



2^{ème} Année de Master

Mention Biodiversité-Ecologie-Evolution (BEE)

Parcours Biologie Intégrative des Interactions (B2I)

Université de Montpellier

RAPPORT DE STAGE

CYTICKS, TICKS IN THE CITY

**Communautés microbiennes des tiques en milieux urbains
et périurbains**



Présenté par **Anaëlle SANCHEZ**

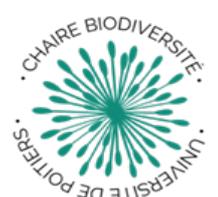
Maîtres de stage : Didier Bouchon, Meriem Louni

Laboratoire/organisme : EBI, équipe EES - Poitiers

Période de stage : 23 janvier 2023 – 21 juillet 2023

Date de soutenance : 8 juin 2023

Année universitaire 2023/2024



1. INTRODUCTION

Les changements globaux tels que le réchauffement climatique, ou encore la fragmentation des paysages due à l'urbanisation, entraînent une réorganisation des territoires et une perturbation des écosystèmes. Les aires de répartition de certaines espèces sont alors modifiées et les contacts entre la faune sauvage et les différents animaux domestiques deviennent plus fréquents ce qui peut favoriser l'émergence de zoonoses (CGDD, 2022) (**Figure 1**). Ces maladies, représentant 60% des maladies infectieuses humaines, se transmettent de l'Homme à l'animal et inversement par l'intermédiaire d'espèces vectrices (OIE, 2020). Les aires de distribution des vecteurs étant modifiées, celles des pathogènes qu'ils abritent le sont également. Les vecteurs sont principalement des insectes comme les moustiques, premiers vecteurs mondiaux et des acariens hématophages comme les tiques, premiers vecteurs de pathogènes en Europe (ANSES, 2022). Comprendre la dynamique des hôtes et de leurs différents parasites, en prenant en compte l'impact des changements environnementaux et des activités humaines permet de comprendre la distribution, l'abondance ou la virulence des différents agents pathogènes qu'ils abritent (Jourdain et Paty, 2019 ; Boussaa, 2008).

Les tiques sont des arthropodes portant une grande diversité de micro-organismes tels que des bactéries, des protozoaires, des nématodes et des arbovirus, dont les effets sur l'hôte s'étendent le long d'un continuum entre le mutualisme et le parasitisme, (Narasimhan et Fikrig, 2015 ; Parola et Raoult, 2001). Les tiques sont également bien connues pour leur capacité à vectoriser des pathogènes impliqués dans la propagation de maladies émergentes infectant les Hommes. Parmi les agents infectieux dont l'aire de répartition s'étend en France, on observe le virus TBE (Tick Borne Encephalitis) responsable de la méningo-encéphalite à tiques, les bactéries de la famille de *Rickettsiaceae* responsables de la fièvre boutonneuse méditerranéenne (FBM), et principalement la bactérie *Borrelia burgdorferi* responsable de la maladie de Lyme, vectorisée par *Ixodes ricinus* (Burgdorfer *et al.*, 1982 ; Layouni, 2018). C'est une des maladies qui progresse le plus dans l'hémisphère Nord, avec 60 000 cas par an estimés en France selon les données de l'OMS (2020).

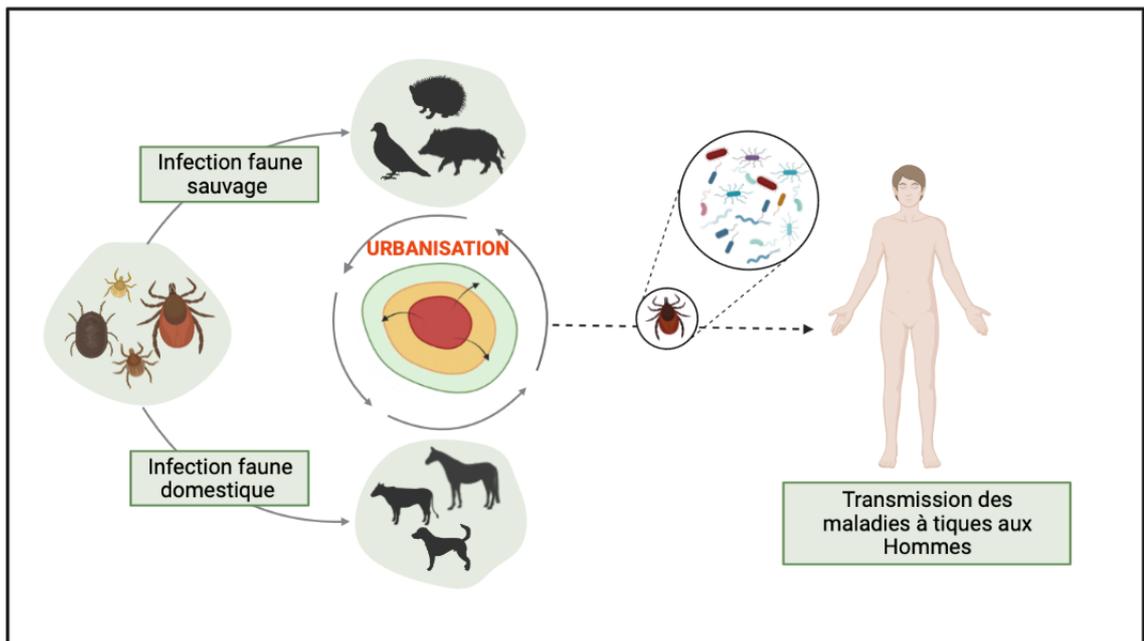


Figure 1 : Schéma explicatif du contexte de l'étude : l'urbanisation entraîne une augmentation des contacts entre la faune sauvage et la faune domestique, infectées par les tiques. Les risques de transmission des maladies à tiques aux Hommes sont donc plus importants.

Les tiques sont réparties en trois grandes familles. Les deux principales sont les familles des *Ixodidae* (ou tiques dures, environ 700 espèces), et celle des *Argasidae* (ou tiques molles, environ 200 espèces). La troisième famille, celle des *Nuttalliellidae*, est composée d'un seul genre *Nuttalliella* dont une seule espèce est décrite (Perez-Eid et Gilot, 1998). La gamme d'hôtes vertébrés des *Ixodidae* et des *Argasidae* est similaire (mammifères, oiseaux, reptiles) mais ces deux familles se distinguent l'une de l'autre par des traits écologiques différents (McCoy et Boulanger, 2015). En effet, les tiques dures sont présentes dans l'ensemble des biotopes, principalement dans des milieux ouverts, tandis que les tiques molles sont retrouvées dans des milieux fermés, proches de leur hôte avec une préférence pour les climats tempérés et chauds.

Les tiques sont des insectes strictement hémaphages, c'est-à-dire qu'elles se nourrissent exclusivement de sang tout au long de leur cycle de développement. Les tiques dures n'ont besoin que d'un seul repas de sang à chacun de leurs trois stades de vie (larve, nymphe, adulte), tandis que les tiques molles prennent plusieurs courts repas de sang aux stades nymphal et adulte et ont un nombre variable de stades nymphaux (Kada *et al.*, 2017). Ce mode de nutrition favorise la transmission de pathogènes ; la durée des repas sanguins et donc celle de l'attachement à l'hôte déterminent la probabilité de transmission des maladies. Le sang constitue un régime alimentaire riche en protéines et en lipides mais très pauvre en nutriments comme les vitamines B (Duron et Gottlieb, 2020 ; Duron *et al.*, 2017). Or de nombreuses études ont permis de démontrer que les vitamines B étaient essentielles au développement de ces arthropodes (Buysse *et al.*, 2018). Ainsi, au cours de leur histoire évolutive, les tiques ont développé des interactions mutualistes avec des micro-organismes, principalement des bactéries (Duron et Gottlieb, 2020) qui leur permettent d'équilibrer leur régime alimentaire en fournissant les voies de synthèse de vitamines, mais également celles d'acides aminés, d'enzymes ou encore de lipides (Smith *et al.*, 2015). On distingue différentes modalités d'acquisition de ces symbiotes : par transmission verticale de la mère aux descendants (Duron *et al.*, 2015), ou par transmission horizontale à partir de l'environnement ou lors du repas sanguin sur des vertébrés (Narasimhan et Fikrig, 2015). Dans certains cas, les symbiotes hérités de la mère ont évolué vers une relation mutualiste obligatoire en devenant indispensables à la survie de l'hôte (Bonnet et Pollet, 2021).

La présence de symbiotes dit obligatoires a été mise en évidence chez plusieurs espèces de tiques, dures et molles. On retrouve principalement des bactéries du genre *Coxiella*, *Francisella*, *Rickettsia*, impliquées dans la supplémentation en vitamines B8, B9 et B2 (respectivement la biotine, l'acide folique et la riboflavine) et chez certaines espèces dans la reproduction en influençant le sex-ratio (Smith *et al.*, 2015 ; O *et al.*, 2018 ; Hunter *et al.*, 2015 ; Duron, 2018) Il existe au contraire, des symbiotes facultatifs (non indispensables à la survie de l'hôte) qui manipulent la reproduction (comme les bactéries du genre *Wolbachia*), protègent contre les ennemis ou encore permettent à leurs hôtes de s'adapter aux changements environnementaux (comme *Hamiltonella defensa*, endosymbiotes bactériens facultatifs de plusieurs espèces de pucerons) (Moran *et al.*, 2008 ; Oliver *et al.*, 2010).

Les pathogènes transmis par les tiques coexistent avec des micro-organismes non pathogènes, le tout formant le microbiote (Lejal *et al.*, 2020). Ce microbiote peut jouer un rôle dans l'acquisition, la multiplication ou la transmission d'agents pathogènes portés par les tiques, avec de potentielles conséquences sur leur capacité de vectorisation (Bonnet *et al.*, 2017). Cette interaction entre le microbiote, le pathogène et le vecteur a donc des répercussions sur la santé humaine et animale (Vayssier-Taussat *et al.*, 2015 ; Narasimhan *et al.*, 2015). Connaître la composition du microbiote permet de mieux comprendre les mécanismes de transmission et d'acquisition des agents pathogènes, et possiblement de mettre en place des stratégies de lutte contre les maladies à tiques. Cependant, plusieurs études ont montré que la composition du microbiote était susceptible de varier en fonction de plusieurs facteurs comme l'environnement, la température, les saisons ou la présence de pathogènes dans l'environnement (Bonnet *et al.*, 2021).

Le risque de transmission chez l'homme d'une maladie vectorielle est directement relié à l'abondance des vecteurs et des réservoirs animaux mais également à la fréquence des rencontres humains-tiques (Ferrouillet *et al.*, 2014). Connaître la distribution géographique des tiques, leur diversité ainsi que leur abondance permet d'apporter des informations sur les espèces hôtes présentes en fonction des conditions environnementales (température, urbanisation...) et par conséquent sur les pathogènes pouvant potentiellement circuler dans ces zones.

Tableau 1 : Tableau descriptif des différents sites d'échantillonnage. Les propriétaires, la gestion, les types de fréquentations et les modalités d'accès ont été indiqués.

