



HAL
open science

Inflammation cutanée et borréliose de Lyme : étude in vitro des interactions entre les cellules résidentes de la peau et *Borrelia*

Frédéric Schramm

► **To cite this version:**

Frédéric Schramm. Inflammation cutanée et borréliose de Lyme : étude in vitro des interactions entre les cellules résidentes de la peau et *Borrelia*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ026 . tel-00757050

HAL Id: tel-00757050

<https://theses.hal.science/tel-00757050v1>

Submitted on 26 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ

EA 4438 Physiopathologie et médecine translationnelle

Groupe borréliose de Lyme

THÈSE

présentée par :

Frédéric SCHRAMM

soutenue le : 29 mars 2012

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

Discipline/ Spécialité : Vie et Santé / Aspects cellulaires et moléculaires de
la biologie

Inflammation cutanée et borréliose de Lyme

– étude *in vitro* des interactions entre les
cellules résidentes de la peau et *Borrelia* –

THÈSE dirigée par :

BOULANGER-CHICOIS Nathalie
JAULHAC Benoît

Docteur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

LOZNIOWSKI Alain
GUEIRARD Pascale

Professeur, Faculté de Médecine de Nancy
Docteur, Institut Pasteur de Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

LIPSKER Dan
BOYE Thierry

Professeur, Université de Strasbourg
Docteur, Hôpital d'instruction des armées, Toulon

REMERCIEMENTS

À Madame le Docteur Nathalie Boulanger et Monsieur le Professeur Benoît Jaulhac. Je vous remercie d'avoir dirigé ce travail de thèse.

Aux membres du jury, Monsieur le Professeur Alain Lozniewski, Madame le Docteur Pascale Gueirard, Monsieur le Professeur Dan Lipsker, Monsieur le Docteur Thierry Boye. Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer la qualité scientifique de ce travail.

Je tiens également à remercier Cathy Barthel, Élodie Colin, Chantal Deléna, Aurélie Kern, Sylvie de Martino et Claire Marchal. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et toute l'aide que vous m'avez apportée durant de ce travail.

À mes parents et grands-parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études.

À toute ma famille.

À Gaëlle, Thomas et Valentine, avec tout mon amour.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--|--|
| ACA : acrodermatite chronique atrophiante | MCP-1 : <i>monocyte chemoattractant protein 1</i> |
| ADN : acide désoxyribonucléique | MFAP : <i>microfibril-associated glycoprotein</i> |
| ARN : acide ribonucléique | MMP : <i>matrix metalloprotease</i> |
| BCR : <i>B cell receptor</i> | MSCRAMMs : <i>microbial surface components recognising adhesive matrix molecules</i> |
| Bgp : <i>Borrelia gag binding protein</i> | Msp : <i>major surface protein</i> |
| Bip : <i>B-cell inhibitory protein</i> | MyD88 : <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i> |
| Bmp : <i>Borrelia membrane protein</i> | NK : <i>natural killer cell</i> |
| BSK : Barbou – Stoenner – Kelly | NKT : <i>natural killer T lymphocyte</i> |
| CD : <i>cluster de différenciation</i> | NLR : <i>nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing molecule</i> |
| CFHRs : <i>complement factor H-related proteins</i> | NOD : <i>nucleotide oligomerization domain</i> |
| CLA : <i>cutaneous lymphocyte-associated antigen</i> | Oms66 : <i>outer membrane-spanning 66-kDa protein</i> |
| CMH : complexe majeur d'histocompatibilité | Osp : <i>outer surface protein</i> |
| CPA : cellule présentatrice d'antigène | PAI : <i>plasminogen activator inhibitor</i> |
| CRASP : <i>complement regulator-acquiring surface protein</i> | PAMPs : <i>pathogen associated molecular patterns</i> |
| CSF : <i>colony stimulating factor</i> | PBMCs : <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| Dbp : <i>decorin binding protein</i> | PBS : <i>phosphate buffered saline</i> |
| DC-SIGN : <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i> | PCR : <i>polymerase chain reaction</i> |
| ELAM-1 : <i>endothelial leukocyte adhesion molecule 1</i> | PRR : <i>pattern recognition receptor</i> |
| Erp : <i>OspE-F related lipoprotein</i> | RFLP : <i>restriction length fragment polymorphism</i> |
| FGF : <i>fibroblast growth factor</i> | RST : <i>ribosomal spacer type</i> |
| Fnbp : <i>fibronectin binding protein</i> | Salp : <i>salivary protein</i> |
| GAG : glycosaminoglycane | Serpin : <i>serin protease inhibitor</i> |
| GM-CSF : <i>granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i> | Sfbp : <i>streptococcal fibronectin binding protein</i> |
| hBD : <i>human β-defensin</i> | STARI : <i>southern tick-associated rash illness</i> |
| ICAM-1 : <i>intercellular adhesion molecule 1</i> | TBE virus : <i>tick-borne encephalitis virus</i> |
| IFN : interféron | TGF : <i>transforming growth factor</i> |
| IL : interleukine | TIMP : <i>tissue inhibitors of metalloproteases</i> |
| Irac : <i>Ixodes ricinus salivary anticomplement protein</i> | TLR : <i>Toll-like receptor</i> |
| IRIS : <i>Ixodes ricinus immunosuppressor</i> | TNF : <i>tumor necrosis factor</i> |
| Ir-LBP : <i>Ixodes ricinus leukotriene B4-binding protein</i> | tPA : <i>tissue-type plasminogen activator</i> |
| IRS-2 : <i>Ixodes ricinus serpin-2</i> | Tpr : <i>Treponema pallidum repeat</i> |
| Isac : <i>Ixodes scapularis salivary anticomplement protein</i> | TROSPA : <i>tick receptor for OspA</i> |
| KGF : <i>keratinocyte growth factor</i> | uPA : <i>urokinase-type plasminogen activator</i> |
| LFA-1 : <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i> | VEGF : <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| LIPER : <i>lipocalin from Ixodes persulcatus</i> | VlseE : <i>VMP (vesicular membrane protein)-like sequence E</i> |
| LIR : <i>lipocalin from Ixodes ricinus</i> | |
| LPS : lipopolysaccharide | |

