neoehrlichia mikurensis* a été identifié(132). Cette infection peut être asymptomatique ou provoquer une fièvre supérieure à 40°C, une arthromyalgie et des frissons pouvant se compliquer de thromboses veineuses profondes chez les patients immunodéprimés (notamment ceux souffrant d'une malignité à cellules B). La neoehrlichiose est diagnostiquée par biologie moléculaire et un traitement précoce par doxycycline est efficace.

Francisella tularensis est une bactérie intracellulaire facultative à Gram négatif très virulente et de transmission par contact direct avec des animaux infectés, par piqûres d'arthropodes et par inhalation d'aérosols. Cette bactérie très présente dans l'hémisphère Nord peut être transmise par les tiques du genre *Dermacentor* et *Ixodes* et est l'agent responsable de la tularémie. Le début de la manifestation clinique est brutal survenant 2 à 4 jours après le contact avec hyperthermie, prostration sévère, asthénie sévère et l'apparition en 24-48h d'une papule inflammatoire au point d'inoculation. De rares cas de pneumopathie atypique ont été décrits. La prise en charge repose sur l'administration de streptomycine, avec une mortalité quasi nulle dans les cas traités mais pouvant atteindre plus de 30% dans les cas non traités. Enfin dans une moindre mesure, les tiques peuvent également transmettre des germes tel que *Coxiella burnetii* agent de la Fièvre Q et certaines bartonelles(108).

I.2.4.2.2. Virus

Certains virus sont également transmis par la piqûre de tique et on retrouve classiquement trois grandes familles : les *Bunyaviridae*, les *Flaviviridae*, et les *Reoviridae*(133).

Dans la famille des *Bunyaviridae* se trouve le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo du genre *Nairovirus* transmis par les genres de tiques dures *Hyalomma*, *Dermacentor* et *Rhipicephalus*. Ce virus se retrouve en Afrique, en Europe et en Asie de l'Ouest mais est absent du Nouveau Monde. Il circule dans plusieurs hôtes mais seul l'Homme développe la maladie se caractérisant par un accès fébrile pouvant conduire à un syndrome hémorragique mortel dans 50% des cas(134). On retrouve également dans cette famille un *Phlebovirus* nommé Huaiyangshan virus avec une mortalité de 30%(108).

La famille des *Flaviviridae* est la plus grande et est transmise majoritairement par des tiques du genre *Ixodes*. Il est possible de distinguer deux grands sous-types : les flavivirus avec manifestations encéphalitiques comme le virus de l'encéphalite à tiques décrit précédemment, le virus Powassan et le virus Louping ill. Ces deux derniers virus ont une symptomatologie proche du virus de l'encéphalite à tiques et une mortalité pouvant atteindre 60% pour le virus Powassan(133). Le second sous-type correspond aux flavivirus avec manifestations hémorragiques. Il regroupe le virus de la fièvre hémorragique d'Osmk et le virus de la forêt de Kyasanur. Les symptômes sont similaires pour ces deux virus et incluent fièvre, maux de tête, myalgies, pétéchies, signes méningés et trouble de l'hémostase primaire (épistaxis, saignements des gencives...) avec une mortalité comprise entre 0,5 et 10%(135).

Enfin la famille des *Reoviridae* comprend un *Coltivirus* responsable de la fièvre du Colorado, deuxième arbovirose la plus importante aux Etats-Unis du Nord après le West-Nile virus. Ce virus transmis par la tique du genre *Dermacentor* provoque fièvre, lymphadénopathies et méningisme avec possibilité de fièvres récurrentes(136).

Il existe cependant un dernier virus d'intérêt cette fois-ci exclusivement vétérinaire et économique transmis par une tique molle du genre *Ornithodoros* capable de décimer des troupeaux de suidés(137). Il s'agit du virus du genre *Asfivirus*, seul représentant de la famille des *Asfiviridae* responsable de la peste porcine africaine endémique en Afrique subsaharienne et en Sardaigne. Ce virus présente une forte spécificité pour les cellules porcines et la clinique se présente sous la forme d'une hémorragie fébrile. Le risque de dissémination en Europe est élevé du fait des échanges commerciaux de bétails.

I.2.4.2.3. Parasites

Les tiques sont susceptibles de transmettre des helminthes et des protozoaires. En effet la tique *Ixodes ricinus* est capable de transmettre un nématode *Cercopithifilaria rugosicauda* chez les cervidés(138). Cependant la transmission à l'Homme n'est pas clairement établie.

Les *Ixodidae* peuvent également transmettre à la fois à l'Homme et l'animal des parasites sanguins obligatoires du genre *Babesia* dont les deux espèces majoritaires sont *B. microti* et *B. divergens*. Cette transmission se réalise après quelques jours de repas sanguin car les parasites ont besoin de mûrir dans les glandes salivaires. Chez l'Homme, ce parasite est faiblement pathogène exceptés chez les sujets immunodéprimés avec une mortalité pouvant atteindre 40%(108). Chez l'animal ce parasite provoque la piroplasmose avec des symptômes caractéristiques associant anémie, anorexie, apathie et fièvre.

Les animaux sauvages et domestiques sont également exposés au risque de théiloriose et d'hépatozoonose provoquées par des parasites du genre *Theileria* et *Hepatozoon* respectivement. Le premier provoque une multiplication incontrôlée des lymphocytes B et T quand le second envahit la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Les tiques dures du genre *Ixodes* ne semblent cependant pas être vecteur de ces parasites(108).

II. Objectifs et déroulé de l'étude expérimentale

Devant le constat de l'augmentation du nombre de cas en France d'encéphalite à tiques selon un gradient Est-Ouest, et la forte présence du vecteur *Ixodes ricinus* en Limousin, nous nous sommes interrogés sur l'éventuelle présence du TBEV dans cette région. Nous avons décidé de coupler deux stratégies afin d'optimiser la probabilité de détecter le TBEV en Limousin.

La première phase du projet (projet VITAL) porte sur le screening sérologique (Figure 25). Elle a été promue et soutenue par le CHU de Limoges au premier trimestre 2023. L'objectif est de réaliser une sérologie TBEV chez des patients ayant consulté au CHU de Limoges et ayant bénéficié d'une sérologie de Lyme. Le choix de ce profil de patient a été arrêté pour cibler une population potentiellement plus exposée au risque.

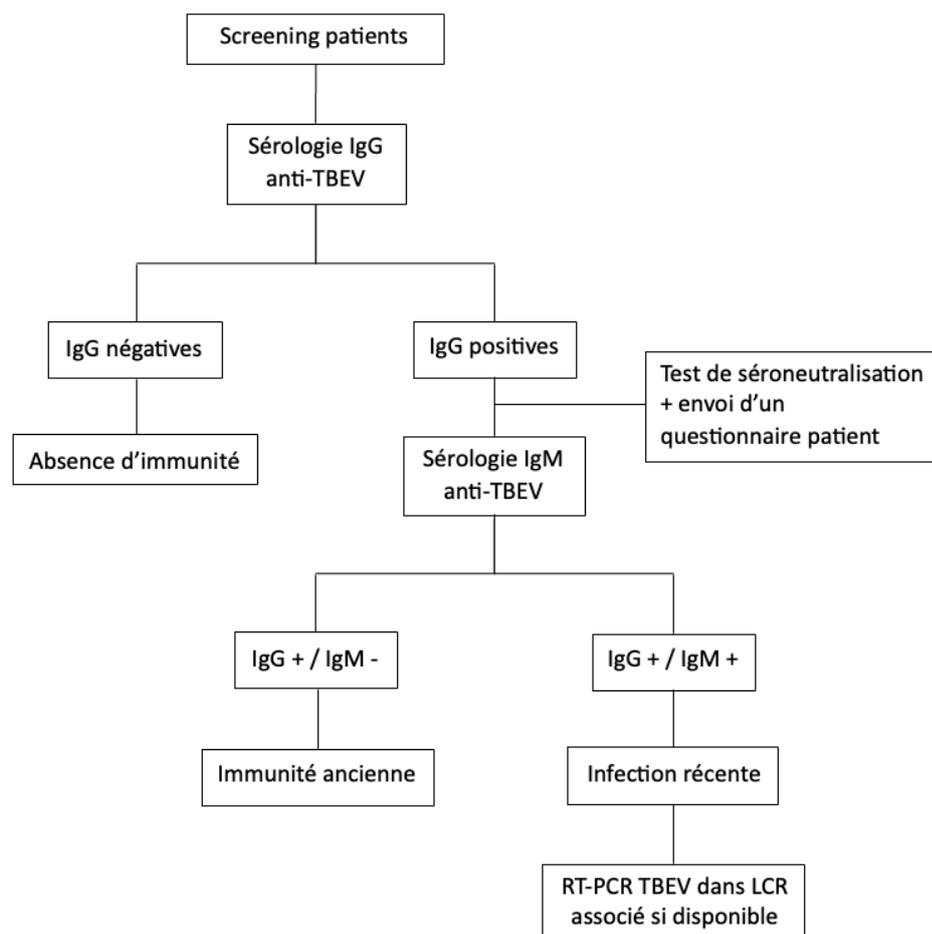


Figure 25 : Organigramme de la sérologie anti-TBEV

La deuxième phase du projet est l'étude de « terrain » consistant à récolter et identifier les tiques présentes en région Limousin et à effectuer ensuite un « screening » par biologie moléculaire de la présence d'ARN de TBEV et d'ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. La détection du virus serait un argument fort en faveur de l'émergence du virus dans la région et viendrait confirmer le gradient Est-Ouest de présence du pathogène initié à partir de l'Europe centrale. La surveillance des tiques sur un territoire fait désormais partie des missions de santé publique indispensable pour prévenir l'émergence de maladies vectorielles.

III. Matériels et Méthodes

I. Dépistage sérologique TBEV

I.1. Échantillons de l'étude

Cette étude inclut 880 échantillons (Figure 26) de sérums prélevés sur tube sec (avec ou sans gel séparateur) entre janvier 2020 et janvier 2023 dans les services de soins suivants : médecine interne, polyclinique médicale, pédiatrie, rhumatologie, maladies infectieuses, neurologie, neurochirurgie et unité de soins intensifs neurovasculaires, dermatologie, urgences pédiatriques et adultes. Les volumes disponibles sont variables étant donné que ce sont des reliquats de prélèvement dans le cadre du soin pour la réalisation d'une sérologie Lyme. Ces échantillons sont conservés en biothèque, à -20°C, au CRBioLIM du Centre de Biologie et de Recherche en Santé du CHU de Limoges. Ils ont été analysés en août 2023. Cette recherche a été validée par le comité de protection des personnes ainsi qu'un comité d'éthique, et soutenue et promue par le CHU de Limoges. Les patients dont la sérologie s'est révélée positive ont été contactés par courrier pour compléter un questionnaire de recueil d'informations.

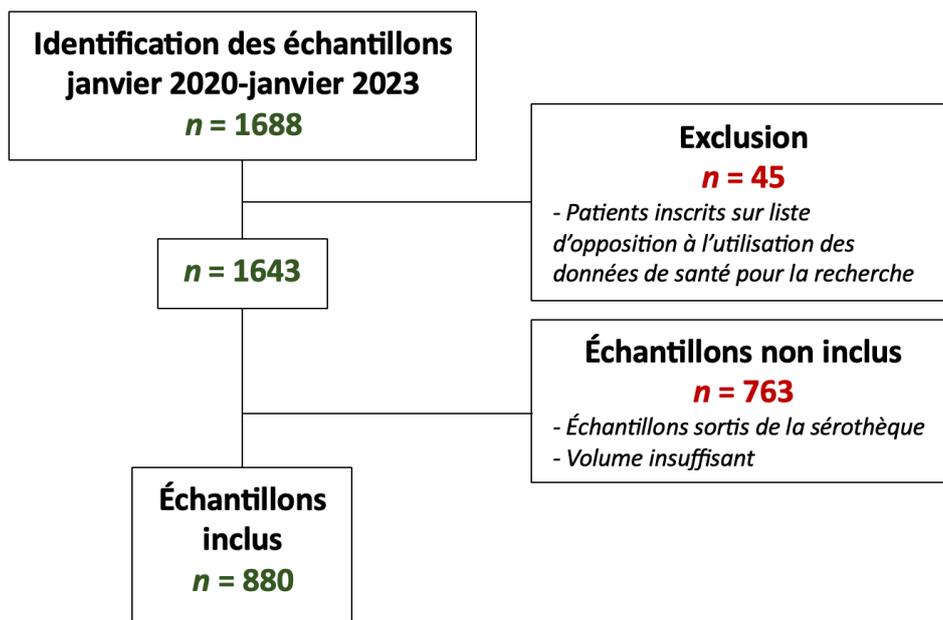


Figure 26 : Échantillons inclus dans le protocole VITAL

I.2. Tests sérologiques

I.2.1. Trousse de dépistage

Le dosage qualitatif et quantitatif des IgG et IgM anti-TBEV ont été réalisés avec les trousse SERION ELISA *classic* FSME/TBE Virus IgG et IgM® du fabricant VIRION. Il s'agit d'un test ELISA basé sur l'interaction spécifique anticorps-antigènes. Les puits de la microplaque sont coâtés d'une préparation de protéine d'enveloppe E de souche Moscow B4. Pendant un temps d'incubation de soixante minutes les anticorps contenus dans l'échantillon du sérum du patient se lient à l'antigène coâté puis un anticorps secondaire préalablement

conjugué avec l'enzyme phosphatase alcaline est ajouté et se lie au complexe immun. Après chaque étape d'incubation, l'excédent de matériel non lié est éliminé par des cycles de lavage. Enfin l'ajout d'un substrat incolore, le p-nitrophénylphosphate est ensuite transformé en produit coloré, le p-nitrophénol. L'intensité du signal de ce produit de réaction est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon et est mesurée par une méthode photométrique. Une densité optique est ainsi mesurée et convertie en UI/mL. La sensibilité du test est >99% pour les IgM et les IgG, la spécificité pour les IgM et les IgG est >99% et de 96,1%, respectivement. Il existe tout de même des réactions croisées avec les autres flavivirus (dengue, fièvre jaune...), mais aucune interférence n'a été détectée avec des sérums lactescents, hémolysés et ictériques. Les limites de quantification se situent entre 30 et 3000 UI/mL pour les IgG et 5 et 150 UI/mL pour les IgM. Le seuil de positivité des IgG est > 150 UI/mL, le seuil de négativité est < 100 UI/mL. Les valeurs comprises entre les deux précédentes sont considérées douteuses. Concernant les IgM, le seuil de positivité est >15 UI/mL, le seuil de négativité est < 10 UI/mL et les valeurs comprises entre les deux précédentes sont douteuses.

Tous les échantillons ont été testés à l'aide de la trousse SERION ELISA *classic* TBE Virus IgG (Institut Virion/Serion GmbH, Würzburg, Allemagne). Les dosages ont été réalisés conformément aux données du fabricant (annexe 4), de même pour l'interprétation des résultats. L'ensemble des échantillons ont été testés pour la recherche d'IgG anti-TBEV et chaque échantillon positif ou équivoque a été retesté après une centrifugation 10 minutes à 3000 tours/minutes pour les équivoques permettant de confirmer le résultat de la sérologie. Tous les échantillons positifs et équivoques ont ensuite été testés pour la recherche d'IgM anti-TBEV avec la trousse SERION ELISA *classic* TBE Virus IgM (Institut Virion/Serion GmbH, Würzburg, Allemagne).

I.2.2. Test de confirmation des échantillons positifs

Pour exclure une éventuelle réaction croisée, les sérums positifs en IgG et/ou IgM sont envoyés au centre national de référence des arbovirus à Marseille pour un test de confirmation. La technique permettant d'affirmer ou d'infirmer la spécificité des IgM repose sur un MAC-ELISA, une immunocapture des IgM couplé à un dosage immunoenzymatique (annexe 5) tandis que les IgG sont confirmées par séroneutralisation grâce à la technique de microneutralisation spécifique du virus (MNT).

I.3. Facteurs de risques

Les patients avec une sérologie positive et équivoque ont été contactés soit par courrier postal soit par appel téléphonique 1 mois après l'envoi du courrier en cas de non-réponse pour établir un profil épidémiologique via un questionnaire (Annexe 6) et une note d'information (Annexe 7). Le but était de récolter les principaux risques d'expositions au TBEV comme des antécédents de piqûres de tiques, les voyages récents ou passés en zone de forte endémie et de déceler de potentielles sources de réaction croisée tels les antécédents de vaccinations ou d'infection vis-à-vis d'autres flavivirus.

II. Prévalence du TBEV et de *B. burgdorferi* sensu lato dans le vecteur

II.1. Échantillonnage des tiques

II.1.1. Récolte sur sites ciblés

Des tiques à l'affût ont été dragués par la méthode du drapeau qui consiste à tirer un tissu éponge d'1m² sur la végétation. Tous les dix mètres, le tissu est retourné et les tiques en quête de nourriture sont capturées et transférées dans un tube à l'aide d'une pince fine. Cette méthode répétée 30 fois permet de définir une densité en tiques au 100m². Cette méthode capture majoritairement des nymphes, du fait de leur plus grande densité sur la végétation basse. Cette récolte a été réalisée en collaboration avec le CNR Borrelia de Strasbourg en avril, mai et juillet 2023. Les tiques ainsi collectées ont été triées par genre et par stases avant d'être congelées à -80°C et envoyées au CNR Borrelia. Les sites de récoltes sélectionnés sont identiques à ceux de l'étude réalisée par l'Institut Pasteur (ancien CNR Borrelia) en 2005(139) et concernent trois localités en région Limousin, le point 1 (N 46.030810 E 1.285284), le point 2 (N 46.007978 E 1.293249) et le point 3 (N 45.998325 E 1.415457)(Figure 27).