Site	Coordonnées GPS	Propriétaire	Gestion	Fréquentation	Accès
Chemin des Deux Croix, Ligugé	46.52228436369216, 0.31958884876956356	Commune de Ligugé	Eco-pâturage	Fréquentation animale (en lien avec la gestion)	Clôturé, demander accès
Parc de Blossac, Poitiers	46.573500378374995, 0.3304224324436011	Commune de Poitiers	Fauche tardive	Forte fréquentation à forte proximité pour la promenade	Libre
Parc des Sablons, Mignaloux-Beauvoir	46.5696940186601, 0.39490807186091775	Commune de Poitiers	Fauche tardive annuelle	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre
Jardin Public, Chauvigny	46.56811880026109, 0.6504747945067004	Commune de Chauvigny	Tonte classique	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre
Miléterie, Poitiers	46.56262169966235, 0.3818339651916927	Grand Poitiers	Fauche biannuelle	Pas de fréquentation	Clôturé, demander accès
Boulevard René Cassin, Poitiers	46.573108326839304, 0.37891077677400387	Grand Poitiers	Eco-pâturage	Fréquentation animale (en lien avec la gestion)	Clôturé, demander accès
Rue des Geays, Fontaine-le-Comte	46.53570745885125, 0.2625485266848482	Grand Poitiers	Tonte	Fréquentation à proximité pour la promenade	Clôturé, demander accès
Le Deffend, Mignaloux-Beauvoir	46.556740238433555, 0.40850560769678695	Université de Poitiers	Tonte	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre
Parc du Triangle d'Or, Poitiers	46.56456874049791, 0.3453624042306518	Commune de Poitiers	Fauche tardive annuelle	Pas de fréquentation	Libre
Charassé, Montamisé	46.62041087741216, 0.4673842094772333	Grand Poitiers	Fauche tardive annuelle	Pas de fréquentation	Clôturé, demander accès
Route de Gençay, Saint-Benoît	46.55984015652964, 0.3581494552893162	Grand Poitiers	Fauche tardive annuelle	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre
Parc du Pré-sec, Migné-Auxances	46.63293814712401, 0.33912535845948544	Grand Poitiers	Fauche tardive annuelle	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre
Parc de la Robla, Buxerolles	46.59633653639737, 0.37080019462788355	Grand Poitiers	Fauche tardive annuelle	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre
Avenue Charles de Gaulle, Ligugé	46.52291184843685, 0.3232634750258494	Grand Poitiers	Tonte ou fauche	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre
Parc de la Comberie, Migné-Auxances	46.62668064954092, 0.31723961035579323	Commune de Migné-Auxances	Tonte classique	Fréquentation à proximité pour la promenade	Libre

Cette étude s'inscrit dans les projets "CiTicks, Ticks in the City" financé par la Chaire Biodiversité de l'Université de Poitiers et l'ANR "MICROM" ([ANR-21-CE02-0002](#)) dont l'objectif est d'identifier les mécanismes évolutifs qui conduisent à la dynamique des interactions mutualistes chez les tiques. L'axe principal est d'identifier les microbiotes de différentes espèces de tiques et les pathogènes qu'ils peuvent transmettre afin d'évaluer l'importance de la compétition au sein de ces communautés microbiennes. La dynamique des populations de tiques en milieu naturel est peu connue, ainsi que la distribution des pathogènes qu'ils transmettent. Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons à des zones dites périurbaines, de plus en plus fréquentées où les contacts entre faune sauvage et domestique peuvent être favorisés. Il est donc nécessaire, dans un premier temps, de connaître la diversité et l'abondance des différentes espèces de tiques dans ces zones. Dans un second temps, le microbiote bactérien de chaque individu doit être déterminé par métabarcoding, et avec un focus sur les éventuels pathogènes abrités par ces vecteurs.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Préparation du matériel biologique

2.1.1. Collecte

Un partenariat avec « Le champ des possibles », une entreprise du paysage spécialisée dans l'éco-pâturage, et avec Grand Poitiers Communauté Urbaine a été mis en place, nous permettant d'échantillonner dans diverses zones urbaines et périurbaines (**tableau 1** et **figure 2**). La collecte a été faite à l'aide de la méthode du drap (Aeschlimann, 1972). Elle consiste à passer sur le sol un drap blanc d'un m² en bordure de chemin. Ce drap est retourné tous les 20 mètres environ afin de récupérer, à l'aide d'une pince à dissection, les tiques qui s'y trouvent accrochées. Le drap a été passé pendant une heure sur chaque zone, par la même personne, afin de limiter les biais. Après chaque collecte, les tiques sont placées dans des tubes Falcon 50 ml, dont le bouchon a été remplacé par du tulle, et conservées dans une enceinte climatique Memmert (26°C et 80% d'humidité).

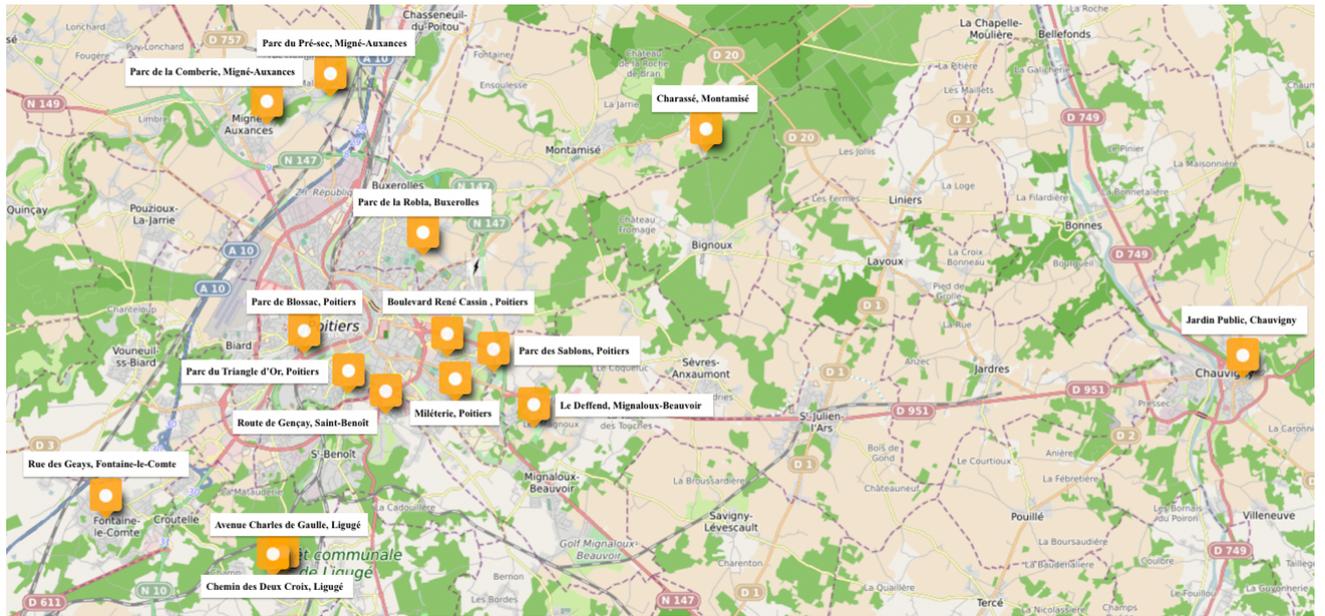


Figure 2 : Cartographie des différentes zones urbaines et péri-urbaines d'échantillonnage des tiques dures réalisée par Grand Poitiers

2.1.2. Identification des morphotypes

Les tiques sont ensuite identifiées par morphotype et sexées sous une loupe binoculaire grâce à des clés d'identification présentes dans le livre "Les tiques" de Perez-Eid (Perez-Eid, 2017). Les individus sont triés en fonction de leur morphotype, de leur stade de vie et de leur sexe.

2.1.3. Extraction et quantification de l'ADN total

Avant l'extraction d'ADN, les tiques sont désinfectées afin d'éviter les contaminations (Binetruy *et al.*, 2019). Chaque tique a été traitée individuellement. La désinfection des individus se fait par plusieurs lavages. Dans un premier temps, les tiques ont été lavées avec de l'eau et un détergent (nettoyant Argos) dans des tubes Falcon 50 ml, puis plusieurs rinçages à l'eau sont réalisés afin d'enlever toute trace de savon. Les tiques sont ensuite lavées à l'eau de javel 1% pendant 1 min, puis à l'éthanol pendant 1 min, et à l'eau distillée ou MilliQ pour 2 lavages de 1 min chacun. Elles sont placées sur un papier buvard afin qu'elles sèchent quelques minutes.

Les tiques sont coupées en plusieurs morceaux à l'aide d'un scalpel. Elles sont ensuite placées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml avec 200 µl de tampon ATL (solution tampon de lyse) du kit d'extraction manuel Qiagen (Tissue) et sont broyées aussi finement que possible à l'aide d'un pilon. Les échantillons vont ensuite subir un traitement par sonication de 2 fois 5 secondes pour permettre une meilleure extraction du matériel biologique par lyse cellulaire. Les tubes sont maintenus dans la glace entre chaque passage. Afin de digérer les protéines, un volume de 20 µl de protéinase K sont ajoutés. Cette enzyme est utilisée pour le clivage des protéines lors de la préparation des acides nucléiques (ADN ou ARN). Les échantillons sont agités et placés une nuit à 56°C dans un bain sec, afin d'activer l'enzyme. La suite de l'extraction est réalisée en suivant les instructions du Kit d'extraction manuel Qiagen (Tissue). La totalité du protocole est indiqué en **annexe 1**. Les ADN extraits sont quantifiés. Deux méthodes sont utilisées : une par spectrophotométrie (Nanodrop) qui permet l'analyse de micro-volumes d'acides nucléiques (ADN et ARN) et de protéines, et l'autre en utilisant des sondes fluorophores (Qubit) qui se fixent spécifiquement à leur ADN, ARN ou protéines cibles. La méthodologie de ces techniques de quantification est détaillée en **annexe 2**.