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 8 |
| I LA PEAU : SA STRUCTURE ET SES PRINCIPALES COMPOSANTES | 8 |
| A L' ÉPIDERME ET LES KÉRATINOCYTES | 10 |
| B LA JONCTION DERMO-ÉPIDERMIQUE | 14 |
| C LE DERME : FIBROBLASTES ET MATRICE EXTRACELLULAIRE | 15 |
| 1 Les fibroblastes | 17 |
| 2 La matrice extracellulaire | 21 |
| Composants principaux de la matrice extracellulaire | 23 |
| Les enzymes protéolytiques : métalloprotéases et sérine-protéases | 25 |
| D LES DÉFENSES IMMUNITAIRES DE LA PEAU | 27 |
| 1 La réponse immunitaire innée | 27 |
| La cascade du complément | 29 |
| Les peptides antimicrobiens | 30 |
| Activation de la composante cellulaire de l' immunité innée | 31 |
| 2 La réponse immunitaire adaptative | 35 |
| II BORRÉLIOSE DE LYME : ASPECTS ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET CLINIQUES | 37 |
| A HISTORIQUE | 37 |
| B ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA BORRÉLIOSE DE LYME | 40 |
| C MANIFESTATIONS CLINIQUES | 41 |
| 1 Aspects cliniques principaux et histoire naturelle de la maladie | 41 |
| 2 Manifestations cutanées de la borréliose de Lyme | 49 |
| L' érythème migrant | 49 |
| Le lymphocytome borrélien | 51 |
| L' acrodermatite chronique atrophiante | 52 |
| III BORRÉLIOSE DE LYME : LE VECTEUR, LA BACTÉRIE ET SA TRANSMISSION | 56 |
| A BIOLOGIE DES TIQUES | 56 |

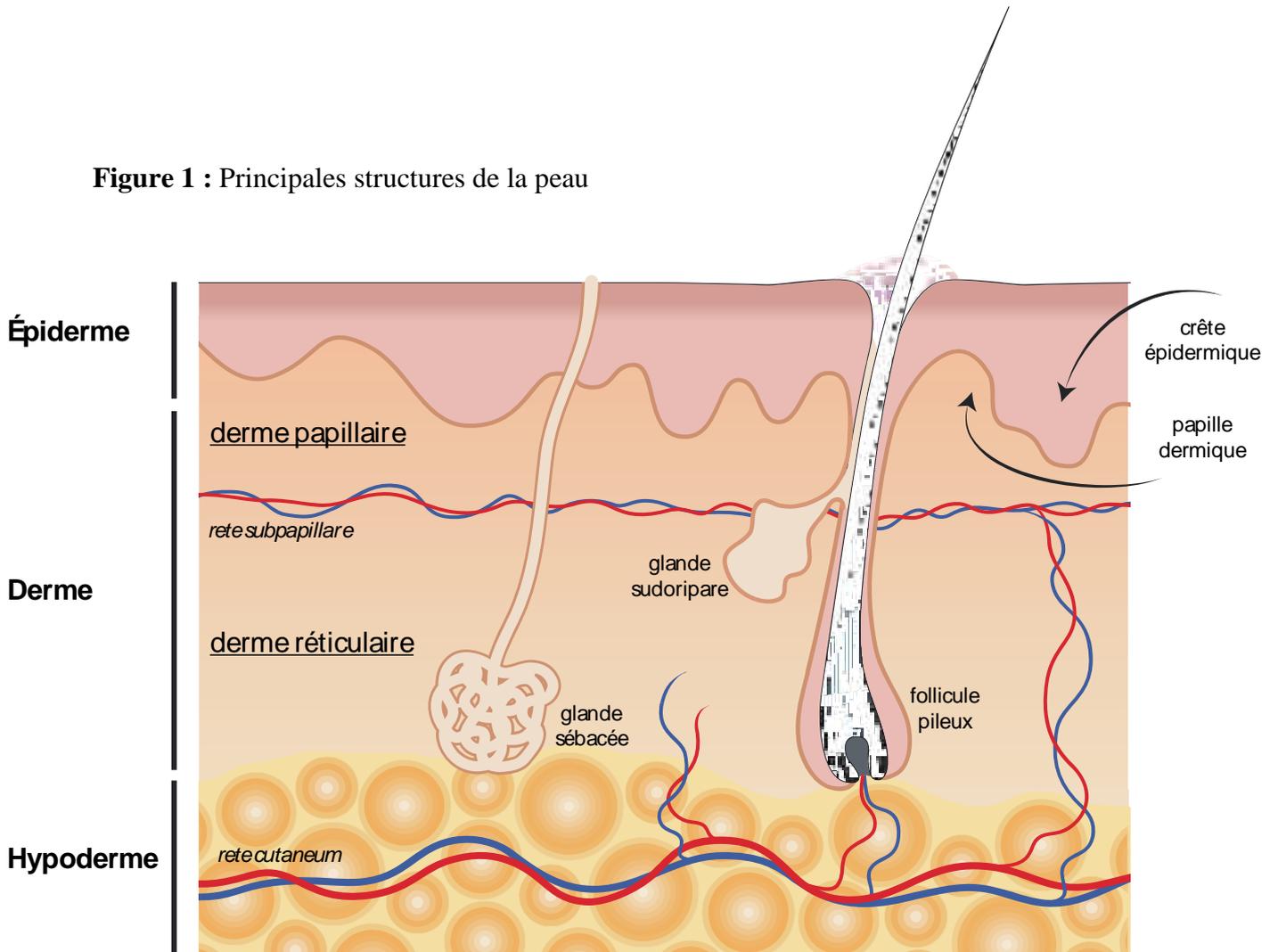
| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Généralités | 56 |
| | Taxonomie | 56 |
| | Anatomie | 56 |
| | Cycle de développement | 58 |
| | Biotope et répartition géographique des espèces vectrices de la borréliose de Lyme | 62 |
| 2 | La salive de tique | 65 |
| | Activité anti-hémostatique | 65 |
| | Activité anti-inflammatoire de la salive et modulation de la réponse immunitaire innée | 66 |
| | Effet sur la réponse immunitaire adaptative | 70 |
| B | BIOLOGIE DES <i>BORRELIA</i> | 75 |
| | Taxonomie et répartition géographique | 75 |
| | Structure et organisation génomique de la bactérie | 78 |
| C | TRANSMISSION DE <i>BORRELIA</i> | 80 |
| 1 | Dynamique de la transmission | 81 |
| | Évolution topographique et dynamique de <i>Borrelia</i> chez le vecteur | 81 |
| | Délai de transmission du vecteur à l' hôte | 82 |
| 2 | Bases moléculaires de la transmission | 83 |
| | Situation avant la prise du repas sanguin | 83 |
| | Modifications moléculaires engendrées par le gorgement | 84 |
| | Initiation de l' infection chez l' hôte vertébré | 85 |
| | L' histoire du vaccin | 86 |
| IV | INTERACTION DE <i>BORRELIA</i> AVEC LA PEAU ET SON SYSTÈME IMMUNITAIRE | 88 |
| 1 | Interaction de <i>Borrelia</i> avec la matrice extracellulaire | 88 |
| | Les adhésines de <i>Borrelia</i> | 88 |
| | <i>Borrelia</i> et destruction de la matrice extracellulaire | 91 |
| 2 | Initiation de la réponse immunitaire par <i>Borrelia</i> | 93 |
| | Interaction de <i>Borrelia</i> avec les TLRs | 94 |
| | Interaction de <i>Borrelia</i> avec les autres PRRs | 96 |
| | Activation des réponses immunitaires spécifiques | 97 |
| 3 | Mécanismes d' échappement de <i>Borrelia</i> à la réponse immunitaire | 101 |