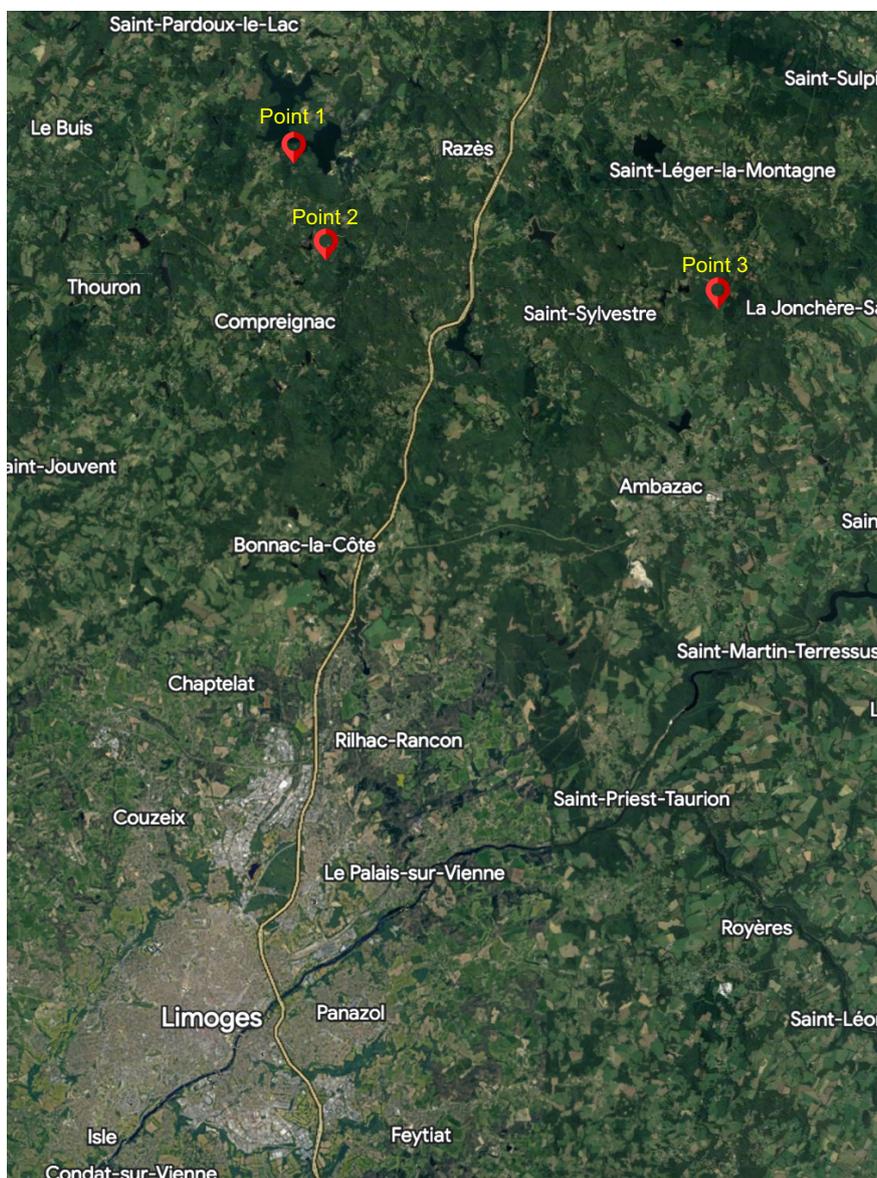


Figure 27 : Points de collecte de tiques du CNR Borrelia en 2005, prélevés à nouveau en 2023

II.1.2. Collecte sur la base du volontariat

Dans le but de diversifier les lieux de provenance des tiques, une stratégie basée sur le volontariat a été mise en place. D'une part, des centres équestres de la région ont été contactés et six centres répartis à travers la région ont accepté de participer et ont donc chacun reçu trois tubes à fond conique contenant 25 mL d'une solution d'éthanol à 70%. La récolte se faisait donc directement par les cavaliers sur les chevaux après les sorties et pendant les toilettes. De plus, au sein du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène et du Centre de Prélèvement du CHU de Limoges, le personnel volontaire a également reçu un tube à fond conique contenant 25 mL d'une solution d'éthanol à 70%. L'objectif était de récolter tous les spécimens rencontrés sur l'Homme ou sur les animaux de compagnie et de les déposer dans cette solution. Les tubes ont été conservés au domicile de chacun, à l'abri de la lumière et à température ambiante entre septembre 2022 et août 2023. Chaque tube plein a été ramené au laboratoire et un nouveau tube a été fourni. Les tiques ainsi collectées ont ensuite été identifiées jusqu'au genre par observation macroscopique, séchées, et stockées à -80°C en attente des analyses ultérieures. Cette approche a permis de couvrir des points variés de la région Limousin (Figure 28) et de récolter en grande majorité des tiques adultes plus fréquemment rencontrés sur les grands mammifères et les animaux de compagnies. Certaines zones n'ont pas été exploitées lors des analyses du fait d'un nombre insuffisant de tiques adultes non gorgées.

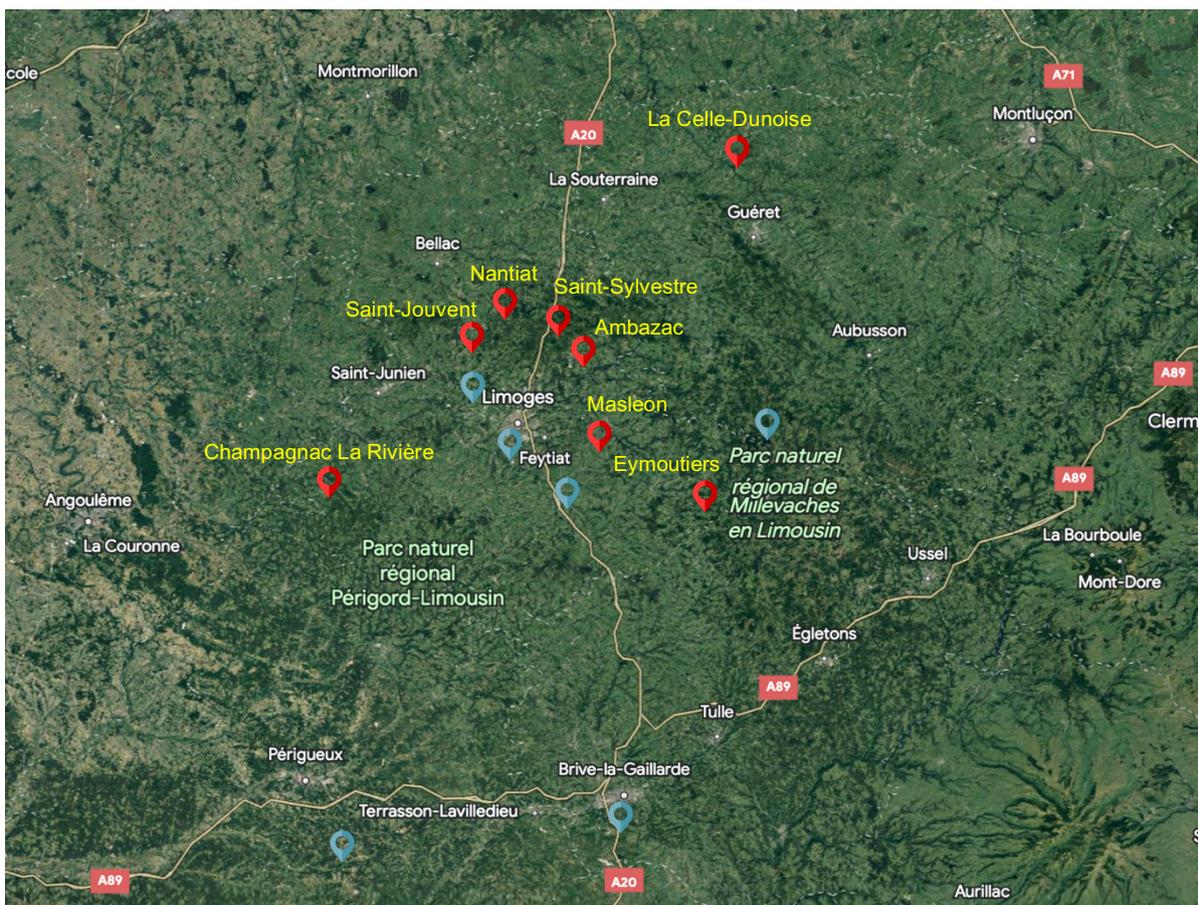


Figure 28 : Points de récolte de tiques exploités (flèches rouges) et non exploités (flèche bleus) basés sur le volontariat

II.2. Extraction d'acides nucléiques totaux

Nous décrivons ici la stratégie déployée concernant les tiques adultes non gorgées récoltées sur la base du volontariat. Les tiques échantillonnées par la méthode du drapeau ont été envoyées au CNR Borrelia pour analyse ultérieure.

La complexité de l'extraction réside dans la balance entre le fait de lyser correctement le vecteur et la nécessité de conserver des acides nucléiques exploitables par biologie moléculaire. Plusieurs approches ont été expérimentées sur tiques seules tout d'abord, combinant une lyse mécanique, enzymatique et chimique avant d'optimiser le protocole sur des pools de 5 adultes du même genre et de la même localisation géographique. Chaque lyse a été réalisée dans des micro-tubes à fond conique adaptés à la biologie moléculaire.

La première approche a été de coupler l'action de la protéinase K avec une lyse mécanique par micro-billes céramiques. La tique adulte a donc ainsi été incubée à 56°C pendant 60 minutes dans la solution tampon contenant de la protéinase K à 10% du volume total avant de subir deux passages consécutifs dans le *Fast-Prep-24TM Classic* (Thermo-Fischer Scientific) pendant 60 secondes à une vitesse de 6,5 m/s. Une approche similaire a été réalisée avec 17 heures d'incubation dans la protéinase K. Par la suite, une nouvelle approche visant à augmenter la part de lyse mécanique a été expérimentée. La tique a ainsi été broyée dans le *Fast-Prep[®]* pendant 5 minutes à l'aide de micro-billes de céramiques et après l'action de la protéinase K pendant 60 minutes.

La paroi des tiques étant riche en chitine tout comme les champignons, une méthode d'extraction d'acides nucléiques par l'action de différents détergents décrit dans le protocole Provost et al.(140) à l'unité de mycologie de l'institut Pasteur a été testée. Cependant la nécessité de laisser incuber les tiques pendant 30 minutes à 100°C n'était pas compatible avec le besoin de sauvegarder l'intégrité des acides nucléiques. Enfin, les micro-billes de céramiques ont été remplacés par des billes de 3 mm de diamètre en acier inoxydable capable à haute vitesse de découper la tique sans endommager le matériel génétique.

La méthode retenue est donc la suivante : à chaque pool de 5 tiques, 425µL d'H₂O « Nuclease-Free », 25µL de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) 10%, 50µL de tampon Tris 1M et deux billes en acier inoxydable sont ajoutés avant homogénéisation pendant trois minutes à une vitesse de 4m/s au *Fast-Prep-24TM Classic* (Thermo-Fischer Scientific). Le lysat est ensuite centrifugé à 20 000 tours par minutes pendant 5 minutes. 500µL de surnageant sont ensuite transférés dans 2 mL de tampon de lyse *NucliSENS[®] EasyMAG Lysis Buffer* contenant du thiocyanate de guanidine et incubé 10 minutes à température ambiante (Annexe 8). Enfin 100µL de billes de silices magnétiques *NucliSENS[®] EasyMAG Magnetic Silica* sont ajoutées et permettent de capturer les acides nucléiques (ADN et ARN) du milieu. L'extraction est ensuite réalisée sur l'automate *NucliSENS[®] Easymag* selon le protocole du fabricant, avec un volume d'éluat final de 50µL.

Chaque éluat est ensuite dosé en ADN et en ARN par quantification fluorométrique *Qubit[®]* (Thermo-Fischer Scientific) en suivant les recommandations du fabricant avec les kits *Qubit 1X dsDNA HS Assay kit* et *Qubit RNA HS Assay kit* respectivement. Les limites de quantification sont comprises entre 5 pg/µL et 120 ng/µL pour le kit ADN et entre 0,2 ng/µL et 200 ng/µL pour le kit ARN. Si besoin, les éluats sont dilués au dixième pour cette quantification. Chaque éluat est ensuite conservée à -80°C avant amplification génique.

II.3. Amplification de l'ARN16S ribosomal d'*Ixodes ricinus*

Dans le but de valider l'extraction des différents pools de tiques, une RT-PCR en temps réel développée par Schwaiger et Cassinotti(141) ciblant l'ARN 16S ribosomal d'*Ixodes ricinus* a été adaptée et réalisée. Le mélange réactionnel (Tableau 2) d'un volume de 20 µL est mélangé à 5 µL de l'échantillon à tester, préalablement dilué au centième pour un volume final de 25µL. Le témoin positif 16S rRNA *Ixodes ricinus* utilisé est un éluat positif en PCR dilué au millièrme, mis en évidence lors de la mise au point du protocole d'extraction.

Tableau 2 : Mix de la RT-PCR en temps réel 16S rRNA *Ixodes ricinus* (pour un essai)

Réactifs	Volume	Concentration finale
Superscript III RT/Platinum Taq® Mix (Thermo-Fischer Scientific)	0,5 µL	/
2X reaction mix	12,5 µL	1X
RNasout (40U/µL)	0,5 µL	20 U
MgSO ₄ (5mM)	1 µL	0,2 mM
H ₂ O nuclease-free	3,25 µL	/
Amorce F 10 µM 5'-AAA AAA ATA CTC TAG GGA TAA CAG CGT AA-3'	1 µL	0,4 µM
Amorce R 10 µM 5'-ACC AAA AAA GAA TCC TAA TCC AAC A-3'	1 µL	0,4 µM
Sonde 10 µM 5'-FAM TTT TGG ATA GTT CAT ATA GAT AAA ATA GTT TGC GAC CTC G TAMRA-3'	0,25 µL	0,1 µM

La reverse transcription et l'amplification sont réalisées sur le thermocycleur CFX96 *Touch Real-Time PCR*® (Bio-Rad) selon le protocole suivant : reverse transcription à 37°C pendant 30 minutes, incubation à 95°C pendant 10 minutes (inactivation de la RT, activation de la Taq), puis 45 cycles d'amplification (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 60 secondes). La lecture de la fluorescence du reporter FAM est réalisée à la fin de chaque cycle d'amplification.

II.4. Amplification du TBEV

La mise en évidence de l'ARN du virus de l'encéphalite à tiques est réalisée par amplification d'une région non codante en 3' du génome viral commune aux trois principales souches par RT-PCR en temps réel. Cette méthode se base sur le protocole décrit par Schwaiger et Cassinotti(141) en 2003. Le mélange réactionnel (Tableau 3) est mélangé à 5µL de l'échantillon à tester, préalablement dilué au centième pour un volume final de 25µL. Le témoin positif TBEV correspond à 5 µL d'un extrait de la souche autrichienne Neudoerfl fourni

par le professeur Gerhard Dobler (Institut de microbiologie de l'armée fédérale, Munich, Allemagne)

Tableau 3 : Mix de la RT-PCR en temps réel TBEV (pour un essai)

Réactifs	Volume	Concentration finale
Superscript III RT/Platinum Taq® Mix (Thermo-Fischer Scientific)	0,5 µL	/
2X reaction mix	12,5 µL	1X
RNasout (40U/µL)	0,5 µL	20 U
MgSO ₄ (5mM)	1 µL	0,2 mM
H ₂ O nuclease-free	3,25 µL	/
Amorce F 10 µM 5'-GGG CGG TTC TTG TTC TCC-3'	1 µL	0,4 µM
Amorce R 10 µM 5'-ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT-3'	1 µL	0,4 µM
Sonde 10 µM 5'-FAM TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA TAMRA-3'	0,25 µL	0,1 µM

La reverse transcription et l'amplification sont réalisées sur le thermocycleur *CFX96 Touch Real-Time PCR®* (Bio-Rad) selon le protocole suivant : reverse transcription à 37°C pendant 30 minutes, incubation à 95°C pendant 10 minutes (inactivation de la RT, activation de la Taq), puis 45 cycles d'amplification (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 60 secondes). La lecture de la fluorescence du reporter FAM est réalisée à la fin de chaque cycle d'amplification.

II.5. Amplification de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

La mise en évidence du complexe de bactéries *Borrelia burgdorferi* sensu lato a été réalisé par amplification du gène de la flagelline *flaB* selon le protocole fourni par le CNR *Borrelia* de Strasbourg et adapté au thermocycleur présent au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges. Le mélange réactionnel (Tableau 4) est mélangé avec 5µL d'échantillon à tester, préalablement dilué au centième pour un volume final de 20µL. Le témoin positif est soit un extrait de *Borrelia garinii*, soit un extrait de *B. afzelii*, soit un extrait de *B. burgdorferi* sensu stricto fournis par le laboratoire du CNR *Borrelia* de Strasbourg et dilués au centième. Le pourcentage de GC du génome de *Borrelia* est de 28,6%.

Tableau 4 : Mix de la PCR en temps réel *Borrelia burgdorferi* sensu lato (pour un essai)

Réactifs	Volume	Concentration finale
Fast-Start (1a+1b) (Roche Diagnostics)	2 µL	/
H ₂ O nuclease-free	7,4 µL	/
MgCl ₂ (25mM)	1,6 µL	2 mM
Amorce flaBbsl 2a 20 µM 5'-TCT TGG ACI TTA AGA GTT CA-3'	0,5 µL	0,5 µM
Amorce flaBbsl 4c 20 µM 5'-GAA TTA ACT CCA CCT TGA GIA GG-3'	0,5 µL	0,5 µM
Sonde flaBbslSDTQ 2 µM 5'-FAM CAA GAT GAA GC TAMRA-3'	2 µL	0,2 µM
Sonde Garval 2 µM 5'-FAM CAA GAT GAG GC TAMRA-3'	1 µL	0,1 µM

Le protocole d'amplification est réalisé sur le thermocycleur *CFX96 Touch Real-Time PCR*® (Bio-Rad) selon le protocole suivant : activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 10 minutes avec un taux de transition de température de 4,40°C/s, puis 55 cycles d'amplification comprenant 10 secondes de dénaturation à 95°C avec un taux de transition de température de 4,40°C/s, une hybridation et élongation à 53°C de 45 secondes avec un taux de transition de température de 2,20°C/s et une phase de refroidissement à 40°C pendant 30 secondes avec un taux de transition de température de 1,50°C/s. La lecture de la fluorescence du reporter FAM est réalisée à la fin de chaque cycle d'amplification.

II.6. Analyses statistiques

II.6.1. Tests sérologiques

Concernant la sérologie anti-TBEV, le calcul de la taille de l'étude a été validé en accord avec le Centre des Données Cliniques et de Recherche du CHU de Limoges.

Du fait de l'absence de description de l'agent infectieux dans la région Limousin à ce jour, le calcul du nombre de sujets à inclure repose sur l'estimation du nombre de sujets nécessaires pour affirmer l'absence du pathogène avec une précision suffisante (inférieure à 1%). L'analyse de 921 sérums permettrait d'affirmer que la proportion du pathogène est inférieure à 0,4% au risque alpha 5% (calcul réalisé avec Nquery Advisor 7.0). Cette valeur est obtenue par calcul vectoriel.