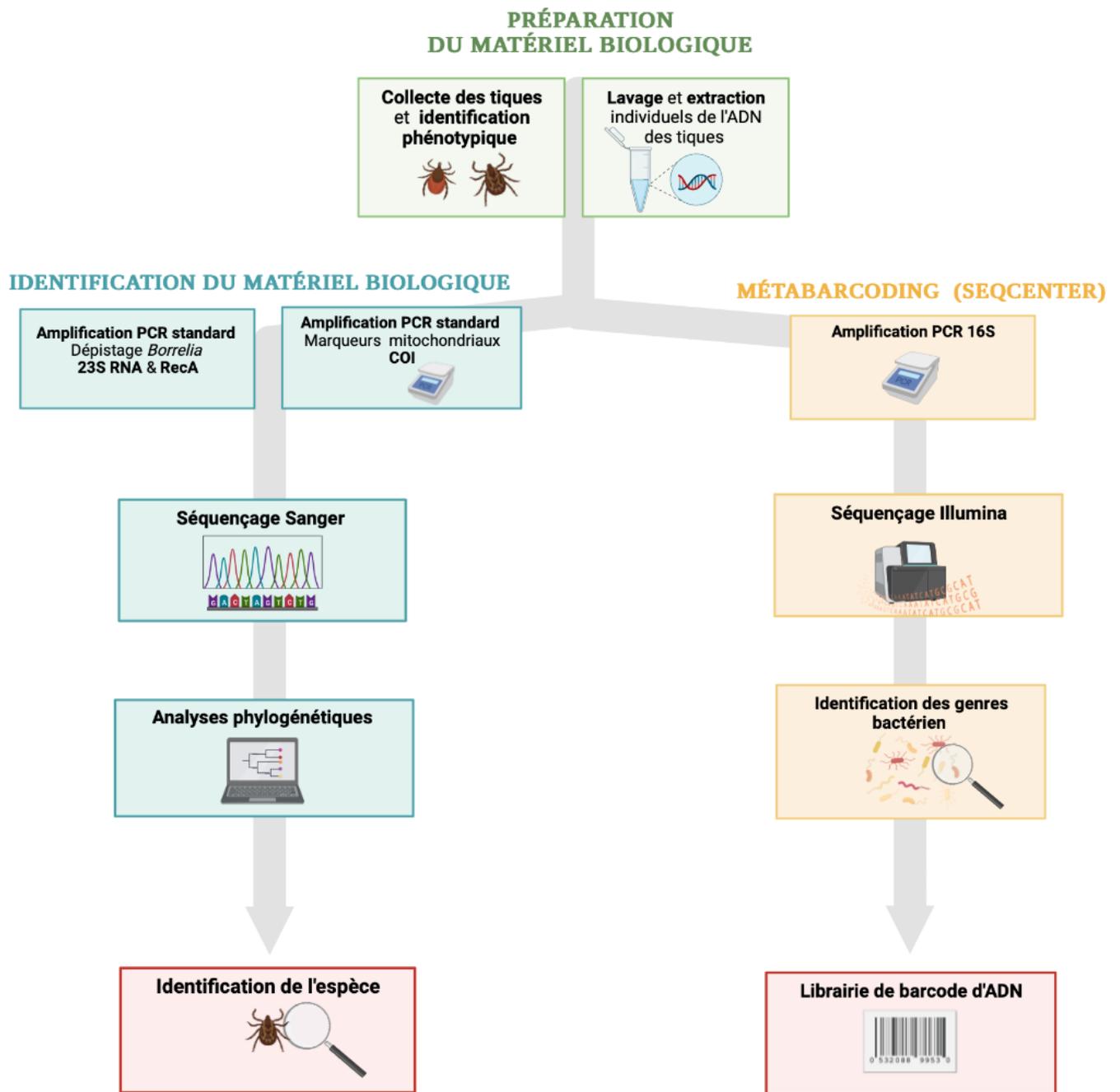


Figure 3 : Schéma récapitulatif des différentes manipulations effectuées lors de ce stage.

2.2. Identification moléculaire des tiques

2.2.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique de PCR permet l'amplification d'un fragment spécifique d'ADN, ciblé par des amorces. Le marqueur choisi dans cette étude est un gène mitochondrial codant la première sous-unité de la cytochrome oxydase (*COI*) (Trzeby et *al.*, 2022). La PCR est réalisée avec les amorces LCO et HCO ciblant un fragment de 700 pb de ce gène (Folmer et *al.*, 1994) (voir les séquences des amorces utilisées en **annexe 3**). Les réactions d'amplification sont réalisées en utilisant un "mix" de PCR dont la composition est détaillée en **annexe 4**, ainsi que le programme d'amplification. Dans certains cas, le protocole est optimisé en ajoutant du Chlorure de magnésium (MgCl₂), jouant le rôle de cofacteur de la polymérase. Pour cette réaction, le mix de PCR et le programme d'amplification sont modifiés (**annexe 4**).

2.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier que les produits de PCR sont ceux attendus, une migration sur gel d'agarose est réalisée. Cette technique permet de séparer les molécules en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. Un volume de 5 µl de produit de PCR est mélangé à 2.5µl de tampon de charge avant d'être déposé sur un gel d'agarose à 1.5%. Le gel est placé dans une cuve de TAE 0.5X, où les produits de PCR migrent 30 à 35 minutes à 100V. Après migration, le gel est déposé dans un bain de Bromure d'Éthidium (BET) pendant 15 à 20 minutes avant de révéler les produits obtenus sous UV à l'aide d'un trans-illuminateur.

2.2.3. Séquençage des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés selon une méthode qui repose sur l'action combinée de deux enzymes : l'Exonucléase I et la AnP (Antarctic Phosphatase) afin d'éliminer les oligonucléotides et les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPS) présents en excès dans la réaction de PCR. Le protocole est détaillé en **annexe 5**. Les produits de PCR purifiés subissent une réaction de séquençage de type Sanger et une purification par précipitation (**annexe 6**). Les échantillons purifiés ont été séquencés à l'aide de l'analyseur génétique SeqStudio Life Technologies (Applied Biosystems).

2.2.4. Analyses phylogénétiques

Les séquences obtenues forward et reverse de chaque échantillon sont assemblées et les chromatogrammes obtenus sont vérifiés manuellement à l'aide du logiciel ChromasPro. Les séquences finales enregistrées au format FASTA sont comparées à celles de la banque de données GenBank grâce à l'outil BLAST (version 2.13.0)(Altshul et *al.*, 1990) du site NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cette interrogation des banques permet également de trouver des séquences de références similaires à celles des différentes espèces de tiques afin de construire un arbre phylogénétique. L'arbre est construit à l'aide du logiciel MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) par la méthode du Neighbor-joining avec un bootstrap de 1000 et selon le modèle Kimura 2-parameter .

2.3. Dépistage des bactéries du genre *Borrelia*

Plusieurs diagnostics par PCR ont été réalisés soit en utilisant les amorces Bo_bu_sl_23S_F et Bo_bu_sl_23S_R ciblant l'ARN ribosomique 23S (73pb) de *Borrelia* spp. (Michelet *et al.*, 2014) soit en amplifiant spécifiquement un fragment de 222 pb du gène *RecA* de la bactérie *Borrelia burgdorferi* en utilisant les amorces RecF et RecR (Chan *et al.*, 2013). Les réactions de PCR suivent le protocole décrit précédemment pour l'amplification du gène *COI* et seules les températures d'hybridation ont été modifiées en fonction des couples d'amorces : 53°C pour RecF/RecR et 50°C pour Bo_bu_sl_23S_F/Bo_bu_sl_23S_R.

Une migration sur gel d'agarose à 2% des produits obtenus est réalisée selon le protocole décrit en **annexe 7**. La concentration du gel a été augmentée afin de ralentir la vitesse de migration et permettre la séparation des fragments d'ADN de plus petite taille.

2.4. Analyse du microbiote par métabarcoding

2.4.1. Principe

Le métabarcoding de microbiote permet d'identifier l'ensemble des microorganismes présents chez un individu, à l'aide d'un séquençage à haut débit (NGS, Next Generation Sequencing) utilisant la technologie Illumina NextSeq 2000.

Dans le cas de communautés bactériennes, le barcode choisi est le gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomique (ARNr 16S). Les séquences sont regroupées par similitude puis assignées à des taxons par comparaison à des séquences de référence.

Les échantillons ont été préparés à l'aide du kit Quick-16S de Zymo Research avec des amorces (**annexe 4**) ciblant les régions V3/V4 du gène 16S. Les échantillons ont été séquencés sur une cellule P1 600cyc NextSeq2000 pour générer des lectures de 2 x 301bp paired-end (PE). Pour le traitement des données, les séquences ont été importées dans le pipeline Qiime2 (Bolyen *et al.*, 2018). Les adaptateurs ont été filtrés à l'aide de l'outil *cutadapt3*. Les erreurs ont ensuite été corrigées à l'aide du module *dada2*. L'assignation taxonomique à des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) a été réalisée en utilisant la base de données complète SILVA version 138.1 (https://www.arb-silva.de/no_cache/download/archive/). La fréquence relative des OTUs au sein d'un échantillon est ensuite calculée.

2.4.2. Analyses statistiques des données de métabarcoding

L'ensemble des données a été analysé à l'aide du package DADA2 (1.22.0)(Callahan *et al.*, 2016) dans R (R Core Team, 2022), y compris le contrôle de la qualité, l'estimation du taux d'erreur, la fusion des lectures avant/arrière, l'élimination des chimères, la détermination des variants de séquence ribosomique (ASV amplicon sequence variants) et l'assignation des taxons à la base de données SILVA, à des fins de comparaison. Les diversités alpha et bêta ont été calculées avec les packages *pyhloseq* (1.38.0) et *vegan* (2.6-4) et visualisées avec le package *ggplot2* (3.2.1)

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des tiques collectées lors de cette étude. Le site de collecte, le stade larvaire, l'effectif et le sexe ont été indiqués. Les différents traitements appliqués aux échantillons (+) ou non (-) sont indiqués.

Références	Origine	Morphotype	Stade larvaire	Effectif	Sexe	COI	Borrelia (70pb)	Borrelia (200pb)	Séquençage	SeqCenter
T1.S	Montpellier	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1 /		+	-	-	+	-
T2.S	Montpellier	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1 /		+	-	-	+	-
TD1 (T1)	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	-	-	+	-
T2	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	-	-	+	-
TD2 (T2)	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	-
TH2 (T3)	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	29	Femelle	+	+	+	+	-
TH1 (T3)	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	9	Mâle	+	+	+	+	-
T4	Breuil Mingot	<i>Ixodes</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	-
TIF 1 (T5)	Breuil Mingot	<i>Ixodes</i>	Nymphe	10 /		+	+	+	+	-
TIF 2 (T5)	Breuil Mingot	<i>Ixodes</i>	Nymphe	10 /		+	+	+	+	-
TPS	Plaine des sables	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	-	-
TM1	Moutons	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	-	-
TM2	Moutons	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	-	-
TVC1	Vallée Clain	<i>Dermacentor</i>	Adulte	2	Mâle	+	+	+	-	-
TVC2	Vallée Clain	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	-	-
TPB1	Parc botanique	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	-	-
TPB2	Par botanique	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	-	-
T1M	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T2M	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T3S	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T4S	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T5F	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T6F	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
/	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	12	Mâle	-	-	-	-	-
/	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	6	Femelle	-	-	-	-	-
T1DF	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T2DF	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T3DF	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T4DF	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T5DF	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T6DF	Breuil Mingot	<i>Dermacentor</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
TIR1	Breuil Mingot	<i>Ixodes ricinus</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
TIR2	Breuil Mingot	<i>Ixodes ricinus</i>	Adulte	1	Mâle	-	-	-	-	-
/	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	9	Mâle	-	-	-	-	-
/	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	17	Femelle	-	-	-	-	-
T1HM	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T2HM	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T3HM	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T4HM	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T5HM	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T6HM	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Mâle	+	+	+	+	+
T1HF	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T2HF	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T3HF	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T4HF	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T5HF	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
T6HF	Breuil Mingot	<i>Haemaphysalys</i>	Adulte	1	Femelle	+	+	+	+	+
Total		/	/	142	/	42	38	38	35	25

3. RÉSULTATS

3.1. Identification taxonomique des tiques

Au total, 142 tiques ont été collectées sur l'ensemble des sites. La densité des tiques collectées est visiblement plus importante dans les zones périurbaines et rurales (n=132) (Breuil Mingot, Vallée du clain) que dans les zones urbaines (n=10) (Plaine des sablons, parc botanique, Parc de Blossac, Parc du Pré-sec, Parc de la Colomberie, Parc de la Robla) (**tableau 2**). Sur l'ensemble des tiques échantillonnées, 122 adultes et 20 nymphes ont été identifiées. A la suite des observations à la loupe binoculaire et grâce aux clés d'identification, le genre des différentes tiques a pu être estimé. Les 20 nymphes collectées appartiennent au genre *Ixodes*. Parmi les 69 femelles adultes, 17 appartiennent au genre *Dermacentor* et 52 au genre *Haemaphysalis*. Sur l'ensemble des 73 mâles, 49 sont des *Dermacentor*, 24 sont des *Haemaphysalis*, et 3 sont des *Ixodes*.