| | |
|---|------------|
| Mécanismes d' échappement à l' action du complément | 101 |
| Mécanismes d' échappement à la réponse immunitaire humorale | 103 |
| Mécanismes « physiques » d' échappement à la réponse immunitaire | 105 |
| Contribution de la salive de tique aux mécanismes d' échappement de <i>Borrelia</i> | 108 |
| <u>PRÉSENTATION DU PROJET</u> | 112 |
| 1 Contexte général | 112 |
| 2 Présentation du projet de recherche | 113 |
| <u>ARTICLE 1</u> | 115 |
| <u>ARTICLE 2</u> | 129 |
| <u>DISCUSSION</u> | 145 |
| I DISCUSSION TECHNIQUE | 145 |
| 1 <i>In vitro et in vivo</i> | 145 |
| 2 Choix des cellules étudiées : kératinocytes et fibroblastes | 147 |
| 3 Choix des spirochètes utilisés et conditions expérimentales de culture | 149 |
| 4 Préparation des extraits de glandes salivaires de tique | 151 |
| 5 Analyse des <i>microarrays</i> | 152 |
| II DISCUSSION SCIENTIFIQUE | 154 |
| 1 La salive de tique dans la transmission de <i>Borrelia</i> | 154 |
| Effet antialarmino de la salive de tique | 155 |
| Effet lytique de la salive de tique sur les fibroblastes cutanés humains | 156 |
| 2 Inflammation cutanée dans la borréliose de Lyme | 158 |
| 3 Recherche d' une « signature » inflammatoire liée à l' origine de la souche | 160 |
| 4 Peau, immunité et maladies à transmission vectorielle | 163 |
| <u>CONCLUSIONS</u> | 166 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u> | 167 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|----|
| FIGURE 1 : PRINCIPALES STRUCTURES DE LA PEAU..... | 7 |
| FIGURE 2 : ORGANISATION DE L' ÉPIDERME ET DES KÉRATINOCYTES | 9 |
| FIGURE 3 : PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DE LA JONCTION DERMO-ÉPIDERMIQUE | 13 |
| FIGURE 4 : ULTRASTRUCTURE DES FIBROBLASTES | 16 |
| FIGURE 5 : HÉTÉROGÉNÉITÉ ANATOMIQUE ET INTRATISSULAIRE DES FIBROBLASTES..... | 16 |
| FIGURE 6 : PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE | 22 |
| FIGURE 7 : SYSTÈME DU COMPLÉMENT..... | 28 |
| FIGURE 8 : LES RÉCEPTEURS DE TYPE TOLL..... | 32 |
| FIGURE 9 : <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> , MALADIE DE LYME – ORIGINE DES MOTS..... | 39 |
| FIGURE 10 : MANIFESTATIONS CUTANÉES DE LA BORRÉLIOSE DE LYME | 47 |
| FIGURE 11 : ASPECTS HISTOLOGIQUES DES MANIFESTATIONS CUTANÉES DE LA BORRÉLIOSE DE LYME . | 48 |
| FIGURE 12 : POSITION TAXONOMIQUE DES TIQUES DU GENRE <i>IXODES</i> | 55 |
| FIGURE 13 : PRINCIPAUX ÉLÉMENTS ANATOMIQUES DE LA TIQUE ET DE SES PIÈCES PIQUEUSES | 55 |
| FIGURE 14 : STASES DE DÉVELOPPEMENT DE LA TIQUE <i>I. RICINUS</i> | 57 |
| FIGURE 15 : ORGANE DE HALLER..... | 57 |
| FIGURE 16 : CYCLE DE DÉVELOPPEMENT DE LA TIQUE | 59 |
| FIGURE 17 : TIQUE « À L' AFFÛT » SUR LA VÉGÉTATION, EN ATTENDANT LE PASSAGE D' UN HÔTE.... | 61 |
| FIGURE 18 : PIQÛRE DE TIQUE..... | 61 |
| FIGURE 19 : DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DES PRINCIPALES TIQUES VECTRICES DE LA BORRÉLIOSE DE LYME | 61 |
| FIGURE 20 : POSITION TAXONOMIQUE DES BACTÉRIES DU GENRE <i>BORRELIA</i> | 74 |
| FIGURE 21 : STRUCTURE DES BACTÉRIES DU GENRE <i>BORRELIA</i> | 77 |
| TABLEAU 1 : PROTÉINES ANTI-HÉMOSTATIQUES ET IMMUNOMODULATRICES DE LA SALIVE DE TIQUE. . | 64 |