Les comparaisons de moyennes entre groupes de sujets seront réalisées par des tests t de Student ou des analyses de variance. Le seuil de significativité choisi pour l'ensemble des analyses statistiques est de 0,05. Les tests statistiques ont été réalisés sur BiostaTGV® et Graphpad/PRISM®.

II.6.2. Biologie moléculaire

En supposant une prévalence du TBEV chez les tiques inférieure à 0,1 % dans les régions endémiques de France, les tiques ont été poolées par cinq et la prévalence chez ces individus a été exprimée comme le taux d'infection minimum (MIR), en supposant qu'une seule tique était positive au sein d'un pool positif. Le MIR est donc calculé par le nombre total de tiques testées divisé par le nombre de pools positifs. Cependant pour affirmer l'absence du pathogène avec une précision inférieure à 1%, l'analyse de 3688 tiques permettrait d'affirmer que la prévalence du virus dans les tiques en Limousin est inférieure à 0,1% au risque alpha 5% (calcul réalisé avec Nquery Advisor 7.0).

IV. Résultats

I. Dépistage sérologique TBEV

I.1. Données sérologiques des patients inclus

Parmi les 880 échantillons inclus, 51,6% (454/880) sont des hommes avec une moyenne d'âge de 53,3 ans. Les enfants représentent 5,7% (49/880) de la population étudiée. Une sérologie TBEV est positive en IgG chez 2,61% (23/880) et équivoque chez 0,57% (5/880) des patients inclus. Parmi les échantillons négatifs en sérologie TBEV, 7,16% (61/852) présentent des IgG dirigés contre *Borrelia burgdorferi* sensu lato, parmi lesquelles 14,75% (9/61) sont positifs en IgM (confirmés par Western-Blot) témoignant d'une infection récente.

I.2. Données sérologiques des cas positifs et équivoques

La valeur moyenne en UI/mL des échantillons ayant une sérologie TBEV positive en IgG est de 1144 ± 1291 . Par ailleurs, les échantillons positifs et équivoques sont tous négatifs pour la recherche d'IgM. Concernant la sérologie Lyme, 7,1% (2/28) ont un profil compatible avec une infection ancienne et deux autres patients ont un profil compatible avec une neuroborréliose avec une synthèse intrathécale positive pour l'un et équivoque pour l'autre. La séroneutralisation des IgG met en évidence la présence d'anticorps neutralisants le TBEV chez 78,6% (22/28) des patients avec des titres moyens allant de 20 à 20480 (Tableau 5).

Tableau 5 : Données sérologiques Lyme/TBEV des patients positifs et équivoques en IgG TBEV

Patient	Sérologie Lyme	Sérologie TBEV (en UI/mL)	Séro-neutralisation IgG (titre moyen)
0109LR	Négative	IgG (3895) IgM (-)	10880
0307DR	Négative	IgG (188) IgM (-)	Négatif
0323MN	Négative	IgG (4519) IgM (-)	1920
0383CA	Négative	IgG (1126) IgM (-)	60
0416CA	Négative	IgG (255) IgM (-)	Ininterprétable
0425LT	Négative	IgG (497) IgM (-)	240
0585BP	Négative	IgG (148) IgM (-)	2560
0606DA	Négative	IgG (420) IgM (-)	120
0611NP	Négative	IgG (1792) IgM (-)	120
0628LM	IgG+ / IgM -	IgG (224) IgM (-)	480
0665MM	Négative	IgG (1832) IgM (-)	1920
0728WM	Négative	IgG (797) IgM (-)	1280
0737MC	Négative	IgG (212) IgM (-)	10240
0744FC	Négative	IgG (112) IgM (-)	320
0833RJ	Négative	IgG (120) IgM (-)	1920
0838AN	Négative	IgG (3157) IgM (-)	7680
0851PO	Synthèse intrathécale équivoque	IgG (125) IgM (-)	40
0852LR	Synthèse intrathécale positive	IgG (210) IgM (-)	Négatif
0928BM	Négative	IgG (386) IgM (-)	7680
1008LF	Négative	IgG (208) IgM (-)	120
1015RP	Négative	IgG (1521) IgM (-)	40
1077AH	IgG + / IgM -	IgG (491) IgM (-)	Ininterprétable
1103LB	Négative	IgG (327) IgM (-)	20
1113DE	Négative	IgG (114) IgM (-)	Ininterprétable
1119AF	Négative	IgG (188) IgM (-)	Ininterprétable
1186SB	Négative	IgG (161) IgM (-)	160
1203SH	Négative	IgG (2832) IgM (-)	1920
1259FL	Négative	IgG (1085) IgM (-)	320

I.3. Données épidémiologiques des cas positifs et équivoques

Concernant les échantillons ayant une sérologie TBEV IgG positive ou équivoque, 64,3% (18/28) sont des hommes avec un âge moyen de 54,5 ans. Il n'y a pas d'enfants parmi ces 28 individus. Les 28 patients ont fait l'objet d'un envoi par courrier postal du questionnaire à visée épidémiologique et 35,7% (10/28) l'ont renvoyé, 28,6% (8/28) ont été contactés par appel téléphonique, et 35,7% (10/28) n'ont pas donné suite. Le taux de participation s'élève à 66,7% (18/27) du fait du décès de l'un des participant. Les données épidémiologiques sont regroupées ci-dessous (Tableau 6).

Parmi les 18 patients pour lesquelles les données épidémiologiques sont disponibles, 61,1% (11/18) rapportent des piqûres de tiques, 88,8% (16/18) vivent en milieu rural, 72,2% (13/18) ont des loisirs en forêt (randonnée, cueillette, chasse) et donc sont exposés au vecteur. 66,7% (12/18) consomme du lait ou du fromage de chèvre et peuvent donc être exposés à une contamination par ingestion. 5 patients sur 18 ont également voyagé dans des zones de circulation du virus. Cependant, seulement 16,7% (3/18) des patients ont une activité professionnelle favorisant l'exposition au vecteur.

Concernant les motifs de consultation ayant mené à la prescription d'une sérologie de Lyme, 60,7% (17/28) sont liés à une pathologie neurologique, 14,3% (4/28) sont liés à une pathologie rhumatismale, 7,2% (2/28) lié à une pathologie infectieuse, 7,2% (2/28) lié à une pathologie auto-immune, et 10,7% (3/28) sont liés à des pathologies diverses.

Tableau 6 : Données épidémiologiques des patients positifs et équivoques en IgG TBEV

Patient	Sexe	Age	Région d'habitat	Historique de piqûre de tiques	Ingestion de lait/fromage de chèvre	Habitation en milieu rural	Proche de bois, forêts, points d'eau	Loisirs en forêt	Activité pro. exposant aux tiques	Motif de consultation	Voyage en zone d'endémie du virus	Vaccination contre un flavivirus	ATCD d'infection à un flavivirus
0109LR	M	61	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	OUI	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	POLYARTHRITE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
0307DR	M	72	NA	OUI	OUI	OUI	CHASSE	INDISPONIBLE	NON	PIDC	NON	FJ (2006)	NON
0323MN	F	35	NA	NON	OUI	OUI	RANDOMNEE	INDISPONIBLE	NON	PARESTHESIE MEMBRÉS SUPERIEURES A LA SUITE D'UNE CHIMIOThERAPIE NEUROTOXIQUE	NON	NON	DENGUE (2004)
0383CA	M	23	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	DOULEUR THORACIQUE SANS ETIOLOGIE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
0416CA	F	38	NA/OCC	OUI	OUI	OUI	RANDOMNEE	RANDOMNEE	EDUCATRICE CANIN	ARTHRALGIES DIFFUSES SANS ETIOLOGIE	NON	NON	DENGUE (1989)
0425LT	M	60	NA	OUI	OUI	OUI	RANDOMNEE	RANDOMNEE	NON	ERUPTION CUTANÉE SANS PRECISION	NON	NON	DENGUE (1980)
0585BP	F	47	CVL	OUI	OUI	OUI	RANDOMNEE	RANDOMNEE	NON	DOULEURS MIXTES CHRONIQUES	EST DE FRANCE	FJ (2008)	NON
0606DA	M	79	NA	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	POLYARTHRITE NON CARACTERISEE	NON	NON	NON
0611NP	F	44	NA	OUI	OUI	OUI	CUEILLETTE	CUEILLETTE	NON	AVC ISCHEMIQUE OCCIPITAL/SYLVEN DROIT	NON	NON	NON
0628LM	F	63	NA	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	AVC ISCHEMIQUE SYLVEN DROIT	NON	FJ 2014	NON
0665MM	M	63	CVL/ARA	OUI	OUI	OUI	RANDOMNEE	RANDOMNEE	NON	NEUROPATHIE AXONALE SENSITIVE DES MEMBRÉS INFÉRIEURS	HAUTE-SAVOIE	FJ (2005) EJ (1999)	NON
0728WM	F	72	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	ANGIOCHOLITE ET MYOSITE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
0737MC	M	48	NA	OUI	OUI	OUI	CHASSE RANDOMNEE	INDISPONIBLE	NON	PIDC	NON	NON	NON
0744FC	M	66	NA	OUI	OUI	NON	CUEILLETTE, RANDOMNEE	RANDOMNEE	NON	DOULEURS RADICULAIRES EXPLIQUÉES PAR UNE ANTELSTHÉSIS	BOSNIE, MACEDOINE	FJ (1994)	DENGUE (1996)
0833RJ	M	59	NA	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON	AVC ISCHEMIQUE CAPSULO-THALAMIQUE	NON	NON	NON
0838AN	M	29	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	MYASTHÉNIE OCULAIRE (NERF III)	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
0851PO	M	55	NA	SENEGAL	OUI	OUI	NON	NON	NON	MENINGITE LYMPHOCTAIRE A B. CROCIDURA	NON	FJ (1986- 2000)	NON
0852LR	M	69	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	SYNDROME DE GUILLAIN-BARRE NEUROBORRELIOSE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
0928BM	M	46	NA	OUI	NON	OUI	CUEILLETTE, RANDOMNEE	RANDOMNEE	GARDER FORESTIER, SYLVICULTEUR	ACCIDENT ISCHEMIQUE TRANSITOIRE + CRISÉS D'EPILEPSIES	POLOGNE	TBEV (1996)	NON
1008LF	F	37	B	NON	OUI	OUI	RANDOMNEE	RANDOMNEE	AUXILIAIRE VÉTÉRIINAIRE	AVC ISCHEMIQUE SYLVEN GAUCHE	EST DE FRANCE	NON	NON
1015RP	F	41	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	LUPUS ERYTHÉMATÉUX DISSEMINÉ	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
1077AH	M	47	NA	NON	NON	NON	NON	NON	NON	AVC ISCHEMIQUE ARTERE CHOROIDE	NON	NON	NON
1103LB	M	51	NA	NON	NON	OUI	RANDOMNEE	RANDOMNEE	NON	AVC ISCHEMIQUE CÉRÉBELLÉUX GAUCHE	NON	NON	NON
1113DE	M	56	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	AVC ISCHEMIQUE SYLVEN GAUCHE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
1119AF	F	69	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	AVC A REPETITION EN IRAK	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
1185SB	F	62	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	MYASTHÉNIE AUTO-IMMUNE + THYMOME	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE
1203SH	M	63	NA	NON	OUI	NON	NON	NON	NON	DOULEURS NEUROPATHIQUES CHRONIQUES	NON	NON	DENGUE (2015)
1259FL	M	75	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	SYNDROME POST-POLIOMYELITIQUE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE	INDISPONIBLE

NA : Nouvelle-Aquitaine ; OCC : Occitanie ; CVL : Centre-Val-de-Loire ; ARA : Auvergne Rhône Alpes ; B : Bretagne ; PIDC : Polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique ; AVC : Accident Vasculaire Cérébral ; FJ : Fièvre jaune ; EJ : Encéphalite japonaise ; : Réponse « Oui » au questionnaire ; : Réponse « Non » au questionnaire ; : Absence de réponse au questionnaire

Le patient vacciné TBEV (0928BM) présente un titre moyen de 7680, alors que les patients vaccinés uniquement contre la fièvre jaune présente un titre moyen de 770 et les patients ayant uniquement contracté la dengue ont quant-à-eux un titre moyen de 1360. La comparaison de ces deux groupes ne montre pas de différence significative du titre de la séroneutralisation au risque alpha 5%.

II. Dépistage moléculaire du TBEV et de *B. burgdorferi sensu lato*

II.1. Description de la population de tiques récoltées

Au total, en 2022 et 2023, 53 et 990 tiques respectivement ont été récoltées sur la base du volontariat pour un total de 1043 tiques. L'identification macroscopique au genre a permis d'identifier 5,4% (56) de *Dermacentor* adultes situés sur le site de Pierre-Buffière (87260) et Pressignac-Vicq (24150), et 94,6% (987) d'*Ixodes* dont 8 nymphes et 979 adultes. Parmi ces *Ixodes* adultes, 51,6% (505/979) n'étaient pas gorgées et donc inclusibles dans le protocole. 35 tiques non gorgées et 3 tiques gorgées ont été requises pour établir le protocole d'extraction. 470 tiques *Ixodes* adultes non gorgées, parmi lesquelles 245 femelles et 225 mâles ont été poolées par cinq dans le but de rechercher le génome du TBEV et de *Borrelia burgdorferi*, soit 94 extraits. Les sites géographiques inclus dans la recherche sont Nantiat (87140), Masléon (87130), Champagnac-La-Rivière (87150), Saint-Jouvent (87510), Saint-Sylvestre (87240), Ambazac (87240), Eymoutiers (87120) et la Celle-Dunoise (23800) selon la répartition suivante (Tableau 7). Aucun site ne provient de Corrèze (19000).

Tableau 7 : Sites retenus pour la recherche du TBEV et de *Borrelia burgdorferi sensu lato* et numéro d'extrait associé

Localité	Numéro d'extrait
Nantiat (87140)	1 à 8
Masléon (87130)	9
Champagnac-La-Rivière (87150)	10
Saint-Jouvent (87510)	11 à 23
Saint-Sylvestre (87240)	24 à 36
Ambazac (87240)	37 à 38
Eymoutiers (87120)	39 à 46
La Celle-Dunoise (23800)	47 à 94

Concernant la récolte par la technique du drapeau, sur le site 1, 248 nymphes et 5 adultes ont été récoltés le 25 avril 2023, 342 nymphes et 23 adultes le 01 juin 2023 et 134 nymphes le 26 juillet 2023 avec une densité moyenne de nymphes sur 100m² de 82, 114 et 43 en avril, juin, juillet respectivement pour le point 1. Pour le point 2, 654 nymphes et 17 adultes ont été récoltés le 25 avril 2023, 952 nymphes et 36 adultes le 02 juin 2023 et 510 nymphes et 8 adultes le 26 juillet 2023 avec une densité moyenne de nymphes sur 100m² de 211, 315 et 169 en avril, juin, juillet respectivement pour le point 2. Enfin sur le point 3, 202 nymphes et 6 adultes ont été récoltés le 02 mai 2023 et 693 nymphes et 16 adultes le 06 juin 2023. La densité de nymphes par 100m² est donc de 67 et 231 en mai et juin respectivement pour le point 3. La répartition de la densité de nymphes par 100m² dans le temps est illustrée ci-dessous (Figure 29). Ces données sont limitées sur l'année 2023 mais semblent bien démontrer la présence d'un pic d'activité des tiques du genre *Ixodes* au début de l'été en Limousin.



Figure 29 : Densité mensuelle moyenne en nymphes *Ixodes ricinus* en Limousin entre avril et juillet 2023

II.2. Validation de l'extraction d'ADN et d'ARN totaux

Pour confirmer l'extraction en ARN et en ADN des 94 extraits, une amplification génique de l'ARN 16S ribosomal d'*Ixodes ricinus* a été réalisée en parallèle d'un dosage des ARN et ADN totaux. Les échantillons 1, 2 et de 9 à 30 ont subi deux extractions successives dû à une panne de l'EasyMag® lors du premier essai. Les résultats rendus pour ces échantillons restent donc sous réserve. Les concentrations en ADN et en ARN sont listées dans le tableau suivant (Tableau 8). Les concentrations en acides nucléiques entre les pools majoritairement composés de femelles et les pools majoritairement composés de mâles ne sont pas significativement différentes au risque alpha 5%.

Tableau 8 : Concentration en ADN et en ARN totaux de chaque extrait (exprimé en ng/μL)

Extrait	[ADN] en ng/μL	[ARN] en ng/μL	Extrait	[ADN] en ng/μL	[ARN] en ng/μL	Extrait	[ADN] en ng/μL	[ARN] en ng/μL	Extrait	[ADN] en ng/μL	[ARN] en ng/μL	Extrait	[ADN] en ng/μL	[ARN] en ng/μL
1	2,1	22	21	21	38	41	1,96	18,7	61	70,8	55,6	81	83,6	60,8
2	0,151	<0,2	22	15,6	20,9	42	0,932	16,1	62	82,4	92,8	82	80,4	45,6
3	129	88,4	23	10,3	2,02	43	8,84	7,6	63	76	76,8	83	77,6	54
4	105	88	24	34,7	31,2	44	31,2	134	64	59,2	90,8	84	52,4	44
5	121	125	25	22	45,2	45	21,5	112	65	68,4	48,8	85	123	73,6
6	194	151	26	46,4	1,89	46	23,2	113	66	54,8	52,8	86	77,2	77,6
7	102	113	27	24,4	24	47	38,8	35,2	67	75,2	48,8	87	98,4	63,6
8	224	124	28	17,2	15	48	48	58	68	58,4	54	88	Indisponible	11,1
9	8,36	16	29	49,6	14,4	49	56,4	79,6	69	130	85,2	89	94,4	57,6
10	19,5	62,4	30	36	29,2	50	58,4	30	70	77,2	66	90	62,8	45,2
11	20	25	31	153	43,2	51	70	127	71	52	55,6	91	53,2	42,4
12	9,52	14,2	32	146	66	52	108	72	72	64,4	46,8	92	91,6	40
13	4,88	8,4	33	236	63,3	53	94,8	66,4	73	63,6	64,8	93	54	42
14	0,094	<0,2	34	237	54,4	54	67,2	78,4	74	73,6	50	94	85,5	70
15	12,4	11,9	35	86	77,6	55	118	77,6	75	57,6	57,1			
16	14,2	16,4	36	52,4	16,7	56	78,8	22	76	93,6	65,6			
17	8,48	11,8	37	84	48,4	57	88,4	71,6	77	47,6	66,8			
18	18,6	21,9	38	98,4	86,4	58	130	72,4	78	62	44			
19	11,5	16,6	39	0,108	0,8	59	57,6	56	79	66,4	52,4			
20	21,2	33,1	40	0,0808	<0,2	60	96,4	52	80	48,8	45,6			

La quantité moyenne extraite par pool est de 80,9 ng/μL d'ADN et 62,8 ng/μL d'ARN pour les pools ayant subi le protocole défini d'extraction. Cependant cette moyenne chute à 17,8 ng/μL d'ADN et 20,07 ng/μL d'ARN dans le groupe ayant nécessité deux extractions à la suite de la panne d'automate (Figure 30). Les concentrations en ADN et en ARN sont significativement différentes entre les deux groupes au risque alpha 5% ($p < 0.0001$).