Par la suite, 42 individus, représentant les différents morphotypes collectés, sont sélectionnés et traités en suivant les différents protocoles décrits précédemment afin de réaliser des PCR ciblant le gène *COI* afin de déterminer précisément leur espèce. Après plusieurs optimisations des protocoles d'amplification, 33 échantillons ont pu être amplifiés. Pour les 9 échantillons restants, le protocole de PCR avec ajout de MgCl₂ est appliqué, nous permettant d'obtenir 5 échantillons supplémentaires. Parmi ces 42 échantillons, 35 échantillons provenant d'une même zone périurbaine (Breuil Mingot) sont séquencés. Le séquençage a été concluant chez 17 échantillons, nous permettant d'identifier 11 *Dermacentor marginatus*, 6 *Haemaphysalis inermis*. Le **tableau 3** indique la couverture et l'identité des séquences obtenues par rapport aux séquences de référence de GenBank. La phylogénie du gène *COI* inclut 17 séquences dont le microbiote a été analysé, appartenant à 2 espèces (*D.marginatus* et *H.inermis*), 26 séquences de référence ainsi qu'un out-group (**figure 4**). Pour ce marqueur mitochondrial, les individus de chaque espèce se regroupent ensemble, avec une faible diversité intraspécifique pour la majorité des espèces.

Tableau 3 : Confirmation moléculaire des différents morphotypes observés grâce à l’outil BLAST du site NCBI. Les différents morphotypes observés sont indiqués ainsi que le pourcentage de couverture et d’identité entre nos séquences et celles de la base de données.

Echantillons	Morphotypes	Espèces	Couverture	Identité
3M	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,49%
4S		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,83%
T3D		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,83%
T1D		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,83%
2D		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,66%
2M		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,83%
1M		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,66%
T6D		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,66%
T5D		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,29%
T4D		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,66%
5F		<i>Dermacentor marginatus</i>	100%	99,66%
T4HF	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>Haemaphysalis inermis</i>	100%	99,64%
T6HF		<i>Haemaphysalis inermis</i>	100%	99,28%
T5HF		<i>Haemaphysalis inermis</i>	100%	99,26%
T1HM		<i>Haemaphysalis inermis</i>	100%	99,82%
T4HM		<i>Haemaphysalis inermis</i>	100%	99,14%
T1HF		<i>Haemaphysalis inermis</i>	100%	99,65%

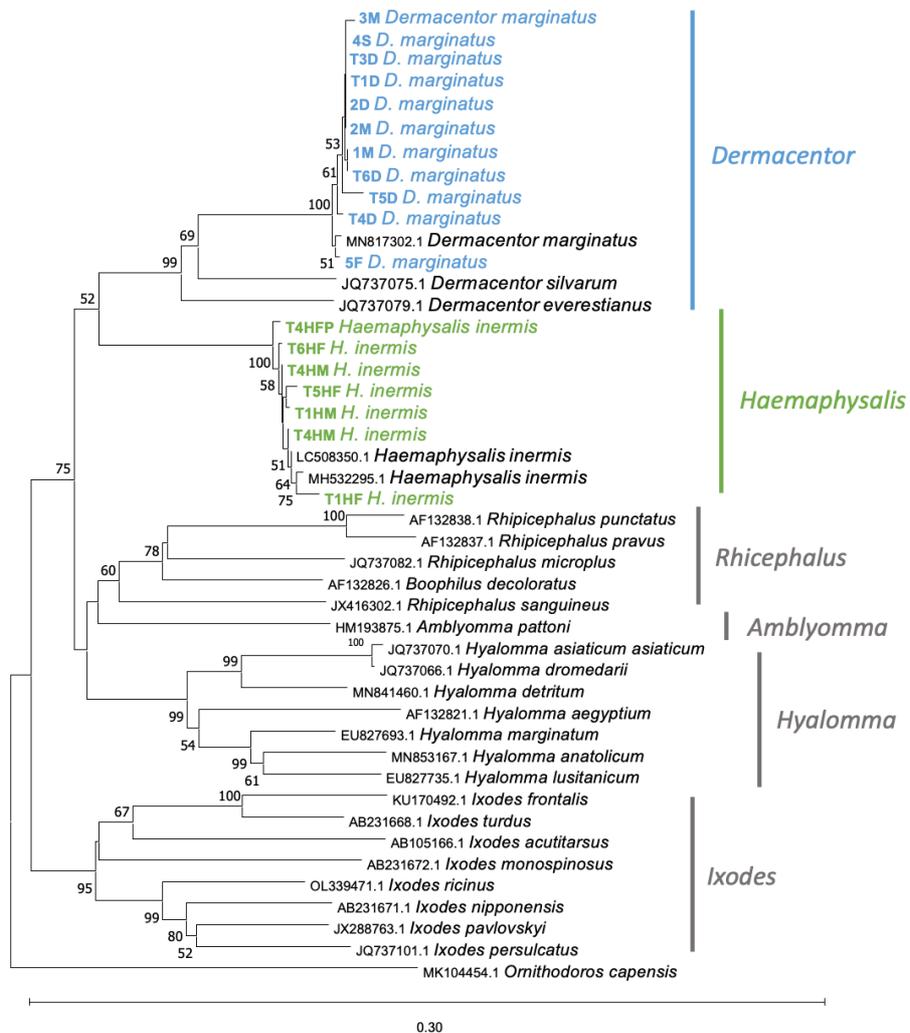


Figure 4 : Arbre phylogénétique des tiques dures basé sur le gène mitochondrial COI (700pb) (neighbor joining, méthode bootstrap, modèle Kimura 2-parameter). Nos échantillons sont représentés en bleu (*D. marginatus*) et en vert (*H. inermis*). Seuls les bootstraps supérieurs à 50% sont indiqués.

3.1.1. Dépistage des bactéries du genre *Borrelia*

Afin de vérifier la présence ou non de *Borrelia* spp. dans nos échantillons, 28 individus sont sélectionnés pour réaliser des PCR diagnostiques. Pour la première PCR ciblant le l'ARN ribosomique 23S de *Borrelia* spp., 27 des échantillons sont positifs (**figure 5A et 5B**). Ces échantillons ne seront pas séquencés car on s'attend à une très faible variation entre nos échantillons, le fragment ciblé ayant une taille très petite (73 bp) dans une zone très conservée. Pour la deuxième PCR, ciblant cette fois-ci le gène *RecA* de la bactérie *Borrelia burgdorferi*, sur les 28 échantillons, seul un échantillon est positif (**figure 5C**). Ce dernier a été séquencé mais la quantité d'ADN initialement présente (7.04 ng/μl) n'était pas suffisante pour obtenir des résultats exploitables.

3.1.2. Analyse des microbiotes

Au total, 25 échantillons ont été envoyés à la plateforme NextSeq2000 de SeqCenter (91 43rd St Suite 250, Pittsburgh, PA 15201, États-Unis) . Ces échantillons proviennent tous du même site d'une zone périurbaine (site du Breuil Mingot) où la densité et la diversité de tiques étaient les plus importantes.

Afin de mieux visualiser la distribution des bactéries composant le microbiote des tiques dures, un diagramme en barres des 20 familles les plus abondantes au sein de chaque échantillon est représenté **figure 6**. Sur l'ensemble des échantillons, les embranchements les plus abondants sont les Protéobactéries (93.4%) et les Firmicutes (4.2%). En observant la répartition des familles les plus abondantes dans les 25 échantillons, des différences de diversité et d'abondance sont constatées. Les *Coxiellaceae* sont les bactéries les plus abondantes (entre 90.7% et 98.4%) chez la majorité des femelles *H. inermis* (n=6) et *D. marginatus* (n=6), elles le sont aussi chez 5 mâles *D. marginatus* et 5 mâles *H. inermis* (entre 60.6% et 97.5%).

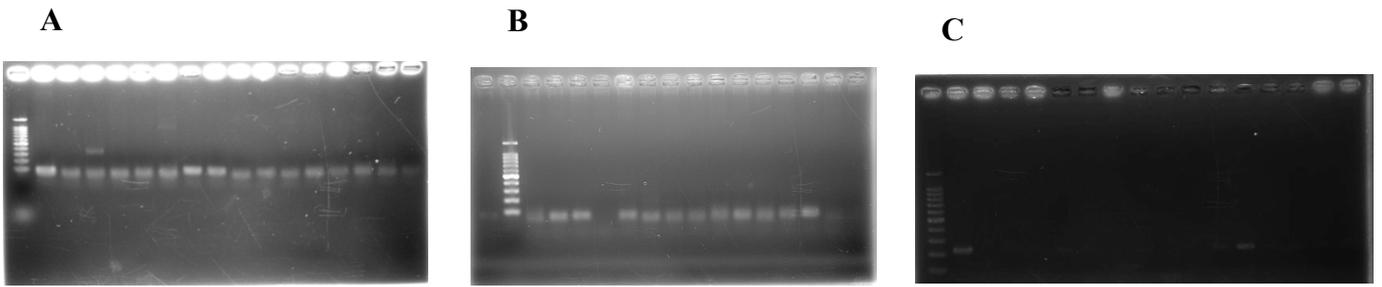


Figure 5 : Gels de visualisation des produits de PCR. Les PCR ont été réalisées avec les amorces Bo_bu_sl_23S_F/Bo_bu_sl_23S_R ciblant l'ARN ribosomique 23S (73pb)(A et B). 27 échantillons ont été amplifiés, et avec les amorces RecF/RecR (C) ciblant le gène *RecA* de la bactérie *Borrelia burgdorferi*, 1 échantillon est amplifié.