Figure 1 : Principales structures de la peau



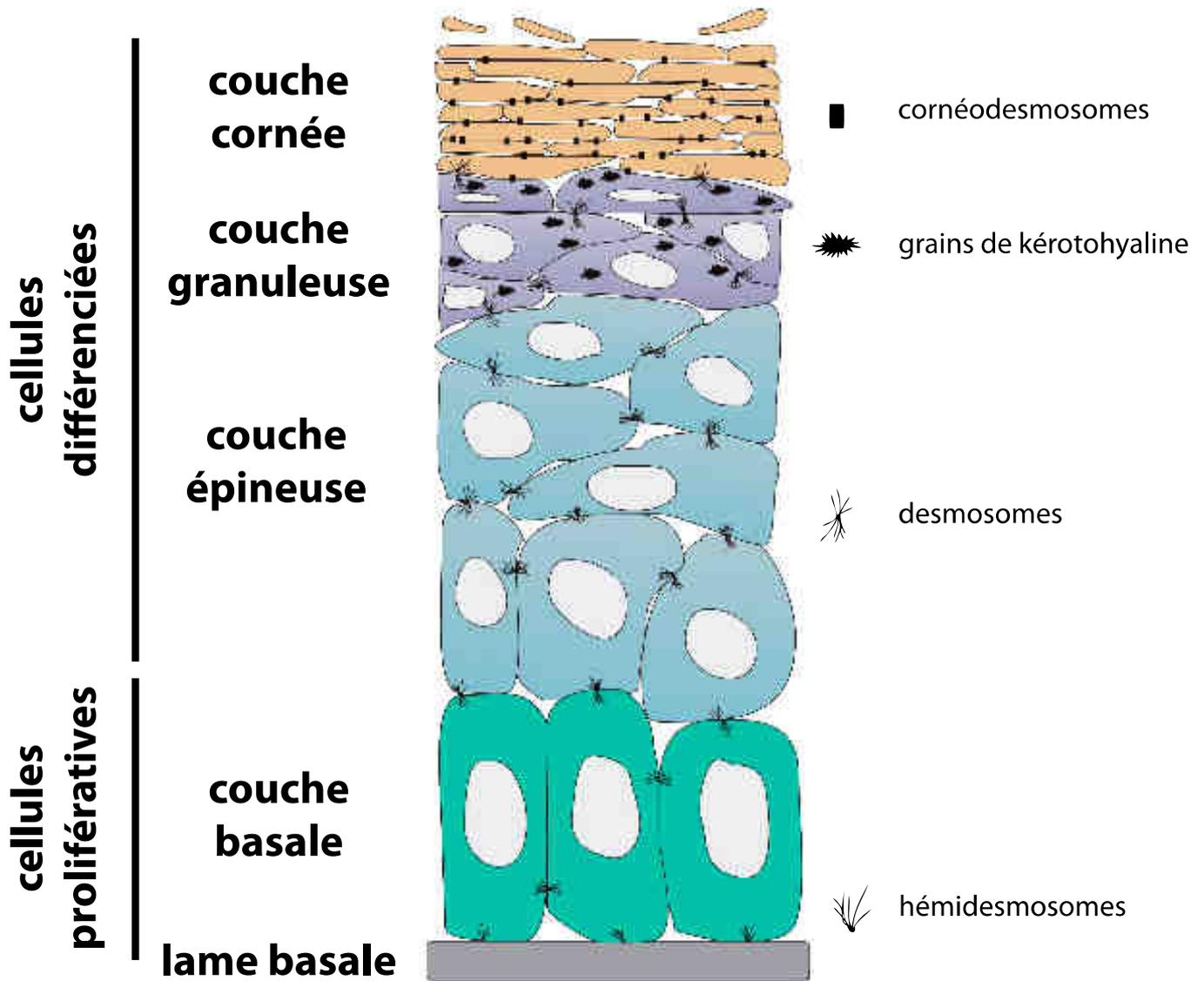
D'après Grice et coll., 2011.

INTRODUCTION

I LA PEAU : SA STRUCTURE ET SES PRINCIPALES COMPOSANTES

La peau est un tissu complexe qui constitue une barrière contre les agressions physiques et chimiques du milieu extérieur [Proksch et coll., 2008]. Elle constitue également une barrière immunologique contre les microorganismes qui colonisent de façon transitoire ou permanente sa surface [Grice et coll., 2011], ou qui y pénètrent au bénéfice d'une effraction cutanée, à l'image des bactéries, virus, ou parasites des maladies à transmission vectorielle [Nestle et coll., 2009]. Outre son rôle de protection, la peau est également un organe sensoriel [Birder et coll., 1994]. Elle exerce aussi diverses fonctions métaboliques (synthèse de la vitamine D3, par exemple [Holick, 1988]), et participe à la régulation thermique de l'organisme. La peau est constituée d'un épithélium – l'épiderme – qui repose sur un tissu conjonctif – le derme (Figure 1). La peau repose elle-même sur le tissu adipeux sous-cutané – l'hypoderme –, qui assure la jonction entre celle-ci et les organes et tissus sous-jacents.

Figure 2 : Organisation de l'épiderme et des kératinocytes



D'après Denecker et coll., 2008.

A L'ÉPIDERME ET LES KÉRATINOCYTES

L'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau. Son épaisseur est faible, de l'ordre du dixième de millimètre, mais varie considérablement selon la partie du corps considérée¹ [Kanitakis, 2002]. L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé d'origine ectodermique. Les kératinocytes y sont très largement majoritaires puisqu'ils représentent à eux seuls plus de 95 % des cellules de l'épiderme [Kanitakis, 2002]. L'agencement et la différenciation des kératinocytes permettent d'individualiser quatre couches successives au sein de l'épiderme [Stevens et coll., 2006].