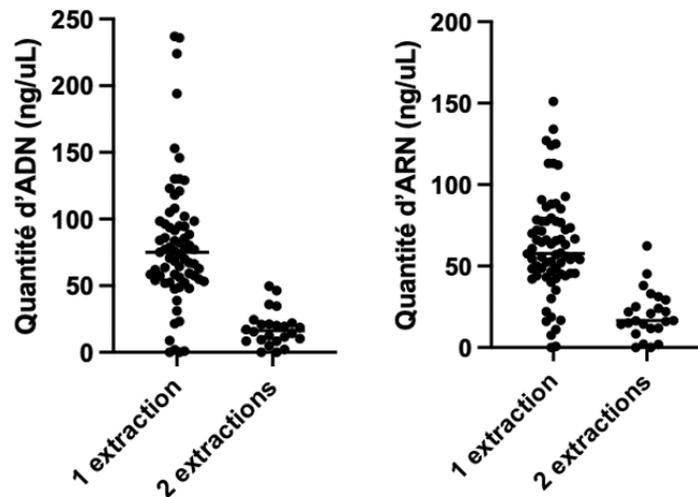


Figure 30 : Distribution des concentrations d'ADN et d'ARN des extraits ayant subi une ou deux extractions

II.3. Amplification de l'ARN16S ribosomal d'*Ixodes ricinus*

Lors de la mise au point du protocole d'extraction, des RT-PCR ARN16S ribosomal d'*Ixodes ricinus* ont été réalisées sur éluats purs, dilués au dixième et dilués au centième. Ces PCR démontrent une inhibition encore significative au dixième (Annexe 9), nous contraignant donc à travailler sur des extraits dilués au centième.

Tous les échantillons, dilués au centième se sont révélés positifs en RT-PCR ARN16S ribosomal d'*Ixodes ricinus* (Figure 31), confirmant ainsi la qualité de l'extraction avec un Ct moyen de 19,45 dans le groupe « 1 extraction » et 20,85 dans le groupe « 2 extractions », en accord avec les dosages précédents.

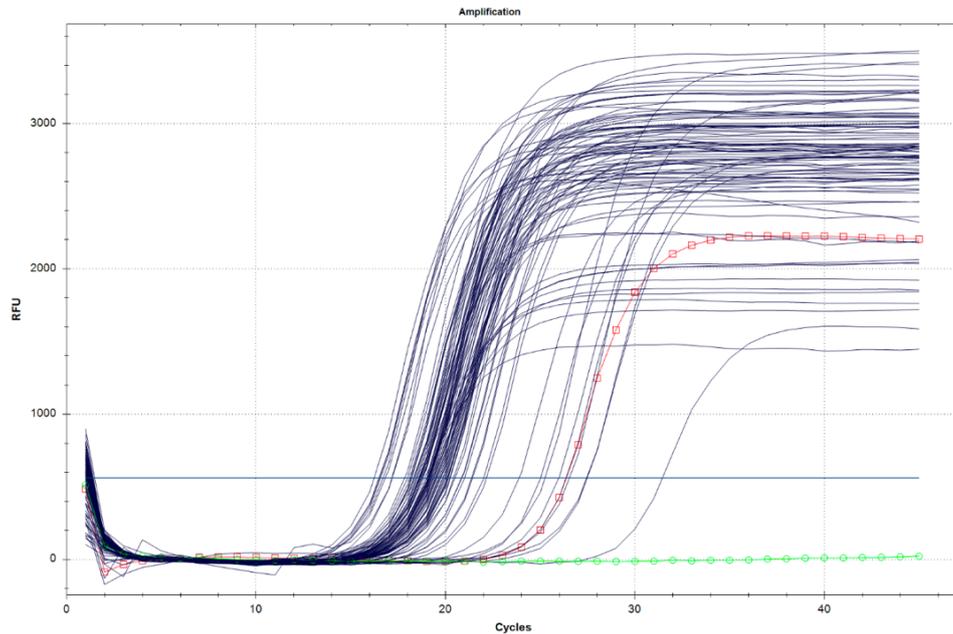


Figure 31 : RT-PCR ARN 16S ribosomal *Ixodes ricinus* (T+ : courbe rouge ; T- courbe verte)

II.4. Amplification du TBEV

Tous les échantillons dilués au centième ont été testés en RT-PCR TBEV mais aucun échantillon n'a été trouvé positif (Figure 32).

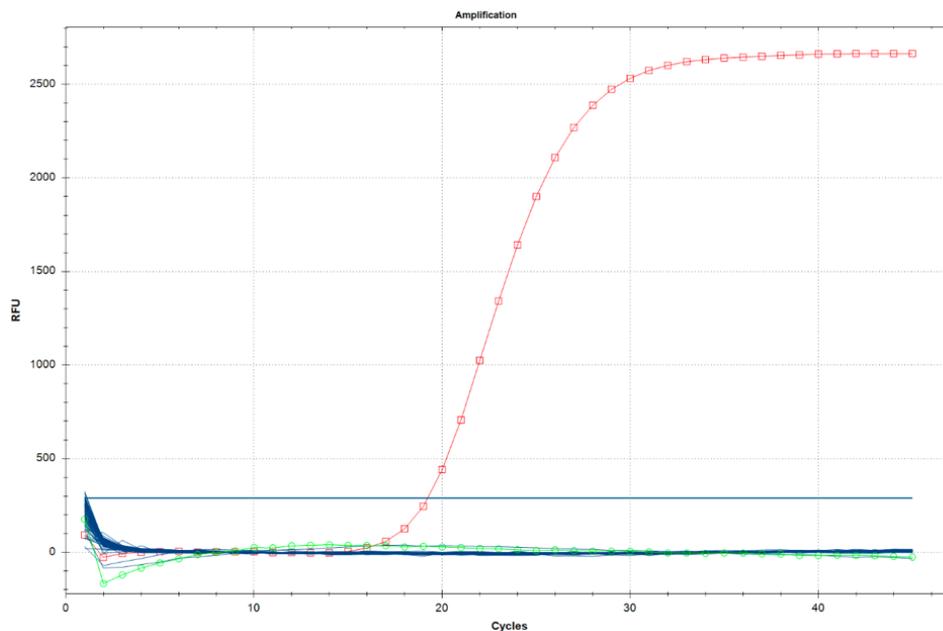


Figure 32 : Courbes d'amplification des extraits (T+ : courbe rouge, T- : courbe verte)

II.5. Amplification de *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Une mise au point de la technique de PCR en temps réel du CNR Borrelia a été nécessaire pour mettre en évidence la présence du pathogène dans les extraits de l'étude. En effet, en appliquant le protocole décrit précédemment (Tableau 4) sur les témoins positifs fournis par le CNR Borrelia, aucun signal spécifique d'amplification n'était observable (Figure 33).

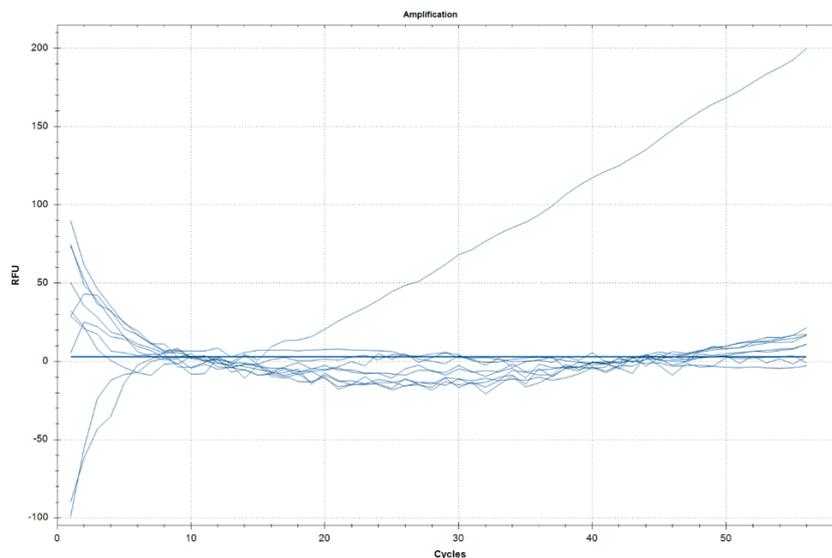


Figure 33 : Courbes d'amplification de la PCR *Borrelia burgdorferi sensu lato* sur de l'ADN de *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi sensu lato* (pur, 10^{ème}, 100^{ème})

Plusieurs ajustements ont été réalisés, parmi lesquelles nous pouvons citer l'augmentation puis la diminution des concentrations en amorces d'un facteur 2 sans amélioration des courbes d'amplification. Un gradient de concentration en MgCl₂ incluant la concentration cible du protocole du CNR Borrelia (3,4 mM) a été réalisé, sans succès sur la détection. Des températures d'hybridation de 56°C puis 60°C ont été expérimentées sans succès. De nouvelles aliquotes de sondes et d'amorces ont été reconstituées, une concentration plus élevée en enzyme a également été testée. Un nouveau protocole avec l'enzyme Superscript® a été testé sans amélioration. Toutes ces optimisations n'ont pas abouti à un signal détectable en temps réel, laissant supposer un potentiel dysfonctionnement des sondes.

Pour confirmer cette hypothèse, les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1,5% contenant du Midori Green® et mis à migrer via un courant continu de 100 volts pendant 35 minutes. La taille du fragment amplifié attendu étant de 200 paires de bases, le dépôt sur gel a mis en évidence une amplification efficace pour les 2 volumes d'enzyme (Fast Start 1a + 1b, Roche) de 4 et 6 µL (Figure 34). La sonde a donc été identifiée comme le facteur limitant de la PCR en temps réel.

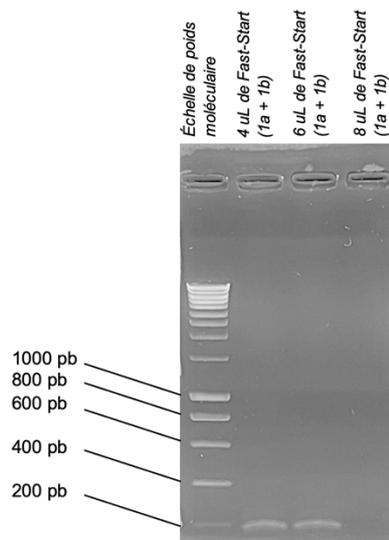


Figure 34 : Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification de l'expérience avec une concentration majorée en enzyme

Cependant en réitérant l'expérience avec le volume d'enzyme recommandé par le fournisseur de 2 μ L, 0,5 pg d'ADN de *B. garinii* et une concentration en MgCl₂ de 3,5 mM proche de la concentration en MgCl₂ du protocole du CNR Borrelia (3,4 mM), les bandes d'amplification étaient de faible intensité, parfois absentes (Figure 35A). Même en répétant l'expérience avec 4 μ L d'enzyme, la détection des fragments d'amplification n'était possible que dans 50% des cas. Cette limite de 0,5 pg d'ADN semblait donc être la limite de détection de cette technique, n'offrant pas une amplification dans 100% des cas. Un nouvel essai a donc été réalisé en partant du témoin positif pur, soit 50 pg, et dans les mêmes conditions offrant des résultats satisfaisants et des fragments d'amplification intenses (Figure 35B).

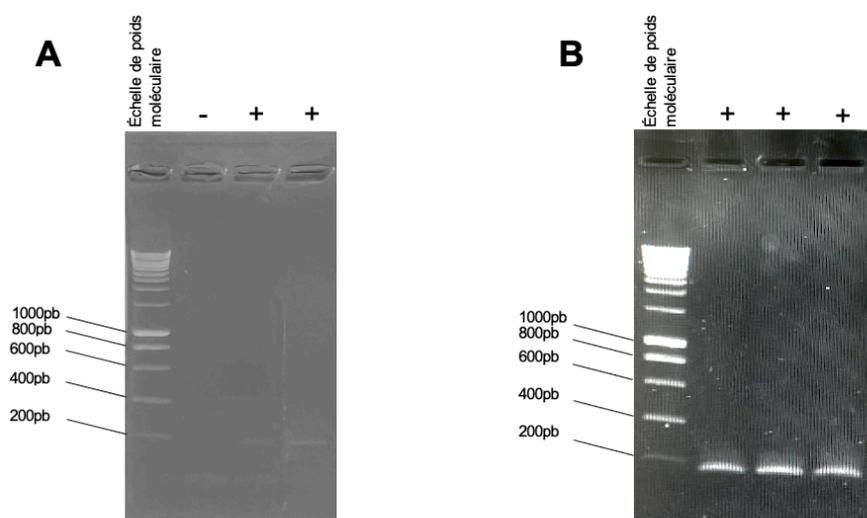
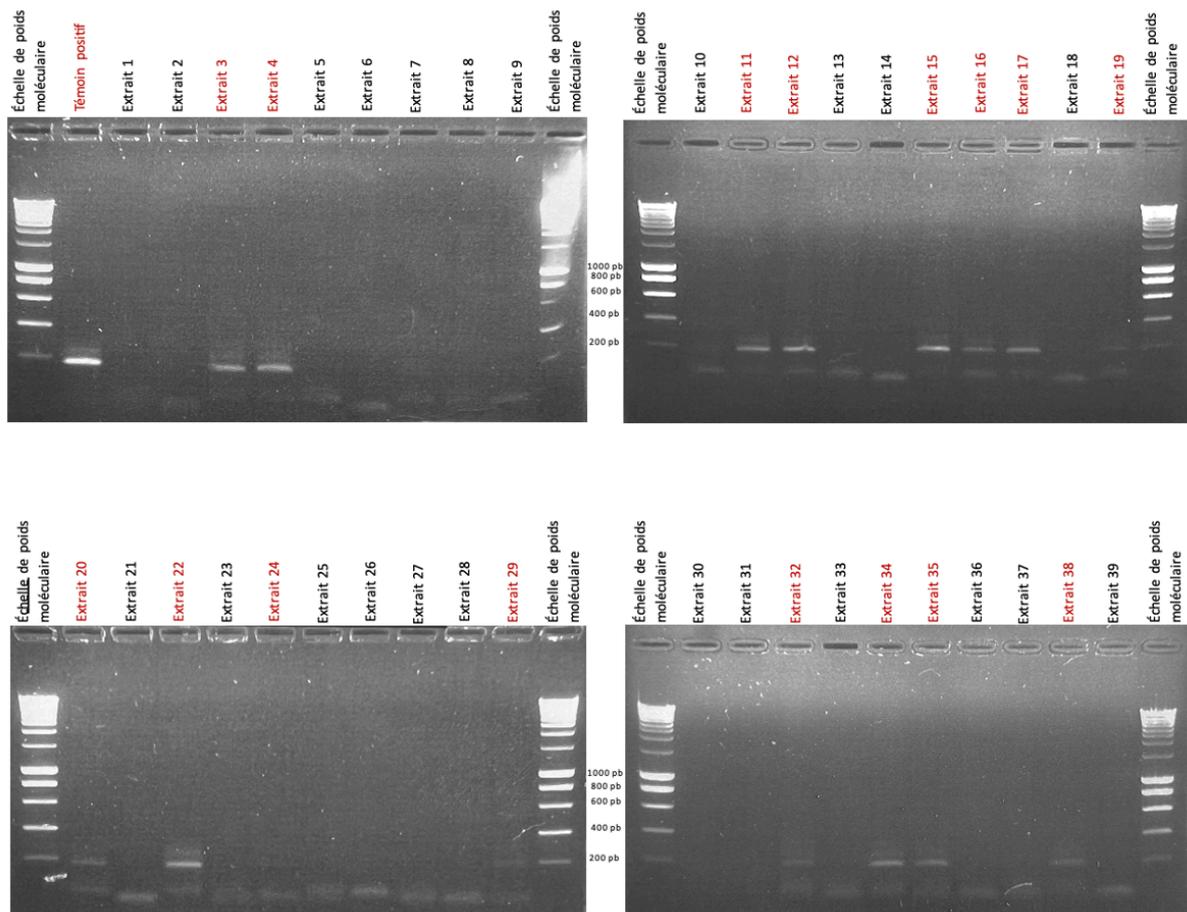


Figure 35 : (A) Fragment amplifié avec une quantité d'ADN de 0,5 pg (puits positifs : 3 et 4) ; (B) Fragment amplifié avec une quantité d'ADN de 50 pg (puits positifs : 2,3 et 4)

La détection par PCR en temps réel de *Borrelia burgdorferi* sensu lato n'a donc pas pu être réalisée suite à une erreur dans la commande des sondes. En effet, les bases composant les sondes devaient être des bases dites « LNA » pour « Locked Nucleic Acid », permettant un réglage de la température d'hybridation pour les sondes courtes, et donc, une meilleure affinité et spécificité de la sonde pour sa cible. Ces acides nucléiques verrouillés contiennent un pont méthylène 2'-O, 4'-C (Annexe 10), capable de restreindre la flexibilité de l'acide nucléique et de bloquer cette conformation bicyclique, augmentant ainsi la température d'hybridation d'environ 3 à 8°C par acide nucléique bloqué. La séquence des sondes à utiliser est donc pour la sonde Bbsl « 6FAM - CA[+A][+G]A[+T][+G]A[+A]GC – TAMRA » et pour la sonde Garval « 6FAM - CA[+A][+G]A[+T][+G]A[+G]GC – TAMRA ». Les 94 extraits ont donc été étudiés par PCR en point final après une mise au point et une validation sur témoin positif décrites précédemment.