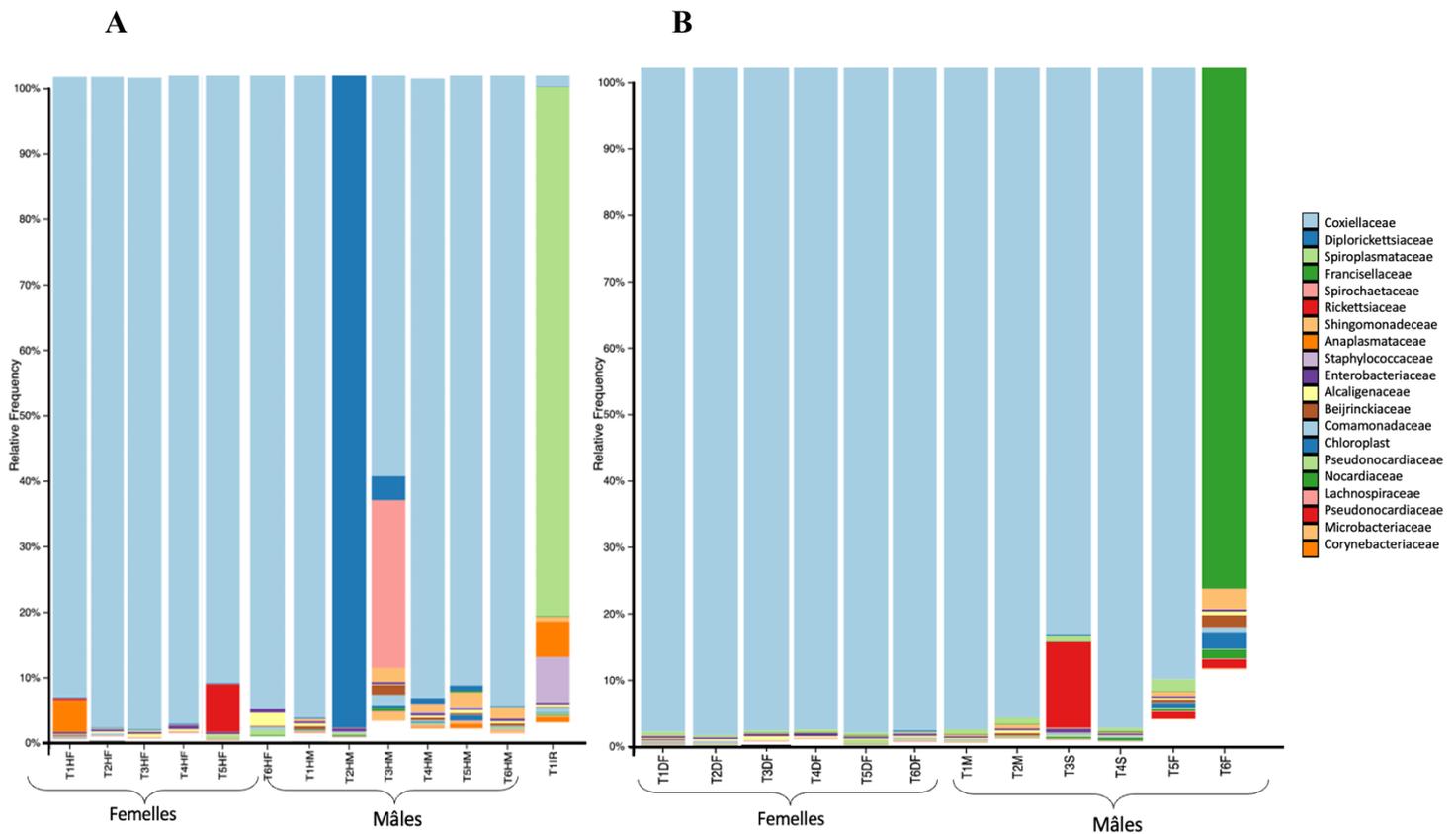


Figure 6 : Diagramme en barres représentant les 20 familles de bactéries les plus abondantes dans le microbiote des tiques *H.inermis* et *I.ricinus* (A) et *D.marginatus* (B).

Dans les autres échantillons, les bactéries les plus abondantes appartiennent aux familles des *Diplorickettsiaceae* chez le mâle *H.inermis* (94.8%)(T2HM), aux *Francisellaceae* chez le mâle *D. marginatus* (75.3%)(T6F) et à la famille des *Spiroplasmataceae* chez le mâle *Ixodes ricinus* (79.2%)(T1IR). Un des mâles *H. inermis* (T3HM) se distingue des autres tiques avec une abondance de *Spirochaetaceae* plus importante (24.8% contre moins de 1% dans les autres échantillons). Un mâle *D.marginatus* (T3S) et une femelle *H.inermis* (T5HF) hébergent également des bactéries de la famille des *Rickettsiaceae* (respectivement 12.1% et 7.1%) contrairement aux autres tiques. Chez 6 des tiques mâles (n=4 *H. inermis*, n=1 *I. ricinus* et n=1 *D. marginatus*) des bactéries de la famille des *Sphingomonadaceae* sont présentes mais ne sont pas observées chez les tiques femelles. Chez le mâle *I. ricinus* (T1IR) et une femelle *H. inermis* (T1HF), le métabarcoding révèle la présence d'*Anaplasmataceae*, des bactéries qui ne sont pas retrouvées dans le microbiote des autres échantillons. Une autre différence notable est la présence de *Staphylococcaceae* seulement chez *I. ricinus* (T1IR).

Les trois dernières familles, les *Enterobacteriaceae*, les *Alcaligenaceae* et les *Beijerinckiaceae* sont présentes en faible abondance (en majorité <1%) dans l'ensemble des échantillons. La richesse du microbiote bactérien était plus élevée chez les tiques mâles, en moyenne 47 espèces de bactéries différentes sont détectées, et 19 espèces chez les tiques femelles.

Les analyses basées sur les distances de Bray-Curtis (**figure 7**) confirment ces différences dans la composition du microbiote des espèces de tiques dures. Deux principaux groupes se forment, un rassemblant les mâles et femelles de l'espèce *H. inermis*, et un autre regroupant les mâles et femelles de l'espèce *D. marginatus*. Le microbiote d' *I. ricinus* est très éloigné de ces groupes, sa composition semble néanmoins proche de celle d'une tique *D. marginatus* mâle. Un des mâles *H. inermis* est également éloigné des autres échantillons, en accord avec les différences de composition observées dans le diagramme à barres.

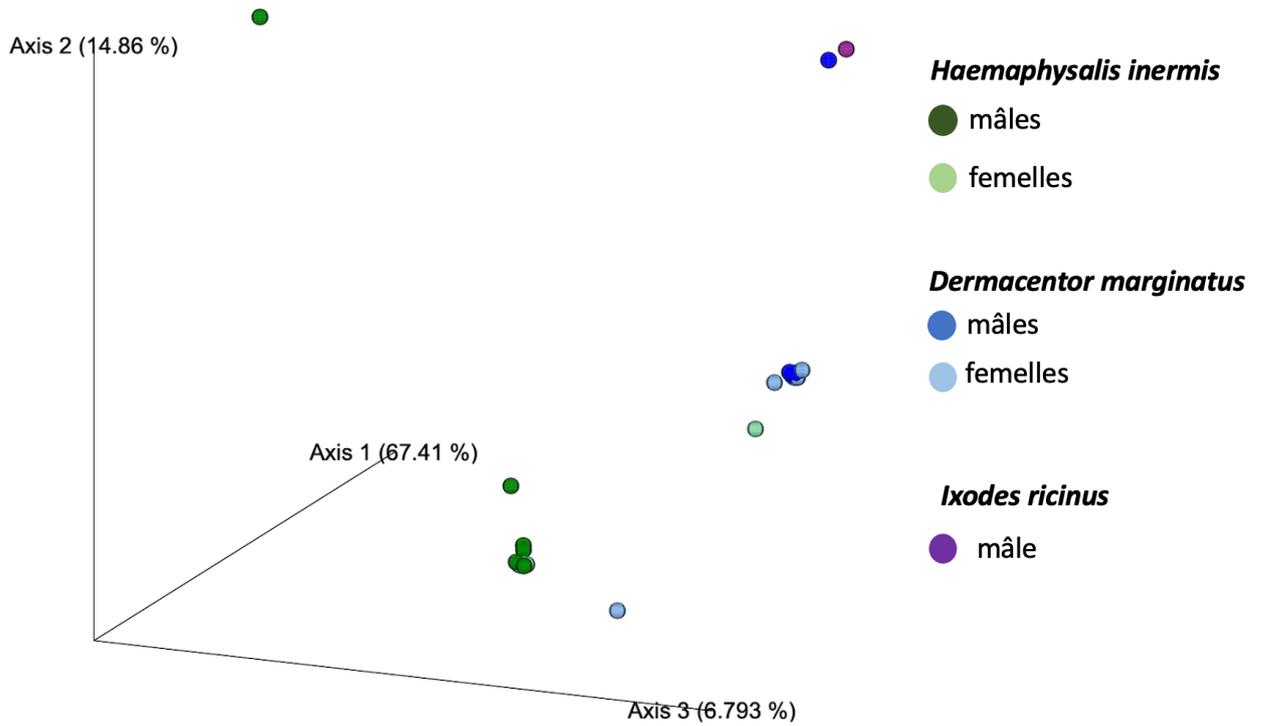


Figure 7 : Graphique PCoA (Principal Coordinate Analysis) basé sur la distance de Bray-Curtis, indiquant les dissimilarité entre les échantillons en fonction de la composition du microbiote.

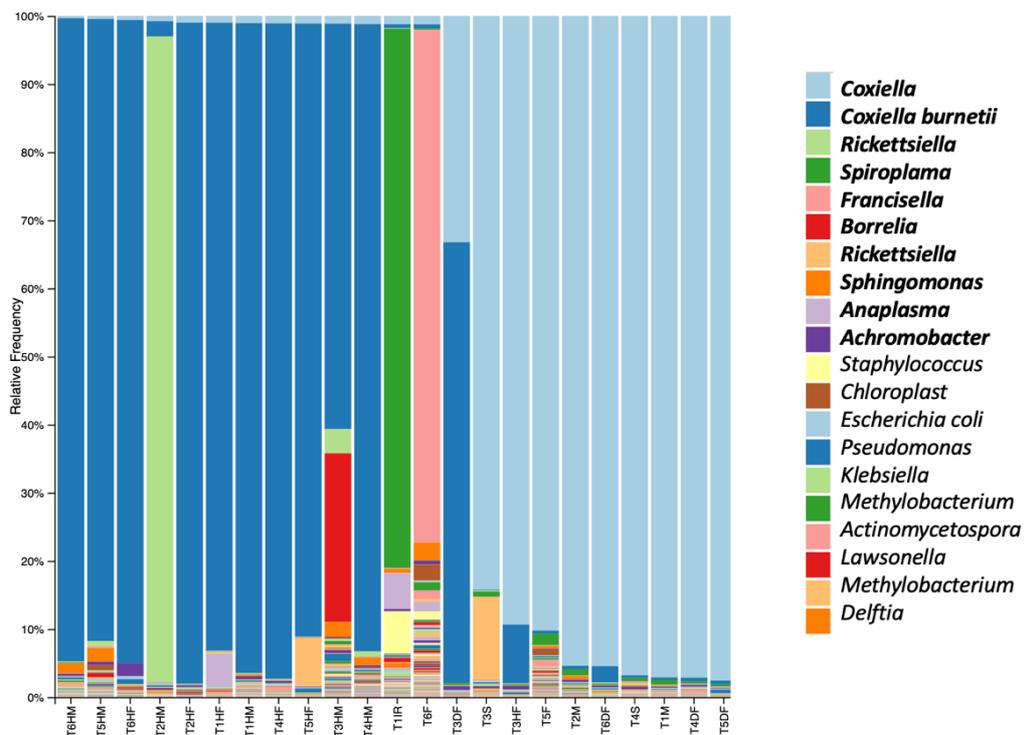


Figure 8 : Diagramme en barres représentant les 20 genres et espèces, quand l'identification est possible, de bactéries les plus abondantes dans le microbiote des tiques *H.inermis* et *I.ricinus* et *D.marginatus*.