La **couche basale** est la couche la plus profonde (Figure 2). Elle est constituée d'une seule assise de kératinocytes non différenciés : les kératinocytes basaux. Ce sont des cellules hautes, cylindriques, dont le grand axe est perpendiculaire à la jonction dermo-épidermique. Elles sont reliées entre elles et aux cellules de la couche épineuse adjacente par des desmosomes ; elles sont également reliées à la lame basale sous-jacente par des hémidesmosomes [Kanitakis, 2002]. Les kératinocytes basaux sont des cellules souches dont la prolifération, puis la migration vers les couches supérieures et la différenciation cellulaire permettent le renouvellement constant de l'épiderme. Les cellules basales qui migrent dans la **couche épineuse** perdent leur morphologie cylindrique, elles s'aplatissent et prennent un aspect polygonal. Sur les préparations histologiques, où existe une certaine rétraction du cytoplasme, les kératinocytes de la couche épineuse semblent accrochés entre eux par des épines (d'où le nom donné à cette couche de cellules), qui correspondent à autant de desmosomes permettant l'ancrage des filaments de kératine² [Kanitakis, 2002]. La production de kératine dans ces cellules augmente, les filaments de kératine deviennent plus épais et plus

¹ En peau fine (paupières par exemple) son épaisseur ne dépasse pas 50 µm, alors qu'en peau épaisse (paume des mains et plante des pieds) son épaisseur peut atteindre 1 mm en raison de l'importance de la couche cornée.

² Les kératines sont les composants des filaments intermédiaires des cellules épithéliales.

denses. Les kératinocytes de la couche épineuse de l'épiderme forment plusieurs rangées cellulaires (3 à 4 assises cellulaires en peau fine et 8 à 10 en peau épaisse). La **couche granuleuse**, située au-dessus de la couche épineuse, est formée par 2 à 3 rangées de cellules. Les kératinocytes de la couche granuleuse sont très aplatis et leur noyau commence à dégénérer [Stevens et coll., 2006]. Ces cellules sont caractérisées par l'accumulation de matériel cytoplasmique majoritairement composé de kératine et de lipides. L'aspect granuleux est dû à la présence de grains de kératohyaline³ et de petits grains lamellaires riches en lipides, les kératinosomes⁴. La **couche cornée** représente la couche la plus superficielle de l'épiderme. C'est elle qui confère le plus à la peau sa fonction de barrière physique [Proksch et coll., 2008]. Elle est composée de 5 à 10 assises de cellules mortes, les cornéocytes. Ces cellules sont complètement aplaties, dépourvues de noyau et d'organites intracellulaires, et leur cytoplasme est composé de kératine et de filaggrine⁵. Les cornéocytes les plus superficiels se détachent de l'épiderme après la lyse du ciment intercellulaire et des desmosomes⁶. Dans certaines régions corporelles (en peau épaisse uniquement), on distingue encore une 5^e couche, la couche claire (*stratum lucidum*) qui correspond à une zone intermédiaire de transition entre la couche granuleuse et la couche cornée et dont le rôle principal est de limiter les forces de friction entre ces deux structures [Stevens et coll., 2006].

Outre les kératinocytes, l'épiderme comprend également les mélanocytes, les cellules de Merkel⁷, ainsi que des cellules immunitaires spécialisées d'origine hématopoïétique : il s'agit

³ Les grains de kératohyaline contiennent de multiples copies de profilaggrine. Dans la couche cornée, la profilaggrine se transforme en filaggrine qui participe à formation de la matrice cytoplasmique des cornéocytes.

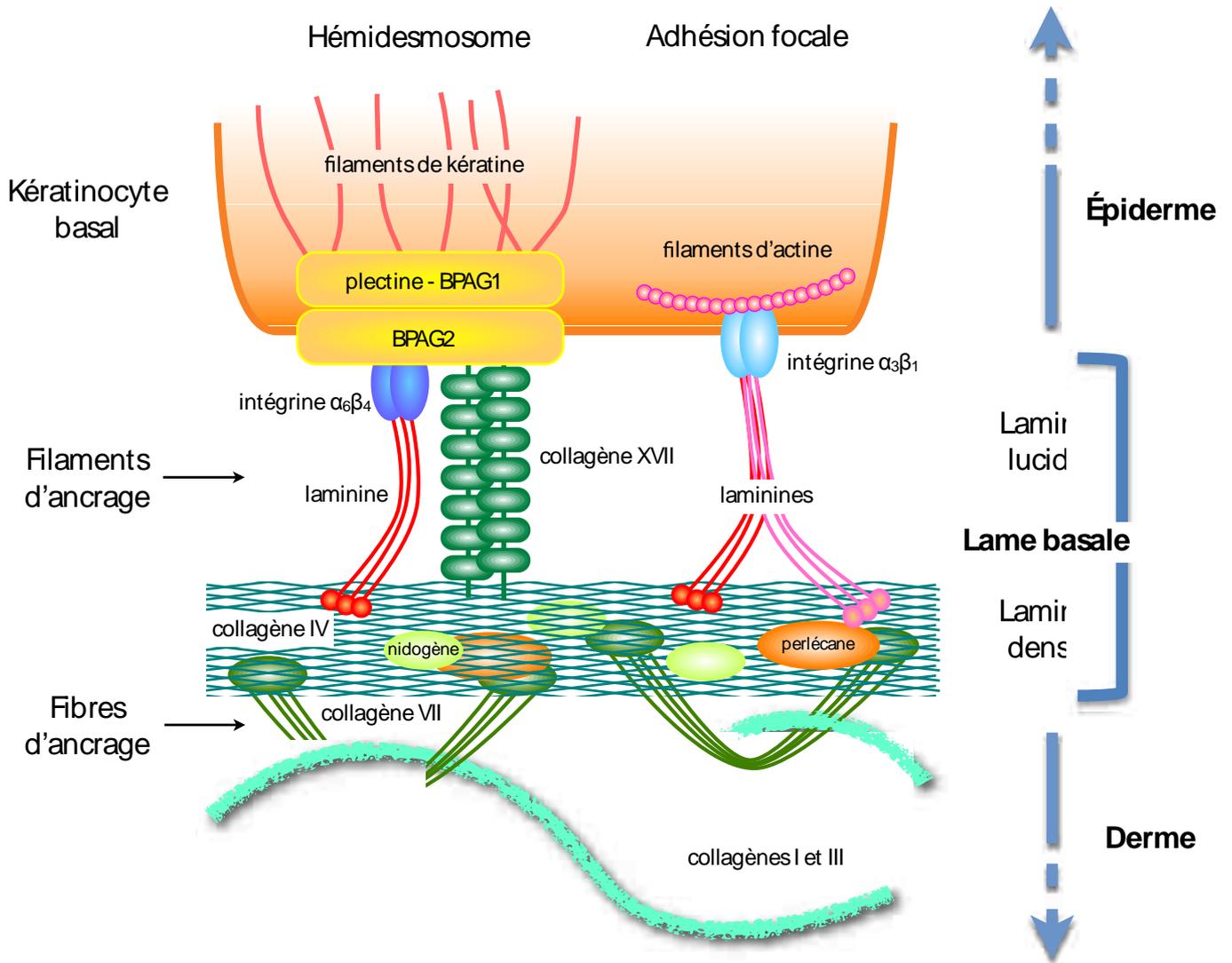
⁴ Les kératinosomes déversent leur contenu par exocytose dans les espaces intercellulaires de la couche cornée ; ils y forment un ciment intercornéocytaire fait de lamelles lipidiques.