Ainsi, 50% (47/94) des extraits sont positifs en PCR *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Figure 36). Le *minimum infection rate* (MIR) obtenu, considérant au minimum une tique positive par pools est de 10% (47/470). Il est intéressant de noter que la double extraction ne semble pas avoir altéré la qualité de l'ADN car 10 extraits sont positifs dans ce groupe. Les localités concernées sont Nantiat (87140) avec un MIR de 5%, Saint-Jouvent (87510) avec un MIR de 12,3%, Saint-Sylvestre (87240) avec un MIR de 7,7%, Ambazac (87240) avec un MIR de 10%, Eymoutiers (87120) avec un MIR de 2,5% et la Celle-Dunoise (23800) avec un MIR de 12,8%.



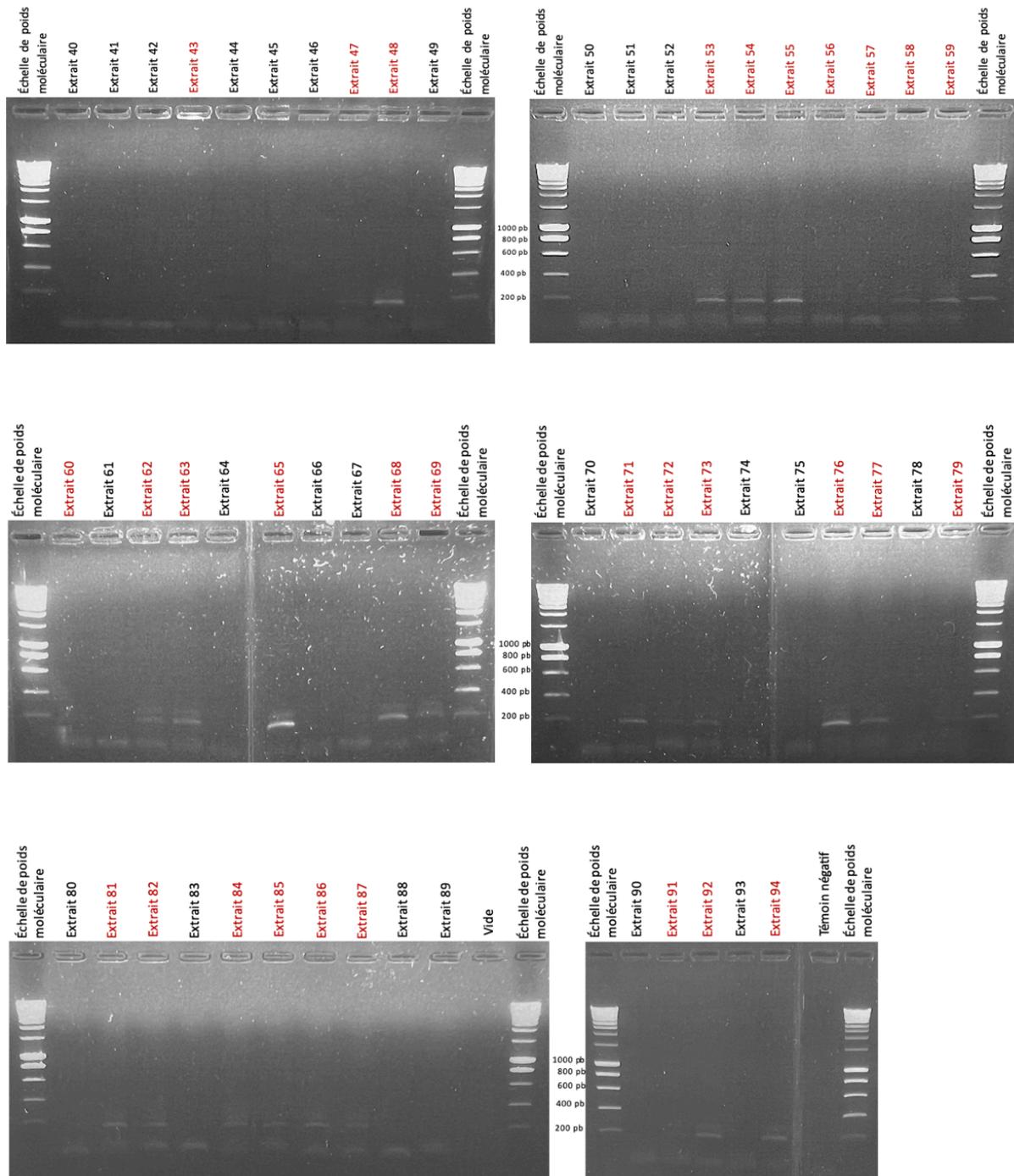


Figure 36 : Révélation sur gel d'agarose de l'amplification du fragment du gène *FlaB* de *Borrelia burgorferi* sensu lato (extraits positifs en rouge)

V. Discussion

Concernant la première partie de ce travail portant sur la sérologie TBEV en population humaine, les données récoltées sont à interpréter avec précaution. En effet, les techniques de sérologies actuelles ne permettent pas de différencier les anticorps dirigés contre le virus de l'encéphalite à tiques des anticorps dirigés contre d'autres flavivirus. La trousse utilisée dans cette étude présente un moindre risque de réactions croisées(142), grâce notamment à l'utilisation de la protéine d'enveloppe de la souche Moscow B4 et non du virus entier partageant des épitopes avec les autres flavivirus.

La séroneutralisation a au minimum objectivé 2 réactions croisées, chez le patient 0307DR et le 0852LR. Cette technique, bien que plus spécifique que le dépistage ELISA, ne l'est pas à 100%, et une étude de séroneutralisation des autres flavivirus (dengue, fièvre jaune, encéphalite japonaise, Zika virus, West-Nile virus) chez les autres patients permettrait d'exclure une possible réaction croisée en cas de négativité ou de titre faible en IgG neutralisants. Sans ces résultats de séroneutralisation, nous pouvons tout de même avancer quelques hypothèses concernant certains patients grâce aux données épidémiologiques. En effet, les résultats de la sérologie TBEV semblent pouvoir s'expliquer chez 38,9% (7/18) des patients par une vaccination contre la fièvre jaune (6/7), l'encéphalite japonaise (1/7) et l'encéphalite à tiques (1/7) excluant alors l'hypothèse d'une encéphalite à tiques chez ces patients. Ces résultats peuvent également s'expliquer par des antécédents d'infection par le virus de la dengue chez 27,7% (5/18) des patients, capable également de provoquer des fausses positivités de la sérologie TBEV. En revanche, la séroneutralisation des IgG dirigés contre le virus de l'encéphalite à tiques met en évidence une forte prévalence d'anticorps capables de neutraliser le virus. Cependant, les patients 0838AN, 0737MC et 0109LR possèdent des titres moyens au minimum équivalent voire plus élevé que le patient 0928BM qui lui est vacciné contre le TBEV.

Concernant ces trois patients, le patient 0109LR est d'origine vénézuélienne et vit dans le pays qui est un haut lieu de circulation du virus de la fièvre jaune, de la dengue et du Zika virus. Le patient n'est malheureusement pas joignable mais le lieu d'habitation est une hypothèse pouvant expliquer le titre moyen d'IgG neutralisants de 10880 retrouvé chez ce patient au cours de cette étude. Le patient 0838AN n'a malheureusement pas donné suite au questionnaire et il serait intéressant de le recontacter pour connaître son statut vaccinal, ses voyages potentiels en zone d'endémie et évaluer son risque d'exposition au vecteur. Enfin le patient 0737MC semble être, quant-à-lui, fortement exposé aux piqûres de tiques. En effet, ce patient vit en milieu rural, proche de bois et forêts et pratique ses loisirs en milieu boisé (chasse et randonnée). De plus, ce patient consomme des produits laitiers issus de caprins et est donc susceptible de se contaminer par ingestion. Ce patient, originaire de Corrèze, non vacciné contre les virus de l'encéphalite à tiques, de la fièvre jaune, de la dengue ou de l'encéphalite japonaise et n'ayant pas voyagé en zone d'endémie de TBEV ou d'autres flavivirus possède un titre en IgG neutralisant le virus de l'encéphalite à tiques de 10240. Ce titre élevé, en l'absence de données épidémiologiques pouvant expliquer une réaction croisée, permet d'envisager une réelle infection par le TBEV en Limousin. Ce patient doit être recontacté pour une vérification des données épidémiologiques récoltées. En cas de confirmation des informations, une enquête épidémiologique plus précise permettant d'identifier le(les) lieu(x) de piqûres de tiques est à envisager. Cette enquête permettrait d'identifier les lieux probables de circulation du virus et ainsi de concentrer les récoltes de

tiques et donc la recherche du virus à ces coordonnées GPS. Ce patient étant un chasseur, une sérologie TBEV pourrait être réalisée sur son(ses) chien(s) avec l'accord du patient.

Concernant les résultats de séroprévalence, il est difficile de se comparer avec d'autres études en France. En effet, ce sujet est peu étudié mais la séroprévalence de 2,61% retrouvé dans cette étude est proche d'une étude alsacienne de 2016 retrouvant une séroprévalence de 2,3% chez des personnes ayant une activité professionnelle en forêt(143). Plus récemment une autre étude alsacienne retrouve une séroprévalence de 5,89% sur 1689 sérums analysés spécifiquement à la recherche d'anticorps anti-TBEV devant une clinique évocatrice(27). Concernant la population générale, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude à ce sujet, si bien que la séroprévalence est pour le moment considérée comme très faible (144).

Ce travail de recherche est donc le premier à s'intéresser à la séroprévalence anti-TBEV en Limousin, qui est un territoire comme l'Alsace avec une forte concentration du vecteur de ce pathogène.

Concernant l'étude de prévalence du virus de l'encéphalite à tique dans les tiques, ces résultats sont à nuancer. En effet, nous avons volontairement choisi une extraction d'acides nucléiques totaux afin de pouvoir étudier dans un second temps la prévalence de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Cette extraction a cependant nécessité une dilution au centième des extraits, du fait d'une forte concentration en acides nucléiques inhibant la RT-PCR ARN16S ribosomal d'*Ixodes ricinus*. Ces dilutions ont pu contribuer à diminuer la quantité d'ARN viral dans l'échantillon analysé. Une nouvelle approche est donc à expérimenter, en utilisant un volume d'extrait pur, soumis à l'action d'une DNase, puis en éluant les ARN à l'aide d'une colonne de purification. Une fois les ARN isolés, une RT-PCR serait envisageable sans ou avec une faible dilution de l'extrait, pouvant améliorer la sensibilité de la technique.

Cette approche réalisée sur nos extraits permettrait également de valider notre extraction d'ARN. En effet, la RT-PCR ARN16S ribosomal d'*Ixodes ricinus* qui a été réalisée pendant ce projet ne nous permet pas de distinguer la qualité et la quantité de l'ARN et de l'ADN dans les différents échantillons.

Il est aussi également envisageable pour les collectes futures d'extraire uniquement les ARN comme décrit par l'équipe de Topp et, al., 2022(45), rendant cependant l'étude de la prévalence de *Borrelia burgdorferi* sensu lato impossible.

Néanmoins, il est également envisageable que ces extraits soient effectivement de vrais négatifs. La difficulté dans la détection du virus repose sur sa répartition géographique, c'est-à-dire que le virus circule au sein de *foci*, pouvant être identifiés par des enquêtes épidémiologiques autour de cas confirmés. En effet, en zone de « forte endémie » connue comme le Sud de l'Allemagne (Bavière, Bade-Wurtemberg), le taux d'infection minimum (MIR) du virus dans les nymphes est compris entre 0,03% et 0,36% et entre 0,19% et 0,51% chez les adultes sur une cohorte de plus de 20 000 tiques étudiées(45). Une autre étude sur plus de 6500 tiques confirme la précédente avec un MIR de 0,23% toutes stases confondues en « zone à risque » et aucune tiques positives en « zone à faible risque » sur plus de 1500 tiques testées(145). En Limousin, à ce jour, aucun cas d'encéphalite à tiques n'ayant été décrit, la recherche du virus dans le vecteur ne peut s'envisager que de manière aléatoire sur le territoire. Cependant, le cas probable d'infection à TBEV en Corrèze va désormais orienter les futures recherches dans ce département.

L'originalité de notre étude repose sur l'analyse de nombreuses tiques adultes réparties sur plusieurs sites du territoire limousin. Les analyses ont été réalisées sur 470 tiques adultes récoltées sur la base du volontariat, majoritairement sur des animaux de compagnies et des chevaux via les centres équestres. Ces tiques adultes présentent l'avantage par rapport aux nymphes d'avoir bénéficié d'un repas sanguin supplémentaire, et donc ont statistiquement plus de risque d'être infectées par le virus de l'encéphalite à tiques. Dans la littérature, peu d'articles étudient les tiques adultes. En effet, la méthode du drapeau est plus simple à mettre en place qu'une récolte participative. Malheureusement, elle estime environ 10% de la quantité de tiques réellement présentes sur le passage du drapeau(146) et capture majoritairement des nymphes à l'affût sur les végétations basses.

De plus, la récolte participative à partir de tubes contenant de l'éthanol à 70% v/v a permis de valider la conservation des acides nucléiques sur le long terme sans nécessité de conservation en milieu réfrigéré. Cette approche collaborative permet donc de couvrir des points variés du territoire, ce qui est important pour palier au problème de répartition du virus.

Concernant *Borrelia burgdorferi* sensu lato, le taux d'infection minimal des *Ixodes* adultes retrouvés dans cette étude est de 10% en accord avec les études précédentes en Limousin menées par l'institut Pasteur en 2005 et 2006 retrouvant une prévalence de 16% et 15,7% respectivement. En effet, la méthode de détection par pool est économiquement plus intéressante mais est moins exhaustive et sous-estime ainsi la véritable prévalence du pathogène.

Les deux études de l'institut Pasteur en 2005 et en 2006 ont permis d'identifier les espèces majoritairement isolées en Limousin (Figure 38). Les deux espèces majoritaires sont *B.garinii* et *B.afzelii* avec 33% et 31% respectivement. Fait intéressant, *B.afzelii* était l'espèce majoritaire en Creuse et *B. garinii* l'espèce majoritaire en Haute-Vienne.

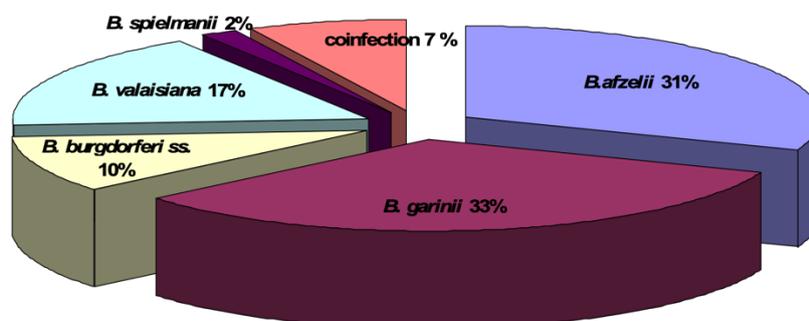


Figure 37 : Espèces de *Borrelia* majoritairement isolées en Limousin en 2006 (Selon le rapport annuel de l'institut Pasteur, 2006)

Un séquençage des pools positifs détectés dans cette étude par le CNR *Borrelia* de Strasbourg est envisagé dans le but de mettre à jour ces données. En effet, parmi les 47 échantillons positifs, 17 proviennent de Haute-Vienne et 30 de Creuse. A l'avenir, la mise en place de la détection du génome de *Borrelia burgdorferi* sensu lato par PCR en temps réel est prévue au sein du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges.

VI. Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude ont permis pour la première fois en Limousin d'émettre l'hypothèse de la présence du virus de l'encéphalite à tiques dans la région par l'intermédiaire d'une analyse sérologique sur une population ciblée. Cette affirmation requiert des investigations complémentaires permettant d'affirmer la présence du TBEV en Limousin. Cette étude souligne également la complexité de l'interprétation des sérologies dirigés contre le virus de l'encéphalite à tiques et la nécessité de confirmer les sérologies de dépistages par des séroneutralisations vis-vis d'autres flavivirus pouvant induire des réactions croisées. L'investigation de chaque cas par une enquête épidémiologique précise est également une étape primordiale pour identifier les zones de circulation du TBEV.