Les études sur le microbiote des tiques se sont multipliées ces dernières années, notamment avec la généralisation des technologies NGS (Greay *et al.*, 2018). Ces études ont permis de connaître la diversité des communautés bactériennes de nombreuses espèces et d'explorer leur influence dans la transmission des agents pathogènes (Gall *et al.*, 2016). Elles suggèrent fortement que le microbiote bactérien joue un rôle important dans la biologie et l'écologie des tiques, avec une application potentielle dans le contrôle des tiques (Zolnick *et al.*, 2016).

Les tiques examinées dans cette étude ont été collectées à Poitiers, dans une zone périurbaine qui se caractérise par la présence de plusieurs espèces végétales et animales mais également par la cooccurrence de plusieurs espèces de tiques. Dans cette zone, en plus d' *I. ricinus* largement répandue en France, des espèces de tiques typiques des zones de steppe forestière (*D. marginatus* et *H. inermis*) sont également présentes (Zhang *et al.*, 2019). La présence d'*I. frontalis* a également été rapportée au Breuil Mingot.

Au cours de cette étude, différentes analyses ont permis de démontrer que les microbiotes de *D. marginatus*, *I. ricinus* et *H. inermis* diffèrent dans leur diversité et leur structure taxonomique. En effet, *H. inermis*, abrite plus de bactéries que *D. marginatus*. Les distances de Bray-Curtis suggèrent que les tiques d'une même espèce ou du même sexe ont des compositions de microbiote similaires puisque les échantillons possèdent peu de dissimilarités, à l'exception de certains échantillons qui se distinguent des autres. Les compositions bactériennes des microbiotes des deux espèces sont influencées par le sexe des hôtes. Comme cela a déjà été observé, les mâles hébergent une diversité microbienne plus importante que les femelles (Tekin *et al.*, 2017 ; Kourilchikov *et al.*, 2015). Ces différentes variations peuvent également être expliquées par des facteurs liés à l'hôte (le stade de développement, le statut alimentaire, la présence d'agents pathogènes) affectant la diversité et l'abondance du microbiote (Abraham *et al.*, 2017 ; Williams-Newkirk *et al.*, 2014 ; Zolnick *et al.*, 2016).

Les protéobactéries sont les plus abondantes chez *D. marginatus* et *H. inermis*. L'embranchement des Firmicutes a une abondance relative élevée également. Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'analyse de microbiote chez d'autres espèces de tiques (Diaz-Sanchez *et al.*, 2019 ; Hernandez-Jarguin *et al.*, 2018). Un cas particulier a été trouvé chez un mâle *H. inermis*, qui présentait une abondance relative élevée de bactéries de l'ordre des Spirochaetales et la famille des *Spirochaetaceae* (embranchement des Spirochaetota). Des bactéries du genre *Borrelia* de cette famille sont identifiées. Nos analyses moléculaires permettent de confirmer ces résultats. En effet, nous avons pu confirmer par PCR la présence de *Borrelia* spp. chez cet individu. Les 26 autres échantillons étaient également amplifiés lors de cette PCR, mais d'après la **figure 6**, l'abondance relative de ces bactéries dans les autres tiques est très faible. Le genre *Borrelia* regroupe aujourd'hui une dizaine d'espèces de bactéries spirales, parmi lesquelles on retrouve principalement en Europe *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi*, responsables de la Borréliose de Lyme. Compte tenu du fait que les tiques peuvent transmettre certaines bactéries appartenant aux Spirochaetota aux humains et aux animaux, il serait intéressant d'étudier la prévalence de ces pathogènes chez les animaux sauvages du Breuil Mingot, zone dont la fréquentation risque d'être modifiée par l'urbanisation.

Les bactéries du genre *Coxiella*, *Rickettsiella*, *Spiroplasma*, *Francisella* et *Rickettsia* sont retrouvées dans certains de nos échantillons avec une abondance élevée. Ces bactéries sont héritées verticalement des tiques femelles à leur descendance. La présence des bactéries *Coxiella* est justifiée par leur rôle de symbiotes obligatoires chez la majorité des espèces de tiques (Duron *et al.*, 2017). Quand l'identification des espèces était possible, la présence de *Coxiella burnetii* est observable et elle représente les bactéries les plus abondantes dans 11 de nos échantillons. Cependant, ces résultats sont discutables car il a été démontré que les endosymbiotes nutritionnels, comme *Coxiella-LE* (*Coxiella*-like endosymbiont) et *Francisella-LE* (*Francisella*-like endosymbiont) peuvent être identifiés à tort, lors de l'analyse des séquences, comme des agents pathogènes transmis par les tiques puisque la taille et l'organisation de leur génome sont très proches. Le risque d'infection associé aux tiques est donc plus faible qu'indiqué avec la **figure 8** (Buysse et Duron, 2021).

En revanche, les rôles essentiels des endosymbiotes de type *Coxiella* like ou *Francisella* like ont été décrits chez plusieurs espèces de tiques, chez lesquelles ces bactéries fournissent des nutriments essentiels à la survie, la croissance et la reproduction des tiques, comme les vitamines B (Duron *et al.*, 2017). Les endosymbiotes du genre *Rickettsiella* sont courants chez plusieurs espèces de tiques. Les effets de ces bactéries sur la biologie des tiques restent encore peu connus (Duron *et al.*, 2017).

Le genre *Spiroplasma* est abondant chez *I. ricinus*. Ce symbiote hérité maternellement, est particulièrement fréquent chez les arthropodes, dont les tiques (Lejal *et al.*, 2021 ; Duron *et al.*, 2017). Des études ont permis de mettre en évidence son rôle de symbiote secondaire, non essentiel à la survie de l'hôte mais présent afin de conférer des avantages adaptatifs, comme la défense contre des ennemis naturels ou encore des agents pathogènes. Les bactéries du genre *Spiroplasma* peuvent également être à l'origine d'une mortalité chez les mâles lors des stades embryonnaires, cependant cet effet n'a pas été observé dans nos échantillons même si elles ont été détectées chez 4 tiques mâles (Duron *et al.*, 2017 ; Ferree *et al.*, 2008).

Outre la forte prévalence des symbiotes obligatoires, certains genres bactériens du sol ou de l'environnement, tels que *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Brevibacterium* ou encore *Rhodococcus*, sont présents en faible abondance dans plusieurs échantillons. Leur présence peut être expliquée par le fait que ces bactéries ont été ingérées par les tiques lors d'un repas sanguin, et donc étaient présentes dans le tube digestif (Narasimhan *et al.*, 2014 ; Zolnick *et al.*, 2016 ; Diaz-Sanchez *et al.*, 2019).

5. CONCLUSION

Les microbiotes bactériens des tiques *D. marginatus*, *H.inermis* et *I. ricinus* collectées dans une zone périurbaine de Poitiers diffèrent les uns des autres par leur structure taxonomique et par leur diversité. L'espèce et le sexe de l'hôte sont les deux facteurs influençant la composition du microbiote bactérien. *H. inermis* possède une diversité bactérienne plus importante que *D. marginatus*, et la diversité bactérienne chez les mâles semble plus élevée. Les bactéries héritées de la mère sont les plus présentes dans nos échantillons, la plupart ayant un rôle d'endosymbiote nutritionnel.

Néanmoins les rôles de certains symbiotes transmis verticalement ne sont pas encore tous décrits. Une des tiques échantillonnées était porteuse de la bactérie du genre *Borrelia* d'après les résultats de métabarcoding.

En accord avec nos résultats de détection spécifique par PCR nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elle ne correspond pas à l'espèce "*Borrelia burgdorferi*" puisqu'on n'a pas obtenu d'amplification spécifique ciblant cette bactérie responsable de la maladie de Lyme., Des mesures de surveillance pourraient cependant être mises en œuvre.

La présente étude doit être approfondie en continuant l'échantillonnage des tiques dans des zones urbaines, en choisissant des sites moins entretenus, ou avec une fauche tardive. Ces nouvelles zones de collecte permettraient d'avoir des données de comparaison afin d'étudier un potentiel impact de l'urbanisation sur la composition du microbiote bactérien de ces arthropodes. Il serait également intéressant d'échantillonner des tiques molles, dont les hôtes diffèrent de ceux des tiques dures. Ces hôtes, comme les pigeons ou les chauve-souris, sont de plus en plus présents en milieu périurbain et urbain.

Remerciements

D'abord, je tiens naturellement à remercier Didier de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet et de m'avoir fait confiance pour ce stage très intéressant. Merci pour votre accompagnement et vos conseils qui m'ont permis d'avoir une expérience très enrichissante.

Plus particulièrement, je voudrais dire un grand merci à Meriem. Merci pour ta pédagogie, ta patience et ton organisation. Merci de m'avoir formé avec bienveillance et d'avoir toujours su te rendre disponible pour répondre à mes questions. Je te souhaite plein de bonheur et de réussite pour ces prochaines années, j'espère que tu trouveras ton chemin pour continuer à t'épanouir dans ce milieu.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à l'ensemble des personnes du laboratoire ayant aidé à la réalisation de ce stage. Je remercie également Maud Renier (Champs des Possible) pour sa gentillesse lors de l'échantillonnage ainsi que Yvonnick Guinard et Thomas Rodier (Grand Poitiers communauté urbaine) pour l'aide qu'ils nous ont apportée lors de la réalisation de la cartographie.

Évidemment je remercie aussi mes camarades de stage, Clarisse, Brice, Barberine, Will et Charlotte, sans qui ces 6 mois n'auraient pas été les mêmes. Pleins de réussites pour la suite à vous 5.

Un grand merci aussi à Julien, Brendan et plus particulièrement à Chloé. Merci pour votre soutien tout au long de ce master, je n'aurai pas pu imaginer mieux. Je suis très heureuse d'avoir passé ces dernière année avec vous, je n'en retiens que du positif et vous souhaite plein de réussite.