⁵ La filaggrine agrège les filaments de kératine et permet leur organisation en faisceaux dans les cornéocytes.

⁶ C'est le phénomène de desquamation.

⁷ Ces cellules ont pour fonctions celles de mécanorécepteurs, et pourraient également exercer des fonctions trophiques sur les terminaisons nerveuses périphériques et les annexes cutanées.

majoritairement des cellules de Langerhans, mais également de lymphocytes T, principalement CD8⁺ [Nestle et coll., 2009]. Les cellules de Langerhans sont les cellules dendritiques de l'épiderme, leur fonction principale est de capturer les antigènes et de les présenter aux lymphocytes T CD4⁺ après avoir migré vers les ganglions lymphatiques. L'épiderme ne contient ni vaisseaux sanguins ni vaisseaux lymphatiques. Il est séparé du tissu conjonctif sur lequel il repose – le derme –, par une lame basale qui constitue la jonction dermo-épidermique.

Figure 3 : Principaux éléments de la jonction dermo-épidermique

NOTE. BPAG1 : *bullous pemphigoid antigen-1*. BPAG2 : *bullous pemphigoid antigen-2*.

D'après http://www.netzwerk-eb.de/e14/e193/e249/index_eng.html.

B LA JONCTION DERMO-ÉPIDERMIQUE

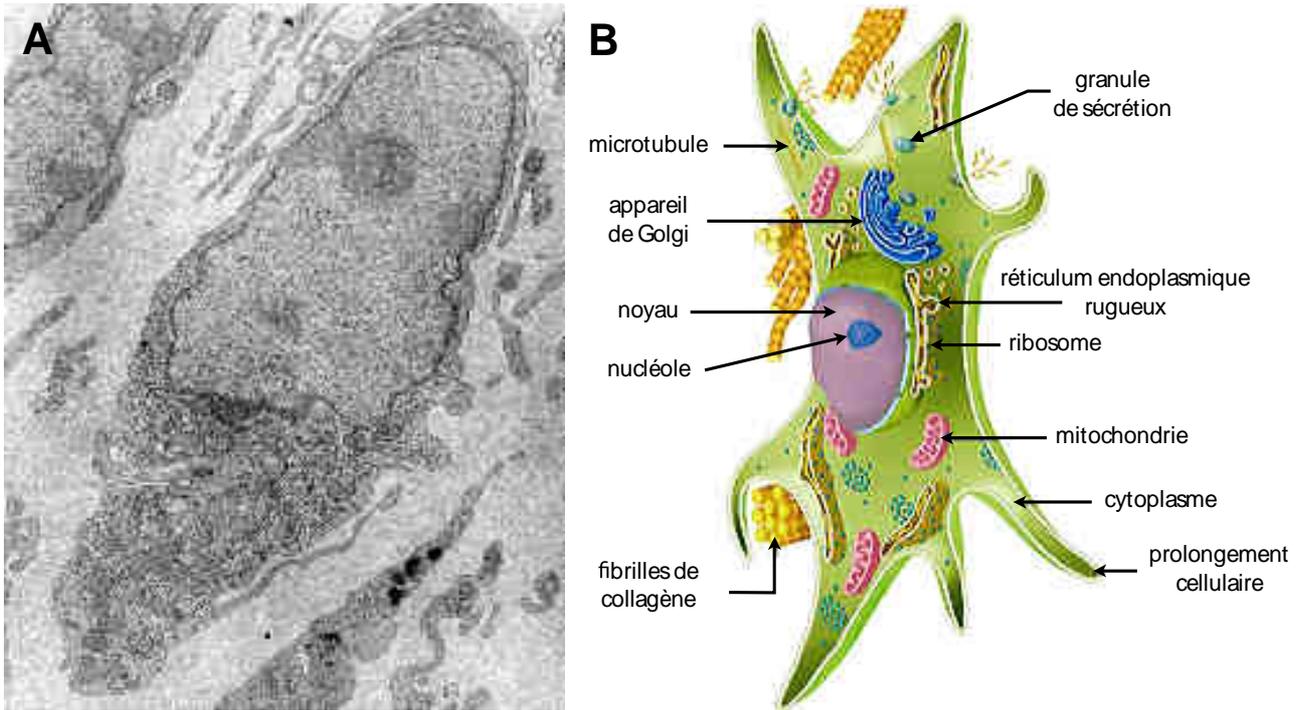
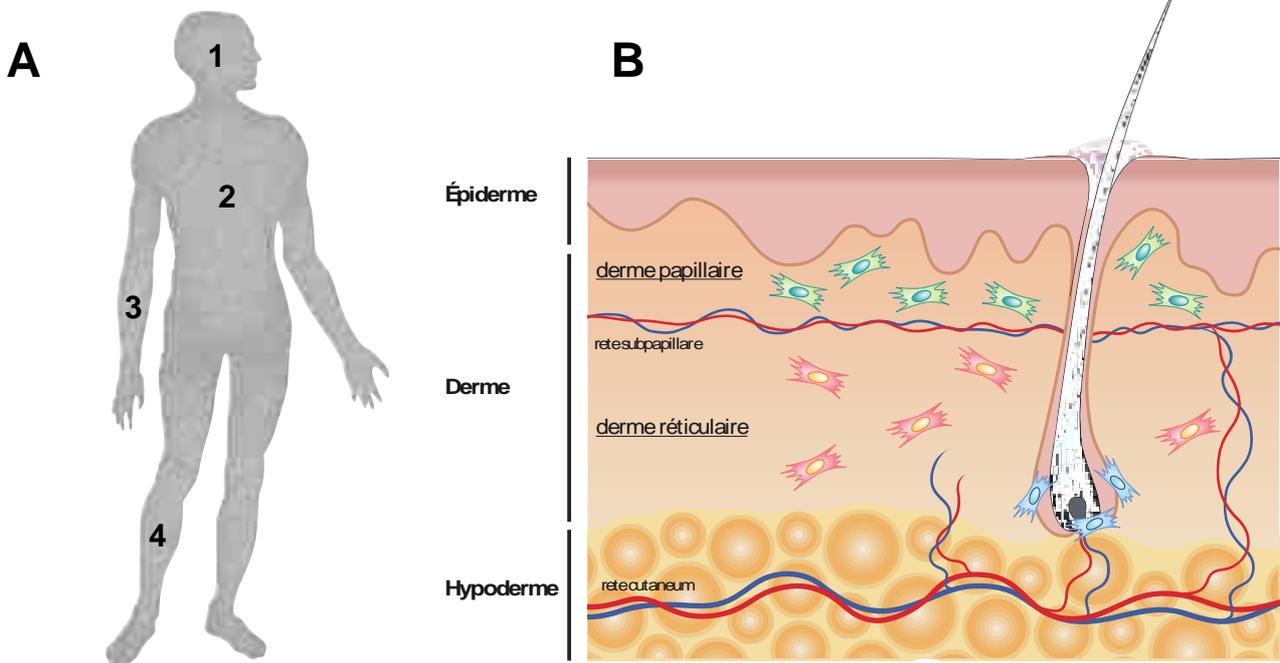
La jonction dermo-épidermique représente une structure spécialisée de la matrice extracellulaire, qui sépare l'épithélium sus-jacent – l'épiderme – du tissu conjonctif sous-jacent – le derme (Figure 3). La jonction dermo-épidermique est une lame basale, synthétisée conjointement par les fibroblastes du derme et par les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. La lame basale joue un rôle fondamental comme support mécanique permettant l'adhésion entre derme et épiderme. Elle intervient également comme support à l'adhésion et la migration des kératinocytes lors de la restauration de l'épiderme après blessure cutanée [Martin, 1997]. Enfin, la lame basale se comporte également comme une barrière régulant les échanges métaboliques et les migrations cellulaires (cellules de Langerhans, lymphocytes) entre derme et épiderme [Kanitakis, 2002].