La recherche du virus de l'encéphalite à tiques dans le vecteur sur 470 *Ixodes* adultes s'est révélée cependant infructueuse mais compte tenu de la faible prévalence du virus dans les tiques, il est nécessaire d'augmenter la cohorte de tiques étudiées pour affirmer ou infirmer la présence du virus en Limousin. Compte tenu des résultats de l'étude sérologique, il faudrait inclure en particulier des sites de récolte en Corrèze, lieu d'habitation du patient présentant une très forte probabilité d'infection par le TBEV. Cette approche moléculaire à la recherche du virus de l'encéphalite à tiques dans le vecteur est avant tout une étude préliminaire visant à préparer et optimiser l'extraction et la détection du virus dans les tiques. En effet, un travail de grande ampleur est en préparation sur les tiques récoltées par la méthode du drapeau, c'est-à-dire plus de 4000 à ce jour. Cette nouvelle étude, en collaboration avec le CNR *Borrelia* de Strasbourg vise à analyser un nombre important de tiques dans le but de mettre en évidence la présence du TBEV en Limousin et de mettre à jour les données épidémiologiques sur la répartition de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Références bibliographiques

1. Grard G, Moureau G, Charrel RN, Lemasson JJ, Gonzalez JP, Gallian P, et al. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*. 25 avr 2007;361(1):80-92.
2. Gaunt MW, Sall AA, Lamballerie X de, Falconar AKI, Dzhivaniian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol*. août 2001;82(Pt 8):1867-76.
3. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. janv 1999;80 (Pt 1):179-85.
4. Guirakhoo F, Radda AC, Heinz FX, Kunz C. Evidence for antigenic stability of tick-borne encephalitis virus by the analysis of natural isolates. *J Gen Virol*. mars 1987;68 (Pt 3):859-64.
5. Kozlova IV, Demina TV, Tkachev SE, Doroshchenko EK, Lisak OV, Verkhozina MM, et al. Characteristics of the baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in eastern siberia. *Acta Biomed Sci East Sib Biomed J*. 28 juill 2018;3(4):53-60.
6. Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect*. 25 avr 2018;7(1):74.
7. Kunz C, Heinz FX. Tick-borne encephalitis. *Vaccine*. avr 2003;21:S1-2.
8. Zlobin VI, Pogodina VV, Kahl O. A brief history of the discovery of tick-borne encephalitis virus in the late 1930s (based on reminiscences of members of the expeditions, their colleagues, and relatives). *Ticks Tick-Borne Dis*. oct 2017;8(6):813-20.
9. Uspensky I. Several words in addition to « A brief history of the discovery of tick-borne encephalitis virus in the late 1930s » by V.I. Zlobin, V.V. Pogodina and O. Kahl (TTBDIS, 2017, 8, 813-820). *Ticks Tick-Borne Dis*. mai 2018;9(4):834-5.
10. POSPISIL L, JANDASEK L, PESEK J. Isolace nových kmenů virusu meningoencefalitidy v Brněnském kraji za letňä období 1953. *Lékařské Listy*. 1954;9(1):3-5.
11. Formanová P, Černý J, Bolfiková BČ, Valdés JJ, Kozlova I, Dzhioev Y, et al. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients. *Ticks Tick-Borne Dis*. févr 2015;6(1):38-46.
12. Hansmann Y, Pierre Gut J, Remy V, Martinot M, Allard Witz M, Christmann D. Tick-borne encephalitis in eastern France. *Scand J Infect Dis*. 2006;38(6-7):520-6.
13. He X, Zhao J, Fu S, Yao L, Gao X, Liu Y, et al. Complete Genomic Characterization of Three Tick-Borne Encephalitis Viruses Detected Along the China–North Korea Border, 2011. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. oct 2018;18(10):554-9.
14. Takashima I, Morita K, Chiba M, Hayasaka D, Sato T, Takezawa C, et al. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the the virus. *J Clin Microbiol*. août 1997;35(8):1943-7.
15. Fares W, Dachraoui K, Cherni S, Barhoumi W, Slimane TB, Younsi H, et al. Tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks, Tunisia. *Ticks Tick-Borne Dis*. janv 2021;12(1):101606.
16. Valarcher JF, Hägglund S, Juremalm M, Blomqvist G, Renström L, Zohari S, et al. Tick-borne encephalitis. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot*. août 2015;34(2):453-66.
17. Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, Werner P, Mischak A, Zainer B, et al. Tick-borne Encephalitis from Eating Goat Cheese in a Mountain Region of Austria. *Emerg Infect Dis*. oct 2009;15(10):1671-3.
18. Hudopisk N, Korva M, Janet E, Simetinger M, Grgič-Vitek M, Gubenšek J, et al. Tick-borne Encephalitis Associated with Consumption of Raw Goat Milk, Slovenia, 2012. *Emerg Infect Dis* [Internet]. mai 2013 [cité 2 mars 2023];19(5). Disponible sur: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/5/12->

1442_article.htm

19. Lipowski D, Popiel M, Perlejewski K, Nakamura S, Bukowska-Ośko I, Rzedkiewicz E, et al. A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis Virus Infection in Organ Transplant Setting. *J Infect Dis*. 15 mars 2017;215(6):896-901.
20. Lindquist L. Tick-borne encephalitis. *Handb Clin Neurol*. 2014;123:531-59.
21. Süss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*. 1 avr 2003;21 Suppl 1:S19-35.
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Tick-borne encephalitis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2020. Stockholm: ECDC; 2022. 2020;
23. Jepsen MT, Jokelainen P, Jore S, Boman A, Slunge D, Krogfelt KA. Protective practices against tick bites in Denmark, Norway and Sweden: a questionnaire-based study. *BMC Public Health*. 22 oct 2019;19(1):1344.
24. Herpe B, Schuffenecker I, Pillot J, Malvy D, Clouzeau B, Bui N, et al. Tickborne encephalitis, southwestern France. *Emerg Infect Dis*. juill 2007;13(7):1114-6.
25. Botelho-Nevers E, Gagneux-Brunon A, Velay A, Guerbois-Galla M, Grard G, Bretagne C, et al. Tick-Borne Encephalitis in Auvergne-Rhône-Alpes Region, France, 2017-2018. *Emerg Infect Dis*. oct 2019;25(10):1944-8.
26. Gonzalez G, Bournez L, Moraes RA, Marine D, Galon C, Vorimore F, et al. A One-Health Approach to Investigating an Outbreak of Alimentary Tick-Borne Encephalitis in a Non-endemic Area in France (Ain, Eastern France): A Longitudinal Serological Study in Livestock, Detection in Ticks, and the First Tick-Borne Encephalitis Virus Isolation and Molecular Characterisation. *Front Microbiol*. 2022;13:863725.
27. Velay A, Solis M, Kack-Kack W, Gantner P, Maquart M, Martinot M, et al. A new hot spot for tick-borne encephalitis (TBE): A marked increase of TBE cases in France in 2016. *Ticks Tick-Borne Dis*. janv 2018;9(1):120-5.
28. Encéphalite à tiques en France : premier bilan des cas recensés par la déclaration obligatoire entre 2021 et 2023 [Internet]. [cité 25 août 2023]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2023/encephalite-a-tiques-en-france-premier-bilan-des-cas-recenses-par-la-declaration-obligatoire-entre-2021-et-2023>
29. Bondaryuk AN, Kulakova NV, Belykh OI, Bukin YS. Dates and Rates of Tick-Borne Encephalitis Virus—The Slowest Changing Tick-Borne Flavivirus. *Int J Mol Sci*. 2 févr 2023;24(3):2921.
30. HCSP. Avis relatif à l'inscription de l'encéphalite à tiques sur la liste des maladies à déclaration obligatoire [Internet]. 2020 [cité 16 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=856>
31. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet Lond Engl*. 31 mai 2008;371(9627):1861-71.
32. F. X. Stiasny. The molecular and antigenic structure of TBEV Chapter 2 b. 2018;
33. Füzik T, Formanová P, Růžek D, Yoshii K, Niedrig M, Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun*. 30 janv 2018;9(1):436.
34. Goto A, Yoshii K, Obara M, Ueki T, Mizutani T, Kariwa H, et al. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine*. 27 avr 2005;23(23):3043-52.
35. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 25 mai 1995;375(6529):291-8.
36. Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2013;20(1):105-10.
37. Pulkkinen L, Butcher S, Anastasina M. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View.

Viruses. 28 juin 2018;10(7):350.

38. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 mars 2004;101(10):3414-9.
39. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology*. 29 juill 2016;13:131.
40. Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res*. juin 2015;118:148-58.
41. Zmurko J, Neyts J, Dallmeier K. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. *Rev Med Virol*. juill 2015;25(4):205-23.
42. Davidson AD. Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5. *Adv Virus Res*. 2009;74:41-101.
43. Best SM, Morris KL, Shannon JG, Robertson SJ, Mitzel DN, Park GS, et al. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J Virol*. oct 2005;79(20):12828-39.
44. Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res*. avr 2019;164:23-51.
45. Topp AK, Springer A, Dobler G, Bestehorn-Willmann M, Monazahian M, Strube C. New and Confirmed Foci of Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) in Northern Germany Determined by TBEV Detection in Ticks. *Pathog Basel Switz*. 21 janv 2022;11(2):126.
46. Bestehorn M, Weigold S, Kern WV, Chitimia-Dobler L, Mackenstedt U, Dobler G, et al. Phylogenetics of tick-borne encephalitis virus in endemic foci in the upper Rhine region in France and Germany. *PloS One*. 2018;13(10):e0204790.
47. Mazigh Fares. Pathological modeling of tick-borne encephalitis virus infection and induced antiviral response in neurons and astrocytes using human neural progenitor-derived cells. *Microbiology and Parasitology*. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2018. English. ffNNT : 2018IAVF0025ff. fftel-02949218f. 2018.
48. Bournez L, Umhang G, Moinet M, Boucher JM, Demerson JM, Caillot C, et al. Disappearance of TBEV Circulation among Rodents in a Natural Focus in Alsace, Eastern France. *Pathog Basel Switz*. 10 nov 2020;9(11):930.
49. Lommano E, Dvořák C, Vallotton L, Jenni L, Gern L. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks Tick-Borne Dis*. oct 2014;5(6):871-82.
50. Alekseev AN, Chunikhin SP. [The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences)]. *Parazitologiya*. 1990;24(3):177-85.
51. Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick-Borne Dis*. mars 2011;2(1):2-15.
52. Labuda M, Jones LD, Williams T, Danielova V, Nuttall PA. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J Med Entomol*. janv 1993;30(1):295-9.
53. Hart CE, Ribeiro JM, Kazimirova M, Thangamani S. Tick-Borne Encephalitis Virus Infection Alters the Sialome of Ixodes ricinus Ticks During the Earliest Stages of Feeding. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:41.
54. McNally KL, Mitzel DN, Anderson JM, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Myers TG, et al. Differential salivary gland transcript expression profile in Ixodes scapularis nymphs upon feeding or flavivirus infection. *Ticks Tick-Borne Dis*. févr 2012;3(1):18-26.
55. Michelitsch A, Wernike K, Klaus C, Dobler G, Beer M. Exploring the Reservoir Hosts of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses*. 22 juill 2019;11(7):669.

56. Belova OA, Polienko AE, Averianova AD, Karganova GG. Hybrids of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks effectively acquire and transmit tick-borne encephalitis virus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1104484.
57. Danielová V, Holubová J, Pejcoch M, Daniel M. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol (Praha).* 2002;49(4):323-5.
58. Bobrowska E, Bobrowski M, Grzeszczuk A, Prokpowicz D. [Immunity against tick-borne encephalitis in healthy residents of endemic areas]. *Wiad Parazytol.* 1995;41(1):63-70.
59. Li F, Wang Y, Yu L, Cao S, Wang K, Yuan J, et al. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. *J Virol.* mai 2015;89(10):5602-14.
60. Palus M, Vancova M, Sirmarova J, Elsterova J, Perner J, Ruzek D. Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity. *Virology.* juill 2017;507:110-22.
61. Kurhade C, Zegenhagen L, Weber E, Nair S, Michaelsen-Preusse K, Spanier J, et al. Type I Interferon response in olfactory bulb, the site of tick-borne flavivirus accumulation, is primarily regulated by IPS-1. *J Neuroinflammation.* 27 janv 2016;13:22.
62. Gelpi E, Preusser M, Garzuly F, Holzmann H, Heinz FX, Budka H. Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. *J Neuropathol Exp Neurol.* juin 2005;64(6):506-12.
63. Gelpi E, Preusser M, Laggner U, Garzuly F, Holzmann H, Heinz FX, et al. Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue. *J Neurovirol.* août 2006;12(4):322-7.
64. Grygorczuk S, Dunaj-Małyszko J, Czupryna P, Sulik A, Toczyłowski K, Siemieniako-Werszko A, et al. The Detectability of the Viral RNA in Blood and Cerebrospinal Fluid of Patients with Tick-Borne Encephalitis. *Int J Mol Sci.* 19 août 2022;23(16):9332.
65. Kindberg E, Mickiene A, Ax C, Akerlind B, Vene S, Lindquist L, et al. A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis. *J Infect Dis.* 15 janv 2008;197(2):266-9.
66. Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, Lutsar I, Ljøstad U, Mygland Å, et al. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. *Eur J Neurol.* oct 2017;24(10):1214-e61.
67. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* janv 2003;57(1-2):129-46.
68. Yoshii K, Song JY, Park SB, Yang J, Schmitt HJ. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China. *Emerg Microbes Infect.* 20 sept 2017;6(9):e82.
69. Velay A, Argemi X, Wendling MJ, Martinot M, Hansmann Y, Fafi-Kremer S. L'encéphalite à tique en France : qu'en savons-nous aujourd'hui ? *Rev Francoph Lab.* juin 2019;2019(513):34-43.
70. Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases.* 16 mai 2015;3(5):430-41.
71. Logar M, Arnez M, Kolbl J, Avsic-Zupanc T, Strle F. Comparison of the epidemiological and clinical features of tick-borne encephalitis in children and adults. *Infection.* 2000;28(2):74-7.
72. Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain J Neurol.* nov 1999;122 (Pt 11):2067-78.
73. Ternovoi VA, Kurzhukov GP, Sokolov YV, Ivanov GY, Ivanisenko VA, Loktev AV, et al. Tick-borne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* juin 2003;9(6):743-6.
74. Bogovič P, Lotrič-Furlan S, Avšič-Županc T, Lusa L, Strle F. Factors associated with severity

- of tick-borne encephalitis: A prospective observational study. *Travel Med Infect Dis.* 2018;26:25-31.
75. Parfut A, Laugel E, Baer S, Gonzalez G, Hansmann Y, Wendling MJ, et al. Tick-borne encephalitis in pediatrics: An often overlooked diagnosis. *Infect Dis Now.* mars 2023;53(2):104645.
76. Nygren TM, Pilic A, Böhmer MM, Wagner-Wiening C, Wichmann O, Hellenbrand W. Recovery and sequelae in 523 adults and children with tick-borne encephalitis in Germany. *Infection.* 6 avr 2023;1-9.
77. Steffen R. Tick-borne encephalitis (TBE) in children in Europe: Epidemiology, clinical outcome and comparison of vaccination recommendations. *Ticks Tick-Borne Dis.* janv 2019;10(1):100-10.
78. Lenhard T, Ott D, Jakob NJ, Pham M, Bäumer P, Martinez-Torres F, et al. Predictors, Neuroimaging Characteristics and Long-Term Outcome of Severe European Tick-Borne Encephalitis: A Prospective Cohort Study. *PloS One.* 2016;11(4):e0154143.
79. Saksida A, Jakopin N, Jelovšek M, Knap N, Fajs L, Lusa L, et al. Virus RNA Load in Patients with Tick-Borne Encephalitis, Slovenia. *Emerg Infect Dis.* juill 2018;24(7):1315-23.
80. Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine.* 1 avr 2003;21 Suppl 1:S36-40.
81. Velay A, Solis M, Barth H, Sohn V, Moncollin A, Neeb A, et al. Comparison of six commercial tick-borne encephalitis IgM and IgG ELISA kits and the molecular characterization of their antigenic design. *Diagn Microbiol Infect Dis.* avr 2018;90(4):286-92.
82. Giral P, Bestehorn-Willmann M, Zange S, Borde JP, Dobler G, von Buttlar H. Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses. *J Clin Microbiol.* 25 mars 2020;58(4):e01783-19.
83. Mickiene A, Laiskonis A, Günther G, Vene S, Lundkvist A, Lindquist L. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 sept 2002;35(6):650-8.
84. Kleiter I, Jilg W, Bogdahn U, Steinbrecher A. Delayed humoral immunity in a patient with severe tick-borne encephalitis after complete active vaccination. *Infection.* févr 2007;35(1):26-9.
85. Bröker M, Kollaritsch H. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment. *Vaccine.* 13 févr 2008;26(7):863-8.
86. Matveev AL, Kozlova IV, Stronin OV, Khlusevich YA, Doroshchenko EK, Baykov IK, et al. Post-exposure administration of chimeric antibody protects mice against European, Siberian, and Far-Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus. *PloS One.* 2019;14(4):e0215075.
87. Eyer L, Fojtíková M, Nencka R, Rudolf I, Hubálek Z, Ruzek D. Viral RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Prevents Death in a Mouse Model of West Nile Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2019;63(3):e02093-18.
88. Haviernik J, Štefánik M, Fojtíková M, Kali S, Tordo N, Rudolf I, et al. Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses. *Viruses.* 10 avr 2018;10(4):184.
89. [Prevention_borreliose-de-Lyme_2022_final.pdf](https://www.chru-strasbourg.fr/wp-content/uploads/2022/02/Prevention_borreliose-de-Lyme_2022_final.pdf) [Internet]. [cité 24 août 2023]. Disponible sur: https://www.chru-strasbourg.fr/wp-content/uploads/2022/02/Prevention_borreliose-de-Lyme_2022_final.pdf
90. Barrett PN, Schober-Bendixen S, Ehrlich HJ. History of TBE vaccines. *Vaccine.* 1 avr 2003;21 Suppl 1:S41-49.
91. Amicizia D, Domnich A, Panatto D, Lai PL, Cristina ML, Avio U, et al. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* mai 2013;9(5):1163-71.
92. Domnich A, Panatto D, Arbuzova EK, Signori A, Avio U, Gasparini R, et al. Immunogenicity against Far Eastern and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis (TBE) virus elicited by the currently available vaccines based on the European subtype: systematic review and meta-analysis. *Hum Vaccines*

Immunother. 2014;10(10):2819-33.

93. SPF. Séroprévalence de la borréliose de Lyme et de l'encéphalite à tiques chez des professionnels exposés dans le Grand Est de la France [Internet]. [cité 25 août 2023]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/grand-est/seroprevalence-de-la-borreliose-de-lyme-et-de-l-encephalite-a-tiques-chez-des-professionnels-exposes-dans-le-grand-est-de-la-france>
94. Stefanoff P, Pfeiffer M, Hellenbrand W, Rogalska J, Rühle F, Makówka A, et al. Virus detection in questing ticks is not a sensitive indicator for risk assessment of tick-borne encephalitis in humans. *Zoonoses Public Health*. mai 2013;60(3):215-26.
95. Blomqvist G, Näslund K, Svensson L, Beck C, Valarcher JF. Mapping geographical areas at risk for tick-borne encephalitis (TBE) by analysing bulk tank milk from Swedish dairy cattle herds for the presence of TBE virus-specific antibodies. *Acta Vet Scand*. 7 avr 2021;63(1):16.
96. Camicas JL, Morel PC. Position systématique et classification des tiques (Acarida : Ixodida).
97. Estrada-Peña A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot*. avr 2015;34(1):53-65.
98. 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*. oct 2016;7(6):1162-7.
99. Boulanger N. Les tiques de France : mieux les connaître et apprendre à vivre avec | DEFI-Écologique : le blog [Internet]. 2021 [cité 25 août 2023]. Disponible sur: <https://blog.defi-ecologique.com/tiques-france-mieux-connaître-vivre-avec/>
100. Borréliose de lyme [Internet]. [cité 5 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/borreliose-de-lyme>
101. Encyclopedia Of Entomology [Internet]. 2008 [cité 4 sept 2023]. Disponible sur: <http://archive.org/details/CapineraEncyclopediaOfEntomology2espringer2008>
102. Patrice Bourée, Alireza Ensaf. Elements d'entomologie médicale. Ellipses; 231 p.
103. Fielden LJ, Knolhoff LM, Villarreal SM, Ryan P. Underwater survival in the dog tick *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae). *J Insect Physiol*. janv 2011;57(1):21-6.
104. Bonnet S, Huber K, Joncour G, René-Martellet M, Stachurski F, Zenner L. 2. Biologie des tiques. In: Boulanger N, McCoy KD, éditeurs. Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie [Internet]. Marseille: IRD Éditions; 2017 [cité 4 sept 2023]. p. 53-84. (Didactiques). Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/9020>
105. Roma GC, Nunes PH, de Oliveira PR, Remédio RN, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Central nervous system of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae): an ultrastructural study. *Parasitol Res*. sept 2012;111(3):1277-85.
106. Claudine PE. Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Lavoisier; 2007. 339 p.
107. Sonenshine DE. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S405-425.
108. Gérard Duvallet, Didier Fontenille, Vincent Robert. Entomologie médicale et vétérinaire. Quae. IRD Éditions; 2017. 687 p.
109. tiques2.pdf [Internet]. [cité 4 sept 2023]. Disponible sur: <http://www.amfb.eu/Publications/2012/tiques2.pdf>
110. Petney TN, van Ark H, Spickett AM. On sampling tick populations: the problem of overdispersion. *Onderstepoort J Vet Res*. juin 1990;57(2):123-7.
111. Allan BF, Dutra HP, Goessling LS, Barnett K, Chase JM, Marquis RJ, et al. Invasive honeysuckle eradication reduces tick-borne disease risk by altering host dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 oct 2010;107(43):18523-7.