Résumé :

Les tiques sont des vecteurs de pathogènes majeurs bien connus pour leur rôle dans la propagation de maladies émergentes, telles que la maladie de Lyme ou la fièvre boutonneuse. Les tiques sont des arthropodes strictement hématophages, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent exclusivement de sang tout au long de leur cycle de vie. Ce mode de nutrition favorise la transmission de pathogènes à l'origine de zoonoses émergentes. Cependant, le repas sanguin est un mode de nutrition pauvre, notamment en vitamines B, nutriments qui a été montré comme indispensable aux tiques. Pour se faire, au cours de leur histoire évolutive les tiques ont développé des relations intimes avec des symbiotes bactériens qui leur apportent ces nutriments nécessaires. Ces bactéries font partie de la grande diversité de micro-organismes abrités par les tiques, appelés microbiotes. Ce dernier est étudié par séquençage ciblé haut-débit (métabarcoding) après avoir récolté les tiques dans des zones urbaines et périurbaines de l'agglomération de Grand Poitiers afin de connaître la diversité des vecteurs présents en ville ainsi que les pathogènes hébergés par ces derniers. *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis inermis* et *Ixodes ricinus* sont les principales espèces retrouvées en zones périurbaines et la composition de leur microbiote est dominée par les bactéries héritées verticalement. Des différences d'abondance et de diversité sont observées entre les espèces et le sexe des tiques.

Mots clés : Tiques, microbiote, endosymbiotes, Borrelia.

Abstract:

In Europe, ticks are the main vectors of pathogens responsible for emerging diseases such as Lyme disease and spotted fever. Ticks are strictly hematophagous arthropods, they feed exclusively on blood throughout their life cycle which promotes the transmission of pathogens responsible for emerging zoonoses. However, blood feeding is a deficient mode of nutrition, particularly when it comes to B vitamins which are nutrients proved to be essential for ticks. Over the course of their evolutionary history, ticks have developed close relationships with bacterial symbionts that provide them with these vitamins. These bacteria are part of the great diversity of micro-organisms harbored by ticks, known as their microbiota. In this study, ticks microbiota will be studied by 16S meta-barcoding (high-throughput sequencing). Ticks are sampled in urban and peri-urban areas, in order to study their abundance in cities, as well as their associated-pathogens/bacteria. *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis inermis* and *Ixodes ricinus* are the main species found in peri-urban areas, and the composition of their microbiota is dominated by vertically inherited bacteria. Differences in abundance and diversity are observed between tick species and between the sexes.

Key words: Ticks, microbiote, endosymbionts, Borrelia.

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ADN

1. Préparer un tube par individu avec 200 µl de buffer ATL pour 25 à 40 mg de tissus prélevés
2. Couper la tique en plusieurs morceaux et broyer avec un pilon
3. Sonication des échantillons
4. Ajouter 20 µl de protéinase K (20 mg/ml)
5. Incuber toute une nuit à 56°C
6. Centrifuger 8000g 2 min
7. Récupérer le surnageant et le placer dans un nouveau tube 1,5 ml

Utilisation du Kit Qiagen DNAeasy Blood and Tissue

1. Vortexer 15s et ajouter 200 µl de Buffer AL et homogénéiser à la P1000
2. Ajouter 200 µl d'éthanol 100% lacé et homogénéiser à la P1000
3. Déposer sur une colonne Qiagen
4. Centrifuger 2 min à 8000g
5. Jeter le tube collecteur 2 ml
6. Déposer la colonne dans un nouveau tube collecteur 2 ml
7. Ajouter 500 µl buffer AW1
8. Centrifuger 2 min à 8000g
9. Jeter le tube collecteur 2 ml
10. Déposer la colonne dans un nouveau tube collecteur 2 ml
11. Ajouter 500 µl de buffer AW2
12. Centrifuger 3 min à 17 000g
13. Déposer la colonne dans un nouveau tube 1,5ml
14. Ajouter 100 µl de buffer AE ou eau
15. Incuber 1 min à température ambiante et centrifuger 1 min à 8000g pour éluer
16. Stocker à 4°C

Annexe 2: Protocole de quantification de l'ADN avec la méthode Qubit

- *Préparation du mix pour 1 échantillon :*
 - 199 μ l Qubit buffer
 - 1 μ l de reagent

- *Quantification de l'ADN :*
 1. Pour les 2 tubes étalons, aliquoter 190 μ l de mix avec 10 μ l de solution contenue dans les tubes "standards" du kit
 2. Pour les échantillons, aliquoter 195 μ l de mix et ajouter 5 μ l d'ADN (volume total de 200 μ l pour chaque tube).
 3. Vortexer tous les tubes pendant 2 à 3 secondes
 4. Insérer les tubes dans le fluorimètre Qubit et prendre les mesures

Annexe 3 : Liste des amorces utilisées pour les différentes réactions de PCR pour les gènes *COI*, ARN ribosomique 23S, *RecA* et la région V3/V4 et de l'ARN 16S.

Gène	Amorce Forward	Séquences (5'-3')	Amorce Reverse	Séquences (5'-3')
<i>COI</i>	HCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
ARNs 23S	Bo_bu_sl_23S_F	GAGTCTTAAAAGGGCGATTTAGT	Bo_bu_sl_23S_R	CTTCAGCCTGGCCATAAATAG
<i>RecA</i>	RecF	GTGGATCTATTGTATTAGATGAGGCTCTCG	RecR	GCCAAAGTTCTGCAACATTAACACCTAAAG
ARN 16S V3/V4		CCTACGGGDDGGCWGCAG		GACTACHVGGGTATCTAATCC

Annexe 4 : Préparation du mix et programmes de PCR

Protocole de préparation du mix pour la réaction PCR du gène COI :

- 5 µl de Buffer 5X
- 0,5 µl de dNTP (2,15mM chacun)
- 2,5 µl d'amorce F (10 µM)
- 2,5 µl d'amorce R (10 µM)
- 0,125 µl de GoTaq
- 13,875 µl de H₂O
- Distribuer 23,5 µl de mix par tube et ajouter 1 µl d'ADN
- Mettre en thermocycleur

Programme de PCR :

- 95°C 3 min
- Dénaturation : 95°C 30s
- Hybridation : 50°C 30s
- Elongation, activation de la Taq polymérase : 72°C 1min/kb
- 72°C 5min

Optimisation de la préparation du mix pour la réaction PCR du gène COI :

- 5 µl de Buffer 5X
- 0,5 µl de dNTP (2,15mM chacun)
- 1 µl d'amorce F (10 µM)
- 1 µl d'amorce R (10 µM)
- 0,7 µl de MgCl₂
- 0,2 µl de GoTaq
- 15,6 µl de H₂O
- Distribuer 24 µl de mix par tube et ajouter 1 µl d'ADN
- Mettre en thermocycleur

Programme de PCR :

- 95°C 2 min 30s
- Dénaturation : 95°C 45s
- Hybridation : 47°C 1 min
- Elongation, activation de la Taq polymérase : 72°C 1 min/kb
- 72°C 10 min

Annexe 5 : Purification enzymatique

Distribution du mix EXOAnP :

- Pour 1 échantillon distribuer 2 μl de mix EXOAnP pour environ 20 μl de produit de PCR

Réaction en thermocycleur :

- 37°C 1h
- 80°C 20 min
- Stocker à 4°C ou à - 20°C jusqu'au séquençage

Solutions

Mix EXOAnp, pour une réaction :

- 0,05 μl de l'exonucléase I
- 0,1 μl d'AnP
- 1,85 μl d'H₂O

Annexe 6 : Séquençage des produits de PCR

Réaction de séquençage :

Mix pour une réaction :

- 0,5 µl de mix BDT
- 0,32 µl de Primers (10 µM)
- 3 µl de Tampon BDT 5X
- 8,18 µl H₂O
- Aliquoter 12 µl par tube et ajouter 3 µl de produit de PCR purifié

Programme thermocycleur :

- 96°C 30s
- 96°C 45s
- 52°C 30s
- 60°C 4 min

Purification des réactions de séquençage :

1. Pour chaque tube ajouter 10 µl d'H₂O, 2,2 µl d'acétate de sodium (AcNA) et 50 µl d'éthanol 100%
2. Homogénéiser et laisser précipiter 20 min à température ambiante
3. Centrifuger 20 min à 15340 g et température ambiante
4. Eliminer le surnageant à la pipette et laver avec 90 µl d'éthanol 70% froid
5. Centrifuger 5 min à 15340 g et à 4°C
6. Eliminer le surnageant à la pipette et laisser sécher le culot
7. Reprendre le culot avec 15 µl de formamide désionisée et attendre 30 min à température ambiante, vortexer puis dénaturer 3 min à 95°C
8. Mettre les échantillons dans la glace et envoyer au séquençage

Annexe 7 : Electrophorèse en gel d'agarose

Préparation du gel

- Gel 1,5% : Mélanger 6 g d'agarose avec 400 ml de TAE 0,5X
- Gel 2% : Mélanger 8 g d'agarose avec 400ml de TAE 0,5X
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes et agiter de temps en temps pour homogénéiser le mélange
- Laisser refroidir quelques minutes et couler le gel
- Laisser refroidir

Préparation des échantillons

1. Mélanger 5 μ l de l'échantillon d'ADN avec 2 μ l de tampon de charge
2. Démouler le gel et le déposer dans une cuve d'électrophorèse, et ajouter du tampon de migration TAE 0,5X au besoin de façon à recouvrir le gel
3. Déposer les échantillons sans oublier le marqueur de taille
4. Mettre le couvercle de la cuve, brancher le générateur et lancer la migration à 100V pendant environ 20 min.