C LE DERME : FIBROBLASTES ET MATRICE EXTRACELLULAIRE

Le derme est un tissu conjonctif d'origine mésodermique sur lequel repose l'épiderme. Il contient des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, des nerfs, ainsi que les annexes cutanées (glandes sudoripares, follicules pileux et glandes sébacées). La diversité cellulaire du derme est plus importante que celle de l'épiderme. Outre les fibroblastes qui y représentent les cellules résidentes principales, le derme comprend également de nombreuses cellules immunitaires spécialisées (cellules dendritiques dermiques, mastocytes, macrophages, lymphocytes T CD4⁺, lymphocytes T $\gamma\delta$ et lymphocytes NKT⁸), et les cellules de soutien des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins et lymphatiques. L'épaisseur du derme, de l'ordre du millimètre, est plus grande que celle de l'épiderme, mais varie selon la partie du corps considérée⁹ [Kanitakis, 2002]. La surface du derme au contact de l'épiderme présente de nombreuses projections – papilles dermiques – qui s'imbriquent avec des projections épidermiques – crêtes épidermiques (Figure 1, page 7). L'interdigitation entre derme et épiderme renforce la jonction dermo-épidermique et augmente considérablement la surface d'échange entre les deux structures. Le derme est divisé en deux couches : le derme papillaire (en superficie) et le derme réticulaire (en profondeur), séparés par le plexus vasculaire sous-papillaire (*rete subpapillare*). Un plexus vasculaire dermique profond (*rete cutaneum*) sépare le derme réticulaire de l'hypoderme sous-jacent. Le derme, à l'image de l'épiderme, est un tissu en renouvellement constant qui résulte d'un équilibre entre synthèse et destruction des composants protéiques de la matrice extracellulaire.

⁸ NKT : lymphocyte *natural killer T*.

⁹ L'épaisseur du derme peut atteindre près de 4 mm au niveau du dos, des paumes des mains ou des plantes des pieds.

Figure 4 : Ultrastructure des fibroblastesD'après : http://medinfo.ufl.edu/~dental/denhisto/em/em2_fibroblast.jpgD'après : <http://www.rejuvenal.info/images/Terminology/FibroblastImage.jpg>**Figure 5 : Hétérogénéité anatomique et intratissulaire des fibroblastes**

NOTE. A : Les fibroblastes des régions anatomiques 1–4 présentent des différences importantes dans leur expression génique [Chang et coll., 2002]. B : Au sein d'une même zone anatomique, les fibroblastes du derme papillaire, du derme réticulaire et les fibroblastes associés aux follicules pileux présentent également des différences fonctionnelles.

1 LES FIBROBLASTES

Les fibroblastes sont les cellules résidentes principales du derme. Ce sont des cellules allongées de morphologie fusiforme ou étoilée. En microscopie optique, leur cytoplasme est peu visible, au contraire de leur noyau. En microscopie électronique, on y observe tous les organites cellulaires habituels et en particulier les organites impliqués dans la synthèse des protéines (Figure 4).