112. Hoch T, Monnet Y, Agoulon A. Influence of host migration between woodland and pasture on the population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*: A modelling approach. *Ecol Model.* juill 2010;221(15):1798-806.
113. Agoulon A, Butet A, Hoch T, Perez G, Plantard O, Verheyden H, et al. 3. Dynamique des populations de tiques et liaison avec les facteurs environnementaux. In: Boulanger N, McCoy KD, éditeurs. *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie* [Internet]. Marseille: IRD Éditions; 2017 [cité 4 sept 2023]. p. 85-112. (Didactiques). Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/9027>
114. Gardiner WP, Gettinby G. A weather-based prediction model for the life-cycle of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. *Vet Parasitol.* août 1983;13(1):77-84.
115. Peavey CA, Lane RS. Field and laboratory studies on the timing of oviposition and hatching of the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* déc 1996;20(12):695-711.
116. Estrada-Peña A. Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitol Res.* déc 2008;103 Suppl 1:S87-95.
117. notre-environnement. notre-environnement. 2023 [cité 4 sept 2023]. Dans quel environnement se cachent les tiques ? Disponible sur: <http://www.notre-environnement.gouv.fr/actualites/breves/article/dans-quel-environnement-se-cachent-les-tiques>
118. Fourie LJ, Belozarov VN, Needham GR. *Ixodes rubicundus* nymphs are short-day diapause-induced ticks with thermolabile sensitivity and desiccation resistance. *Med Vet Entomol.* sept 2001;15(3):335-41.
119. <https://www.chru-strasbourg.fr/> [Internet]. [cité 4 sept 2023]. Borrelia - Les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Disponible sur: <https://www.chru-strasbourg.fr/service/borrelia/>
120. Tick Growth & Appearance FAQs [Internet]. [cité 4 sept 2023]. Disponible sur: <https://web.uri.edu/tickencounter/fieldguide/tick-growth-comparison-charts/ticks-appearance/>
121. Wikel S. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front Microbiol.* 19 nov 2013;4:337.
122. Simon LV, West B, McKinney WP. Tick Paralysis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cité 4 sept 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470478/>
123. Diuk-Wasser MA, Vannier E, Krause PJ. Coinfection by *Ixodes* Tick-Borne Pathogens: Ecological, Epidemiological, and Clinical Consequences. *Trends Parasitol.* janv 2016;32(1):30-42.
124. bacterie_borreliose_de_Lyme.pdf [Internet]. [cité 5 sept 2023]. Disponible sur: https://www.chru-strasbourg.fr/wp-content/uploads/2022/02/bacterie_borreliose_de_Lyme.pdf
125. Centre National de Reference des Borrelia, Institut Pasteur. Rapport annuel d'activité Année 2005. 2005.
126. Maladie de Lyme :: Infections :: ePOPI [Internet]. [cité 5 sept 2023]. Disponible sur: https://www.epopi.fr/?page=fiche&id=54&cat_id=657
127. Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis.* oct 2011;17(10):1816-23.
128. Blanton LS. Rickettsial infections in the tropics and in the traveler. *Curr Opin Infect Dis.* oct 2013;26(5):435-40.
129. Boucher DD. Syndrome escarre ganglion ou TIBOLA (Tick BOrne LymphAdenopathy. 19^{ème} journée nationales d'infectiologie, 2018. Disponible sur <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/jni/2018/com/jni2018-tibola-boucher.pdf>
130. Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host

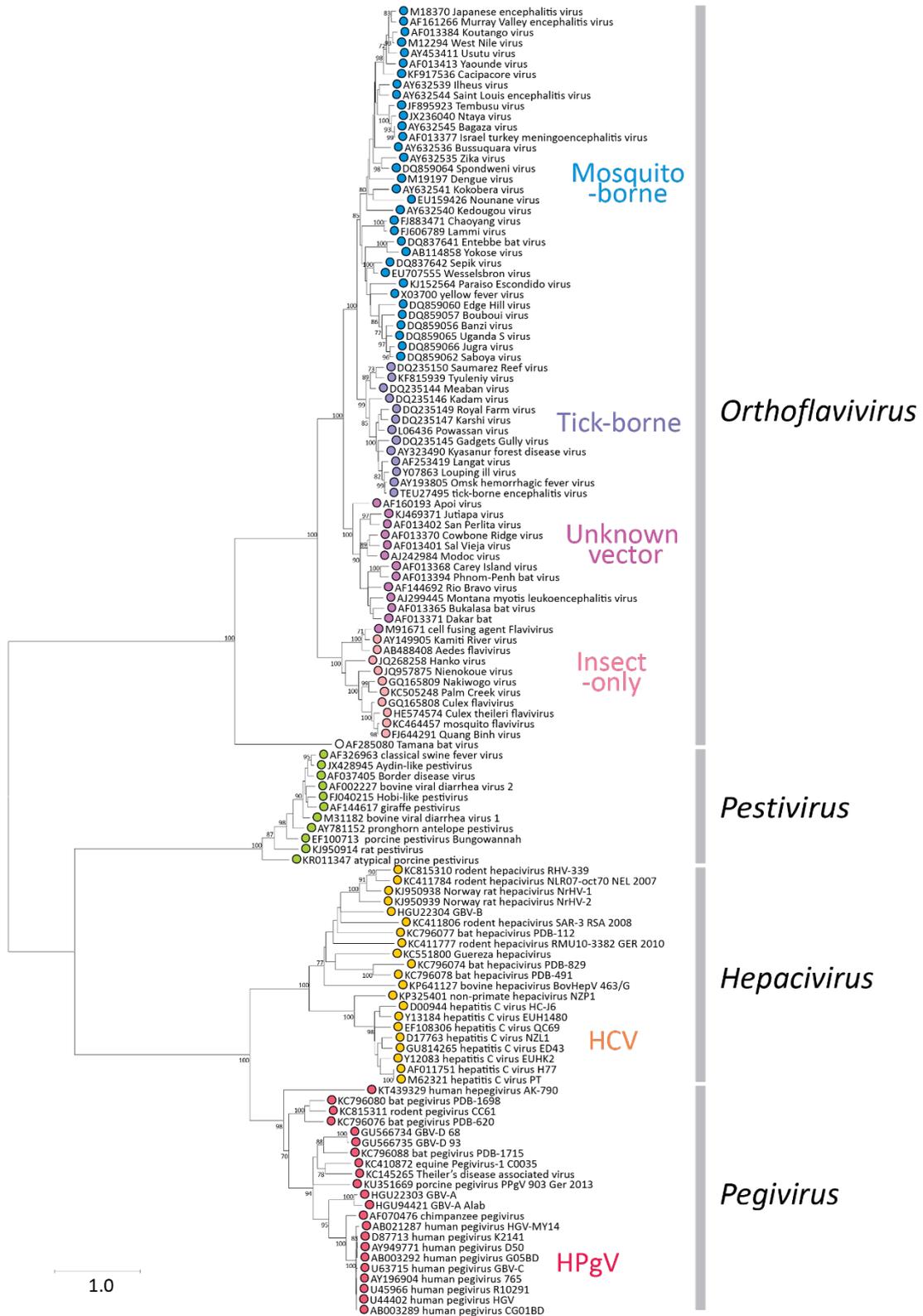
pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:31.

131. Rar V, Golovljova I. Anaplasma, Ehrlichia, and « Candidatus Neoehrlichia » bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* déc 2011;11(8):1842-61.
132. Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wennerås C. First case of human « Candidatus Neoehrlichia mikurensis » infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1956-9.
133. Lani R, Moghaddam E, Haghani A, Chang LY, AbuBakar S, Zandi K. Tick-borne viruses: a review from the perspective of therapeutic approaches. *Ticks Tick-Borne Dis.* sept 2014;5(5):457-65.
134. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* avr 2008;78(1):125-31.
135. Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect.* déc 2004;10(12):1040-55.
136. Rust RS. Human Arboviral Encephalitis. *Semin Pediatr Neurol.* sept 2012;19(3):130-51.
137. Burrage TG. African swine fever virus infection in Ornithodoros ticks. *Virus Res.* avr 2013;173(1):131-9.
138. Ramos RAN, Giannelli A, Dantas-Torres F, Mallia E, Passantino G, Lia RP, et al. *Cercopithifilaria rugosicauda* (Spirurida, Onchocercidae) in a roe deer and ticks from southern Italy. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* déc 2013;2:292-6.
139. Garnier M, Sertour N, Hossard V. Danièle Postic Elisabeth Ferquel.
140. Provost F, Laurent F, Uzcategui LR, Boiron P. Molecular study of persistence of *Nocardia asteroides* and *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. *J Clin Microbiol.* mai 1997;35(5):1157-60.
141. Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* juill 2003;27(2):136-45.
142. Ackermann-Gäumann R, Tritten ML, Hassan M, Lienhard R. Comparison of three commercial IgG and IgM ELISA kits for the detection of tick-borne encephalitis virus antibodies. *Ticks Tick-Borne Dis.* mai 2018;9(4):956-62.
143. Rigaud E, Jaulhac B, Garcia-Bonnet N, Hunfeld KP, Féménia F, Huet D, et al. Seroprevalence of seven pathogens transmitted by the *Ixodes ricinus* tick in forestry workers in France. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* août 2016;22(8):735.e1-9.
144. Encéphalite à tiques [Internet]. 2023 [cité 24 sept 2023]. Disponible sur: <https://professionnels.vaccination-info-service.fr/Maladies-et-leurs-vaccins/Encephalite-a-tiques>
145. Zubriková D, Wittmann M, Hönig V, Švec P, Víchová B, Essbauer S, et al. Prevalence of tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks in Lower Bavaria and Upper Palatinate, Germany. *Ticks Tick-Borne Dis.* mai 2020;11(3):101375.
146. Nyrhilä S, Sormunen JJ, Mäkelä S, Sippola E, Vesterinen EJ, Klemola T. One out of ten: low sampling efficiency of cloth dragging challenges abundance estimates of questing ticks. *Exp Appl Acarol.* déc 2020;82(4):571-85.
147. Soni BK, Das DSR, George RA, Aggarwal R, Sivasankar R. MRI features in dengue encephalitis: A case series in South Indian tertiary care hospital. *Indian J Radiol Imaging.* 2017;27(2):125-8.

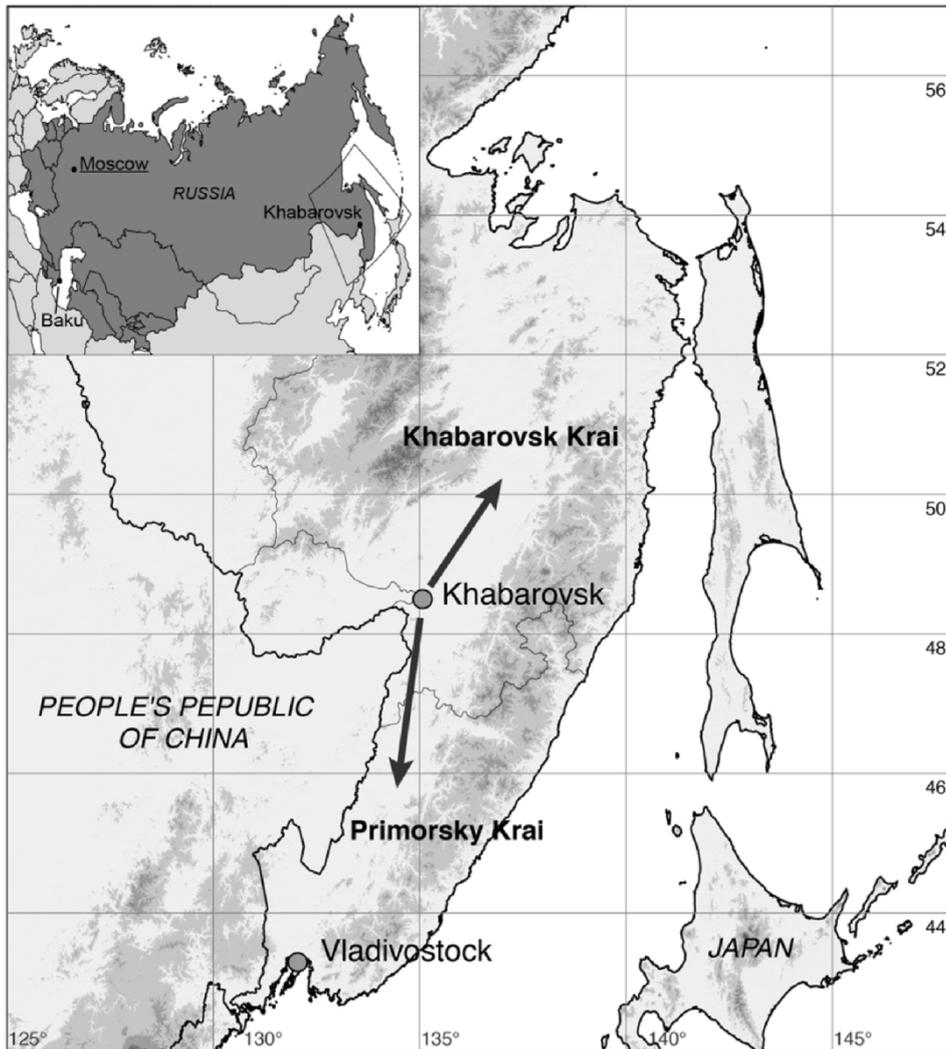
Annexes

Annexe 1 : Arbre phylogénétique des séquences d'acides aminés conservés des membres de la famille des <i>Flaviviridae</i> (ICTV, 2023)	90
Annexe 2 : Carte géographique montrant les régions d'Extrême-Orient où travaillaient les deux groupes d'expédition contre l'encéphalite à tiques en 1937 (Zlobin et al., 2017)	91
Annexe 3 : Tire-tique et manière de retirer une tique (Selon medpet.fr)	92
Annexe 4 : Procédure de test SERION ELISA classic FSME/TBE Virus IgG et IgM quantitatif 93	
Annexe 5 : Principe du MAC-ELISA(147)	94
Annexe 6 : Questionnaire envoyé aux patients avec une sérologie positive	95
Annexe 7 : Note d'information envoyée au patient.....	96
Annexe 8 : Protocole d'extraction des pools de 5 tiques adultes	98
Annexe 9 : Différents protocoles réalisés dans le cadre de la mise au point de l'extraction d'ADN et d'ARN de tiques	99
Annexe 10 : Monomères d'acide nucléique verrouillé et d'ADN (Selon Sigma-Aldrich)	100

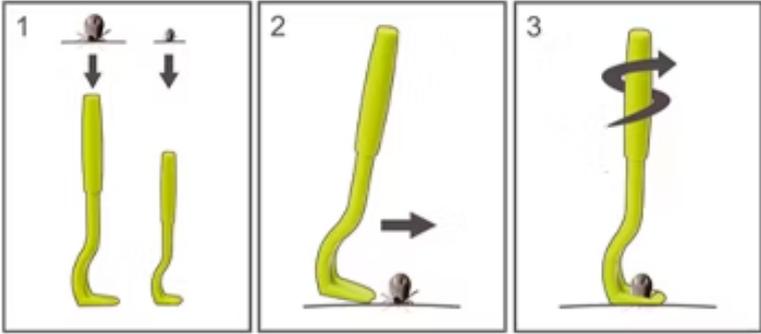
Annexe 1 : Arbre phylogénétique des séquences d'acides aminés conservés des membres de la famille des *Flaviviridae* (ICTV, 2023)



Annexe 2 : Carte géographique montrant les régions d'Extrême-Orient où travaillaient les deux groupes d'expédition contre l'encéphalite à tiques en 1937 (Zlobin et al., 2017)



Annexe 3 : Tire-tique et manière de retirer une tique (Selon medpet.fr)



Annexe 4 : Procédure de test SERION ELISA classic FSME/TBE Virus IgG et IgM quantitatif

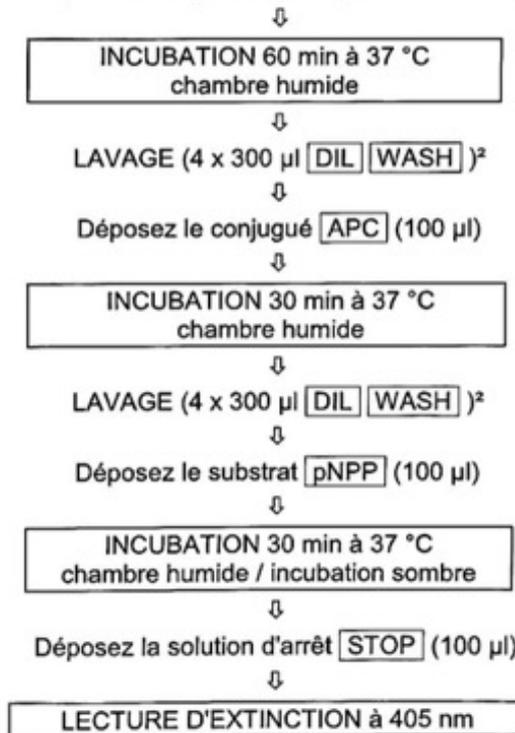
7.4 Aperçu général - Procédure de test

SERION ELISA *classic* FSME/TBE Virus IgG/IgM quantitatif

Dans le cas de détection d'IgM de facteur rhumatoïde, voir No. 7.2.1;
Incubation de 15 minutes à température ambiante ou toute une nuit à 4°C

dilution d'échantillon¹
(échantillon de patient)
1 + 100

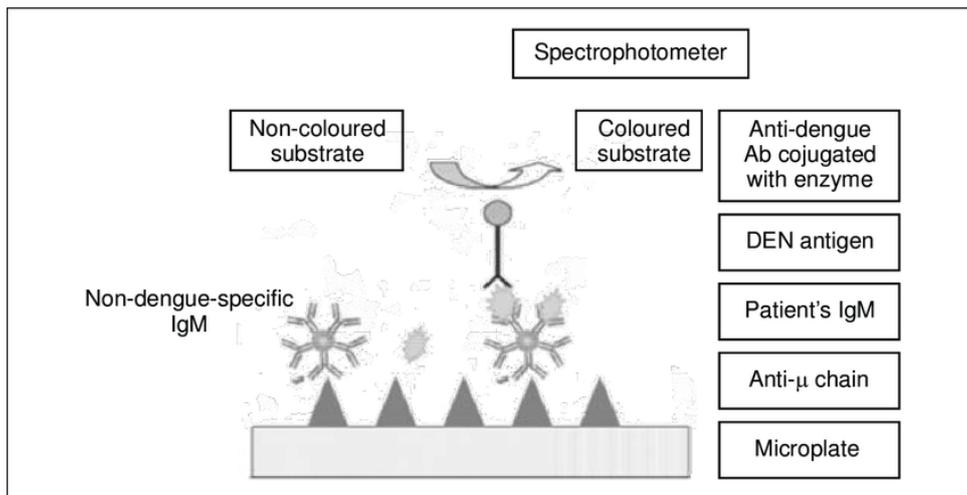
Pipetez les échantillons dilués et les sérums contrôle négatif /
standard prêts à l'emploi dans les puits microtest (100 µl)



¹Les tampons spéciaux pour les tests SERION ELISA *classic* suivants :
Borrelia burgdorferi IgG, IgM, Dengue Virus superior IgM et Epstein-Barr Virus EA IgG

²Pour une utilisation manuelle :
tapez la plaque, à la fin de la procédure de lavage, sur un papier absorbant.