Révélation

1. Après migration, déposer le gel dans le bain de BET et laisser tremper environ 20 min
2. Déposer le gel sur la table UV, régler l'appareil de prise de vue, allumer les UV et prendre la photo.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, Nabil M., Lei Liu, Brandon Lyon Jutras, Akhilesh K. Yadav, Sukanya Narasimhan, Vissagan Gopalakrishnan, Juliana M. Ansari, et al. 2017. « Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (5): E781-90.
- Aeschlimann, A. 1972. « [Ixodes ricinus, Limmeus, 1758 (Ixodoidea: Ixodidae). Preliminary study of the biology of the species in Switzerland] ». *Acta Tropica* 29 (4): 321-40.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, et D. J. Lipman. 1990. « Basic Local Alignment Search Tool ». *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-10.
- Awada, Lina, Natalja Lambergeon, Lina Mur, et Paolo Tizzani. s. d. « SITUATION ACTUELLE DE LA SANTÉ ANIMALE DANS LE MONDE : ANALYSE DES ÉVÉNEMENTS ET DES TENDANCES ».
- Bolyen, Evan, Jai Ram Rideout, Matthew R. Dillon, Nicholas A. Bokulich, Christian Abnet, Gabriel A. Al-Ghalith, Harriet Alexander, et al. 2018. « QIIME 2: Reproducible, Interactive, Scalable, and Extensible Microbiome Data Science ». e27295v2. PeerJ Inc.
- Bonnet, Sarah, Karine Huber, Guy Joncour, Magalie René-Martellet, Frédéric Stachurski, et Lionel Zenner. 2017. « 2. Biologie des tiques ». In *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*, édité par Nathalie Boulanger et Karen D. McCoy, 53-84. Didactiques. Marseille: IRD Éditions.
- Bonnet, Sarah I., Florian Binetruy, Angelica M. Hernández-Jarguín, et Olivier Duron. 2017. « The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00236>.
- Bonnet, Sarah Irène, et Thomas Pollet. 2021. « Update on the Intricate Tango between Tick Microbiomes and Tick-Borne Pathogens ». *Parasite Immunology* 43 (5): e12813.
- Boussaa, Samia. 2008. « Épidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc : Effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations ». These de doctorat, Strasbourg 1. <https://www.theses.fr/2008STR13037>.
- Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, et J. P. Davis. 1982. « Lyme Disease-a Tick-Borne Spirochetosis? ». *Science (New York, N.Y.)* 216 (4552): 1317-19.
- Buyse, Marie, Florian Binetruy, Raz Leibson, Yuval Gottlieb, et Olivier Duron. 2022. « Ecological Contacts and Host Specificity Promote Replacement of Nutritional Endosymbionts in Ticks ». *Microbial Ecology* 83 (avril).
- Buyse, Marie, et Olivier Duron. 2021. « Evidence That Microbes Identified as Tick-Borne Pathogens Are Nutritional Endosymbionts ». *Cell* 184 (9): 2259-60.
- Buyse, Marie, Anna Maria Floriano, Yuval Gottlieb, Tiago Nardi, Francesco Comandatore, Emanuela Olivieri, Alessia Giannetto, et al. 2021. « A Dual Endosymbiosis Supports Nutritional Adaptation to Hematophagy in the Invasive Tick *Hyalomma Marginatum* ». *ELife* 10 (décembre): e72747.
- Chan, Kamfai, Salvatore AE Marras, et Nikhat Parveen. 2013. « Sensitive multiplex PCR assay to differentiate Lyme spirochetes and emerging pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* ». *BMC Microbiology* 13 (1): 295.
- Díaz-Sánchez, Sandra, Angélica Hernández-Jarguín, Alessandra Torina, Isabel G. Fernández de Mera, Valeria Blanda, Santo Caracappa, Christian Gortazar, et José de la Fuente. 2019. « Characterization of the Bacterial Microbiota in Wild-Caught *Ixodes Ventalloi* ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 10 (2): 336-43.
- Duron, Olivier, Florian Binetruy, Valérie Noël, Julie Cremaschi, Karen D. McCoy, Céline Arnathau, Olivier Plantard, et al. 2017. « Evolutionary Changes in Symbiont Community Structure in Ticks ». *Molecular Ecology* 26 (11): 2905-21.
- Duron, Olivier, et Yuval Gottlieb. 2020. « Convergence of Nutritional Symbioses in Obligate Blood Feeders ». *Trends in Parasitology* 36 (10): 816-25.
- Duron, Olivier, Olivier Morel, Valérie Noël, Marie Buyse, Florian Binetruy, Renaud Lancelot, Etienne Loire, et al. 2018. « Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways ». *Current Biology* 28 (12): 1896-1902.e5.
- Duron, Olivier, Valérie Noël, Karen D. McCoy, Matteo Bonazzi, Karim Sidi-Boumedine, Olivier Morel, Fabrice Vavre, et al. 2015. « The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella Burnetii* ». *PLoS Pathogens* 11 (5): e1004892.
- Ferree, Patrick M., Amanda Avery, Jorge Azpurua, Timothy Wilkes, et John H. Werren. 2008. « A Bacterium Targets Maternally Inherited Centrosomes to Kill Males in *Nasonia* ». *Current Biology* 18 (18): 1409-14.
- Ferrouillet, Cécile. 2014. *Proposition d'un Programme de Surveillance Intégré Pour La Maladie de Lyme et Les Autres Maladies Transmises Par La Tique Ixodes Scapularis Au Québec*. desLibris. <https://policycommons.net/artifacts/1242372/proposition-dun-programme-de-surveillance-integre-pour-la-maladie-de-lyme-et-les-autres-maladies-transmises-par-la-tique-ixodes-scapularis-au-quebec/1795438/>.

- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, et R. Vrijenhoek. 1994. « DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates ». *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294-99.
- Gall, Cory A., Kathryn E. Reif, Glen A. Scoles, Kathleen L. Mason, Michelle Mousel, Susan M. Noh, et Kelly A. Brayton. 2016. « The Bacterial Microbiome of Dermacentor Andersoni Ticks Influences Pathogen Susceptibility ». *The ISME Journal* 10 (8): 1846-55.
- Greay, Telleasha L., Alexander W. Gofton, Andrea Papparini, Una M. Ryan, Charlotte L. Oskam, et Peter J. Irwin. 2018. « Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing ». *Parasites & Vectors* 11 (1): 12.
- Hernández-Jarguín, Angélica, Sandra Díaz-Sánchez, Margarita Villar, et José de la Fuente. 2018. « Integrated Metatranscriptomics and Metaproteomics for the Characterization of Bacterial Microbiota in Unfed Ixodes Ricinus ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 9 (5): 1241-51.
- Jessica, LAYOUNI. 2018. « Haute Autorité de santé ».
- Jourdain, Frédéric, et Marie-Claire Paty. 2019. « Impact des changements climatiques sur les vecteurs et les maladies à transmission vectorielle en France ». *Les Tribunes de la santé* 61 (3): 41-51.
- Kada, Sarah, Karen D. McCoy, et Thierry Boulinier. 2017. « Impact of life stage-dependent dispersal on the colonization dynamics of host patches by ticks and tick-borne infectious agents ». *Parasites & Vectors* 10 (1): 375.
- Kurilshikov, Alexander, Natalya N. Livanova, Nataliya V. Fomenko, Alexey E. Tupikin, Vera A. Rar, Marsel R. Kabilov, Stanislav G. Livanov, et Nina V. Tikunova. 2015. « Comparative Metagenomic Profiling of Symbiotic Bacterial Communities Associated with Ixodes persulcatus, Ixodes pavlovskyi and Dermacentor reticulatus Ticks ». *PLOS ONE* 10 (7): e0131413.
- Lejal, E., J. Chiquet, J. Aubert, S. Robin, A. Estrada-Peña, O. Rue, C. Midoux, et al. 2021. « Temporal patterns in Ixodes ricinus microbial communities: an insight into tick-borne microbe interactions ». *Microbiome* 9 (1): 153.
- Lejal, Emilie, Agustín Estrada-Peña, Maud Marsot, Jean-François Cosson, Olivier Rué, Mahendra Mariadassou, Cédric Midoux, Muriel Vayssier-Taussat, et Thomas Pollet. 2020. « Taxon Appearance From Extraction and Amplification Steps Demonstrates the Value of Multiple Controls in Tick Microbiota Analysis ». *Frontiers in Microbiology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01093>.
- McCoy, Karen D., et Nathalie Boulanger, éd. 2015. *Tiques et maladies à tiques: Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. IRD Éditions.
- Michelet, Lorraine, Sabine Delannoy, Elodie Devillers, Gérald Umhang, Anna Aspan, Mikael Juremalm, Jan Chirico, et al. 2014. « High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (juillet): 103.
- Moran, Nancy A., John P. McCutcheon, et Atsushi Nakabachi. 2008. « Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts ». *Annual Review of Genetics* 42: 165-90.
- Narasimhan, Sukanya, et Erol Fikrig. 2015. « Tick microbiome: the force within ». *Trends in parasitology* 31 (7): 315-23.
- O, Duron, Morel O, Noël V, Buysse M, Binetruy F, Lancelot R, Loire E, et al. 2018. « Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways ». *Current biology : CB* 28 (12).
- Oliver, Kerry M., Patrick H. Degan, Gaelen R. Burke, et Nancy A. Moran. 2010. « Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits ». *Annual Review of Entomology* 55: 247-66.
- Parola, P., et D. Raoult. 2001. « Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat ». *Clinical Infectious Diseases* 32 (6): 897-928.
- Perez-Eid, C., et B. Gilot. 1998. « Les tiques : cycles, habitats, hôtes, rôle pathogène, lutte ». *Médecine et Maladies Infectieuses*, 7e Colloque sur le Contrôle Épidémiologique des Maladies Infectieuses. Institut Pasteur de Paris - 29 mai 1998, 28 (4, Supplément 1): 335-43.
- Smith, Todd A., Timothy Driscoll, Joseph J. Gillespie, et Rahul Raghavan. 2015. « A Coxiella-like Endosymbiont Is a Potential Vitamin Source for the Lone Star Tick ». *Genome Biology and Evolution* 7 (3): 831-38.
- Tamura, Koichiro, Glen Stecher, et Sudhir Kumar. 2021. « MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 ». *Molecular Biology and Evolution* 38 (7): 3022-27.
- Tekin, Saban, Scot E. Dowd, Marko Davinic, Ahmet Bursali, et Adem Keskin. 2017. « Pyrosequencing Based Assessment of Bacterial Diversity in Turkish Rhipicephalus Annulatus and Dermacentor Marginatus Ticks (Acari: Ixodidae) ». *Parasitology Research* 116 (3): 1055-61.
- « Tout comprendre sur les vecteurs et les enjeux de lutte ». 2022. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 8 novembre 2022. <https://www.anses.fr/fr/content/tout-comprendre-sur-les-vecteurs-et-les-enjeux-de-lutte>.
- Trzebny, Artur, Justyna Liberska, Anna Slodkiewicz-Kowalska, et Mirosława Dabert. 2022. « Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (Ixodes ricinus) ». *Parasites & Vectors* 15 (janvier): 26.

- Vayssier-Taussat, Muriel, Maria Kazimirova, Zdenek Hubalek, Sándor Hornok, Robert Farkas, Jean-François Cosson, Sarah Bonnet, et al. 2015. « Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the 'one pathogen–one disease' vision to the pathobiome paradigm ». *Future Microbiology* 10 (12): 2033-43.
- Williams-Newkirk, Amanda Jo, Lori A. Rowe, Tonya R. Mixson-Hayden, et Gregory A. Dasch. 2014. « Characterization of the Bacterial Communities of Life Stages of Free Living Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*) ». *PLOS ONE* 9 (7): e102130.
- Zhang, Yan-Kai, Zhi-Jun Yu, Duo Wang, Víchová Bronislava, Peťko Branislav, et Jing-Ze Liu. 2019. « The Bacterial Microbiome of Field-Collected Dermacentor Marginatus and Dermacentor Reticulatus from Slovakia ». *Parasites & Vectors* 12 (1): 325.
- Zolnik, Christine P., Robert J. Prill, Richard C. Falco, Thomas J. Daniels, et Sergios-Orestis Kolokotronis. 2016. « Microbiome Changes through Ontogeny of a Tick Pathogen Vector ». *Molecular Ecology* 25 (19): 4963-77.
- « Zoonoses : quels liens entre atteintes à la biodiversité et pandémies ? » 2023. notre-environnement. 18 mai 2023. <http://www.notre-environnement.gouv.fr/actualites/essentiels/article/zoonoses-quels-liens-entre-atteintes-a-la-biodiversite-et-pandemies>.
- « Zoonoses : toutes les maladies transmises par l'animal ». s. d. Consulté le 7 février 2023. <https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=zoonoses-toutes-maladies-transmises-animal>.