Annexe 5 : Principe du MAC-ELISA(147)



Annexe 6 : Questionnaire envoyé aux patients avec une sérologie positive



VITAL
Version n° 1.0 du 07/04/2023



Questionnaire Patient

N° inclusion

Protocole VITAL

DATE :/...../.....

Merci de renvoyer ce questionnaire complété via l'enveloppe affranchie jointe

Dans quelle région vivez-vous ?

- Grand-Est Pays de la Loire Auvergne Rhône-Alpes Ile-de-France Normandie
 Occitanie Centre-Val de Loire PACA Nouvelle-Aquitaine Bretagne
 DOM-TOM

Vous vivez en :

- Milieu urbain
 Milieu rural

Êtes-vous proche de :

- Bois, forêts, lisières
 Points d'eau

Quelle est votre activité professionnelle ?

.....

Avez-vous voyagé en PACA/Occitanie ?

.....

Avez-vous voyagé dans les régions suivantes :

- Russie Europe-Centrale Est de la France

Si oui, précisez (lieu, durée) :

Êtes-vous vacciné contre :

- Le virus de la Dengue (DENGVAXIA®) Le virus de l'encéphalite Japonaise (IXIARO®)
Année : Année :
 Le virus de l'encéphalite à tiques (TICOVAC®, ENCEPUR®) Le virus de la fièvre jaune (STAMARIL®)
Année : Année :

Avez-vous déjà été mordu par une tique ?

- Oui Non

Pratiquez-vous des loisirs en forêts ? Non Oui

Si oui, précisez (vtt, randonnée, cueillette, ...) :

Consommez-vous du fromage/lait de chèvre ? Non Oui Ne sait pas

Annexe 7 : Note d'information envoyée au patient



VITAL
Version n° 2.0 du 23/06/2023



NOTE D'INFORMATION

RECHERCHE DU VIRUS DE L'ENCEPHALITE A TIQUES EN LIMOUSIN.

PROJET VITAL

Promoteur de la recherche :	Investigateur coordonnateur de la recherche :
CHU de Limoges 2 avenue Martin Luther King 87042 LIMOGES cedex	Professeur HANTZ Sébastien Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène Centre de Biologie et de Recherche en Santé CHU Limoges 87042 LIMOGES cedex Tél : 05 55 05 61 66 ✉ sebastien.hantz@chu-limoges.fr

Madame, Monsieur,

Le Pr Sébastien Hantz vous propose de participer à un projet de recherche dont le CHU de Limoges est promoteur, sur la recherche du virus de l'encéphalite à tiques.

Pourquoi cette recherche ?

Dans le cadre de l'activité de recherche clinique du CHU de Limoges, le laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène mène un projet de recherche sur le virus de l'encéphalite à tique (TBE). Les tiques sont rencontrées principalement lors de randonnées en forêts et autres activités extérieures proche des herbes hautes. Les tiques apparaissent aujourd'hui comme un groupe vecteur majeur de maladies bactériennes, virales ou encore parasitaires tant chez l'animal que chez l'Homme, la maladie de Lyme étant la pathologie la plus connue du grand public. C'est dans ce contexte, que nous nous intéressons dans ce projet à la transmission potentielle du virus de l'encéphalite à tiques (TBE). Décrit dans les pays de l'Est, cette pathologie est également présente dans l'Est de la France, de l'Alsace à la Franche-Comté. Selon les dernières données disponibles, il n'y a pas de cas d'encéphalite à tique décrit en région Limousin.

Quel est l'objectif de cette recherche ?

L'objectif de cette étude est donc de rechercher dans le sérum de patients habitant en Limousin la présence éventuelle d'anticorps dirigés contre le TBE qui suggéreraient que la personne a été en contact avec ce virus ou vaccinée par le vaccin anti-TBE.

Comment se déroule cette recherche ?

Les prélèvements biologiques utilisés (sérum) sont des reliquats de prélèvements réalisés dans le cadre du soin dont les patients ont bénéficié au CHU de Limoges et au cours duquel vous n'avez pas formulé d'opposition à leur utilisation dans le cadre de la recherche biomédicale, conformément à l'arrêté du 12 avril 2018 fixant la liste des recherches mentionnées au 3° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique. La recherche d'anticorps anti-TBE a été réalisée sur 1000 patients. Pour les patients dont le sérum est positif, un questionnaire est envoyé afin de recueillir des données complémentaires permettant de déterminer les facteurs de risque associés.

Que vous demande-t-on ?

Vous faites partie de ces patients et l'analyse de votre sérum a mis en évidence la présence d'anticorps anti-TBE témoignant soit d'un contact avec le virus soit d'une vaccination anti-TBE. Afin de mieux comprendre les circonstances ayant conduit à ce résultat, nous souhaiterions que vous remplissiez et renvoyez le questionnaire ci-joint. Sans retour de celui-ci un mois après l'envoi, un rappel vous sera fait par contact téléphonique.

Quels sont les bénéfices attendus ?

Il n'y a pas de bénéfice immédiat attendu. Le bénéfice principal de cette étude est d'apporter de nouvelles données épidémiologiques sur le virus de l'encéphalite à tique, notamment de mieux définir sa zone de circulation en France.

Quels sont les inconvénients possibles ?

Il n'y a pas d'inconvénient à cette recherche, mise à part le temps passé à compléter le questionnaire.

Quels sont vos droits ?

Concernant vos données personnelles :

Dans le cadre de cette étude, qui répond au critère d'intérêt public tel que décrit dans le Règlement Général sur la Protection des Données n°2016/679, un traitement informatique de vos données personnelles et médicales sera mis en œuvre afin de pouvoir analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de celle-ci.

Toute information vous concernant recueillie pendant cette étude sera traitée de façon confidentielle. Seuls les responsables de l'étude pourront avoir accès à ces données. A l'exception de ces personnes, qui traiteront les informations dans le strict respect du secret médical, votre anonymat sera préservé.

Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez à tout moment d'un droit d'accès et de rectification des données informatisées vous concernant (loi n° 2004-801 du 6 août 2004 modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés).

Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales, en application des dispositions de l'article L1111-7 du code de la santé publique. Si vous le souhaitez, vous pourrez consulter les résultats globaux de cette étude en faisant une demande à la direction de la Recherche Clinique du CHU de Limoges.

Concernant votre participation :

Conformément à la loi n°2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine :

- Cette recherche a obtenu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes de Sud-Est I.

Après avoir lu cette note d'information, Vous pourrez à tout moment demander des informations complémentaires au Pr Sébastien HANTZ.

Votre participation est entièrement volontaire. Vous pouvez donc faire connaître à tout moment auprès du Pr Sébastien HANTZ votre volonté de ne pas participer à cette étude, et continuerez à bénéficier de la meilleure prise en charge médicale possible, conformément aux connaissances actuelles.

Lorsque cette recherche sera terminée, si vous le souhaitez, vous serez tenus informés personnellement des résultats globaux par votre médecin dès que ceux-ci seront disponibles.

En participant à ce recensement, vous aiderez les pouvoirs publics à prendre les mesures les plus adaptées pour la prévention de cette infection.

Nous vous remercions de votre attention.

Annexe 8 : Protocole d'extraction des pools de 5 tiques adultes



Pool de 5 tiques adultes + 2 billes
de 3mm de diamètres en acier
inoxydable + 500 μ L de tampon



180 secondes de *Fast-Prep*® à
une vitesse de 4.0 m/s suivi de
300 secondes de centrifugeuse
à 20 000 tours/min

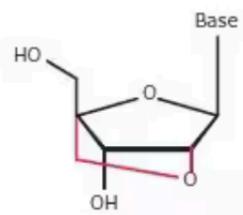


Prélever 500 μ L de
surnageant (trouble) et le
déposer dans le tampon de
lyse de l'*EasyMag*®

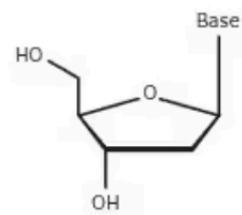
Annexe 9 : Différents protocoles réalisés dans le cadre de la mise au point de l'extraction d'ADN et d'ARN de tiques

Protocole	Tique	Aspect tique(s)	[ADN] en ng/ul	[ARN] en ng/ul	RT-PCR Ixodes R. (éluat pur)	RT-PCR Ixodes R. (éluat au 1/100ème)	RT-PCR Ixodes R. (éluat au 1/1000ème)	Remarques
500ul de tampon SDS/TRIS + 50ul de PK, incubation 1h à 56°C + 2FP (6.5m/s, 60sec), petites billes	Adulte F	Entière	NF	NF	NF	NF	NF	
500ul de tampon SDS/TRIS + 100ul de PK, incubation 17h à 56°C + 2FP (6.5m/s, 60sec) petites billes	Adulte F	Entière	NF	NF	NF	NF	NF	
Tique sèche dans tube FP, 3 FP (6.5m/s, 60sec), centr (20000g, 2min) 500ul de tampon SDS/TRIS + 50ul de PK, incubation 1h à 56°C, 1 FP (6.5m/s, 60sec), centr (20000g, 2min), 1 FP (6.5m/s, 60sec), petites billes	Adulte F	Lysée	< borne inférieure	< borne inférieure	Négative	NF	NF	
3 billes ultrathurax, 2 FP (6.5m/s, 45sec) repris dans 500ul de tampon SDS/TRIS	Adulte F	Lysée	34	16	Négative	NF	NF	
2 billes ultrathurax, 2 FP (6.5m/s, 45sec) repris dans 500ul de tampon SDS/TRIS	Adulte F	Lysée	< borne inférieure	< borne inférieure	Négative	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 1FP (6.5m/s, 45sec), petites billes	Adulte F	Entière	NF	NF	Positive (Ct : 17,7)	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), petites billes	Adulte F	Entière	NF	NF	Positive (Ct : 17,6)	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), petites billes	Adulte F	Entière	NF	NF	Négative	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), petites billes	Adulte F	Entière	NF	NF	Négative	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), petites billes	Adulte F gorgée interm.	Entière	1,99	< borne inférieure	Positive (Ct : 20,22)	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), petites billes	Adulte F gorgée	Entière	2,1	< borne inférieure	Positive (Ct : 27,83)	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), petites billes	Pool de 5 adultes F	Entières	0,415	< borne inférieure	Positive (Ct : 16,79)	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), 1 bille ultrathurax + petites billes	Adulte F gorgée complet	Entière	15,5	6,53	Positive (Ct : 14,78)	NF	Positive (Ct : 21,98)	
FP (6.5m/s, 45sec) puis 30 min de détergent à 100°C, puis FP (6.5m/s, 45sec), 1 bille ultrathurax + petites billes	Adulte F	Lysée	0,26	< borne inférieure	Négative	NF	NF	
30 min de détergent, 100°C, 2FP (6.5m/s, 45sec), 1 bille ultrathurax + petites billes	Adulte F	Lysée	< borne inférieure	< borne inférieure	Négative	NF	NF	
FP (6.5m/s, 45 sec) + reprise 500ul de tampon SDS/TRIS, 1 bille ultrathurax + petites billes	Adulte F	Lysée	1,87	< borne inférieure	Négative	NF	NF	
500ul de tampon SDS/TRIS puis FP (6.5m/s, 45sec), 1 bille ultrathurax + petites billes	Adulte F	Entière	0,17	< borne inférieure	Négative	NF	NF	
500ul de tampon SDS/TRIS puis 3 FP (4m/s, 60sec), 1 bille ultrathurax seule	Adulte F	Lysée	13,8	7,09	Négative	NF	NF	
500ul de tampon SDS/TRIS + 50ul PK, puis 3 FP (4m/s, 60sec), 1 bille ultrathurax seule	Adulte F	Lysée	51	28	Négative	NF	NF	
500ul de tampon SDS/TRIS puis 3 FP (4m/s, 60sec), 1 billes ultrathurax	Pool de 5 adultes F	Lysées	78,5	32	Négative	Positive (Ct : 16,59)	Positive (Ct : 18,39)	
500ul de tampon SDS/TRIS + écrasement manuel	Adulte F	Lysée	68,5	22,4	Négative	Positive (Ct : 21,46)	Positive (Ct : 16,86)	
500ul de tampon SDS/TRIS puis 3 FP (4m/s, 60sec), 2 billes ultrathurax	Pool de 5 adultes (3M, 2F)	Lysées	85,5	70	Négative	Négative	Négative	
500ul de tampon SDS/TRIS + écrasement manuel	Pool de 5 adultes (3M, 2F)	Lysées	38	53	Négative	Négative	Négative	

Annexe 10 : Monomères d'acide nucléique verrouillé et d'ADN (Selon Sigma-Aldrich)



Locked Nucleic Acid Monomer



DNA Monomer

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Maladies vectorielles à tiques en Limousin

Les tiques du genre *Ixodes* sont pourvoyeuses de nombreux pathogènes dont la bactérie *Borrelia burgdorferi* sensu lato, responsable de la maladie de Lyme, et le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV). Le TBEV circule de l'Asie à l'Europe de l'Est avec quelques cas décrits en France en Alsace et Haute-Savoie et une expansion des zones à risque identifiée selon un axe Est-Ouest. Majoritairement asymptomatiques, les formes cliniques peuvent être fatales avec une atteinte neurologique sévère et se compliquer de comorbidités. Le Limousin fait partie des régions potentiellement à risque de transmission du fait de la forte présence du vecteur liée à la grande surface boisée et la forte activité d'élevage. Néanmoins, aucun cas d'infection par le TBEV n'y a été décrit à ce jour. L'objectif de ce travail est donc de réaliser une étude de séroprévalence TBEV chez des patients ayant bénéficié d'un dépistage sérologique de la maladie de Lyme dans le cadre du soin entre janvier 2020 et janvier 2023 au CHU de Limoges complétée par une étude de prévalence du TBEV et de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les tiques prélevées en région Limousin. Dans cette étude, 880 patients ont été inclus et dépistés à la recherche d'anticorps dirigés contre le virus de l'encéphalite à tiques. Vingt-huit patients présentent des immunoglobulines de type G (IgG) et parmi ces échantillons, trois patients ont un titre élevé en anticorps neutralisants le TBEV. L'un d'eux, originaire de Corrèze et présentant de nombreux facteurs de risque d'exposition sans argument en faveur d'une réactivité croisée sérologique, pourrait avoir contracté une infection par le TBEV. La recherche du virus dans le vecteur n'a retrouvé aucune tique porteuse de TBEV sur 470 *Ixodes* analysées. En revanche, le taux d'infection des tiques par *Borrelia burgdorferi* sensu lato est au minimum de 10%. Une analyse de plus de 4000 tiques viendra en complément de cette étude.

Mots-clés : *Virus de l'encéphalite à tiques, TBEV, Borrelia burgdorferi, Tiques, Limousin*

Tick borne diseases in Limousin

Ticks of the genus *Ixodes* are purveyors of numerous pathogens, including the bacteria *Borrelia burgdorferi* sensu lato, responsible for Lyme disease, and tick-borne encephalitis virus (TBEV). TBEV circulates from Asia to Eastern Europe, with a few cases described in France in Alsace and Haute-Savoie, and an expansion of identified risk zones along an East-West axis. Mostly asymptomatic, clinical forms can be fatal, with severe neurological damage and comorbidities. Limousin is one of the regions potentially at risk of transmission, due to the vector's strong presence, linked to its large wooded area and livestock farming activities. Nevertheless, no case of TBEV infection has been described to date. The aim of this study is therefore to investigate the seroprevalence of TBEV in patients who underwent serological screening for Lyme disease between January 2020 and January 2023 at the Limoges University Hospital, complemented by a study of the prevalence of TBEV and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected in the Limousin region. In this study, 880 patients were included and screened for antibodies to tick-borne encephalitis virus. Twenty-eight patients were found to have type G immunoglobulins (IgG), and among these samples, three patients had high titres of TBEV-neutralizing antibodies. One of them, originally from Corrèze and presenting numerous exposure risk factors with no evidence of serological cross-reactivity, could have contracted a TBEV infection. The search for the virus in the vector revealed no TBEV-carrying ticks out of 470 *Ixodes* analyzed. In contrast, the infection rate of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato is at least 10%. An analysis of over 4,000 ticks will complement this study.

Keywords : *Tick-borne encephalitis virus, TBEV, Borrelia burgdorferi, Ticks, Limousin*