Les fibroblastes du derme représentent une population hétérogène de cellules. L'hétérogénéité des fibroblastes se décline à deux niveaux : anatomique et intratissulaire (Figure 5). L'hétérogénéité anatomique relative à la zone corporelle considérée est liée à l'origine embryologique multiple de ces cellules, mésodermique ou neurectodermique [Sorrell et coll., 2009]. L'impact fonctionnel de cette hétérogénéité anatomique est important : des études transcriptomiques réalisées sur des fibroblastes cutanés issus de sites anatomiques variés ont montré l'existence de différences significatives dans l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de la matrice extracellulaire, dans le métabolisme lipidique, ainsi que dans les mécanismes de migration et de différenciation cellulaire [Chang et coll., 2002; Rinn et coll., 2006; Rinn et coll., 2008]. Par ailleurs, au sein d'un même site anatomique, les fibroblastes cutanés présentent une hétérogénéité intratissulaire, également objectivée par des différences fonctionnelles entre trois sous-populations cellulaires distinctes de fibroblastes : les fibroblastes superficiels du derme papillaire, les fibroblastes profonds du derme réticulaire et les fibroblastes associés aux gaines des follicules pileux [Sorrell et coll., 2004; Pflieger et coll., 2006].

Les fibroblastes synthétisent les quatre grandes classes des constituants de la matrice extracellulaire : les collagènes, l'élastine, les protéoglycanes et les glycoprotéines de liaison (fibronectine et laminines) [Alberts et coll., 2011]. Les fibroblastes synthétisent également des enzymes protéolytiques (métalloprotéases matricielles et sérine-protéases) dont le rôle

principal est le clivage des différents constituants protéiques matriciels [Shapiro, 1998]. Dans le derme, les fibroblastes sont donc à la fois les cellules principales de soutien et les maîtres-architectes du remodelage de la matrice extracellulaire. Néanmoins, la restriction des fibroblastes à ce seul rôle a longtemps conduit à considérer ces cellules comme les moins spécialisées du tissu conjonctif. C'est oublier les nombreuses autres fonctions jouées par ces cellules qui sont au centre de nombreux processus de régulation cellulaire [Sorrell et coll., 2009].

Les fibroblastes du derme interagissent avec les autres cellules résidentes de la peau, comme les kératinocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux dermiques. Des boucles paracrines permettent une interaction étroite entre kératinocytes et fibroblastes : la production d'IL-1 α par les kératinocytes induit notamment la synthèse par les fibroblastes dermiques de KGF-1¹⁰ et de GM-CSF¹¹ [Maas-Szabowski et coll., 1996], deux facteurs de croissance qui agissent en retour sur la croissance et la différenciation des kératinocytes [Maas-Szabowski et coll., 2001]. Les boucles paracrines de stimulation cellulaire entre fibroblastes et cellules épithéliales (kératinocytes, cellules endothéliales des vaisseaux dermiques) jouent un rôle majeur dans la prolifération et la différenciation cellulaire épidermique [Yamaguchi et coll., 1999], dans la constitution et l'organisation de la jonction dermo-épidermique [Marinkovich et coll., 1993] ainsi que dans les processus de cicatrisation des blessures cutanées [Martin, 1997; Werner et coll., 2007]. Les fibroblastes sont des cellules clés dans la cicatrisation cutanée après une blessure, et ce à toutes les étapes successives de ce processus – phase inflammatoire, phase épithéliale, phase de remodelage tissulaire –, et l'interaction des fibroblastes avec les kératinocytes et les cellules endothéliales y contribue largement. De plus, les fibroblastes jouent un rôle important dans la synthèse de la nouvelle matrice

¹⁰ KGF-1 : *keratinocyte growth factor-1*.

¹¹ GM-CSF : *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*.

extracellulaire (riche en collagène, fibronectine et acide hyaluronique) et participent ainsi à la formation du tissu de granulation¹² [Martin, 1997]. Enfin, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes¹³, stimulée par l'expression forte de TGF- β 1¹⁴ et de fibronectine dans la plaie, confère à ces cellules des propriétés contractiles qui contribuent au rapprochement des parois de la plaie [Martin, 1997; Lorena et coll., 2002].

Enfin, les fibroblastes interagissent avec les cellules immunitaires spécialisées. Lors d'un processus cutané pathologique (tumoral ou infectieux, par exemple), les fibroblastes contribuent au recrutement et à l'infiltration des cellules immunitaires dans la peau par la synthèse de cytokines et de chimiokines (comme l'IL-8, l'IL-6 ou encore MCP-1¹⁵) [Brouty-Boye et coll., 2000; Galindo et coll., 2001; Silzle et coll., 2004]. L'expression de CD40¹⁶ par les fibroblastes permet également une interaction directe avec les cellules immunitaires exprimant CD40-ligand (lymphocytes B, lymphocytes T, cellules dendritiques, macrophages ...) [Smith et coll., 1997; Brouty-Boye et coll., 2000]. L'interaction CD40/CD40-ligand contribue d'une part à l'activation des leucocytes recrutés et d'autre part à l'accentuation du recrutement de ces dernières par une stimulation de la synthèse des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires [Banchereau et coll., 1994]. De plus, les fibroblastes dermiques sont également capables d'induire la maturation des cellules dendritiques cutanées, lors de leur migration depuis la peau vers les ganglions lymphatiques de drainage [Saalbach et coll., 2007]. Les fibroblastes peuvent ainsi être considérés comme de

¹² Le tissu de granulation est un tissu conjonctif richement vascularisé qui remplace le caillot de fibrine lors de la phase proliférative du processus de cicatrisation cutanée. Il est composé d'une matrice extracellulaire riche en collagène de type III, synthétisée par les fibroblastes.

¹³ Les myofibroblastes présentent des caractéristiques ultra-structurales et fonctionnelles proche de celles des muscles avec une forte expression d' α -actine musculaire.

¹⁴ TGF- β 1 : *transforming growth factor* β 1.

¹⁵ MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein* 1.

¹⁶ CD40 est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF- α .

véritables cellules sentinelles du système immunitaire inné [Smith et coll., 1997; Silzle et coll., 2004; Saalbach et coll., 2007].

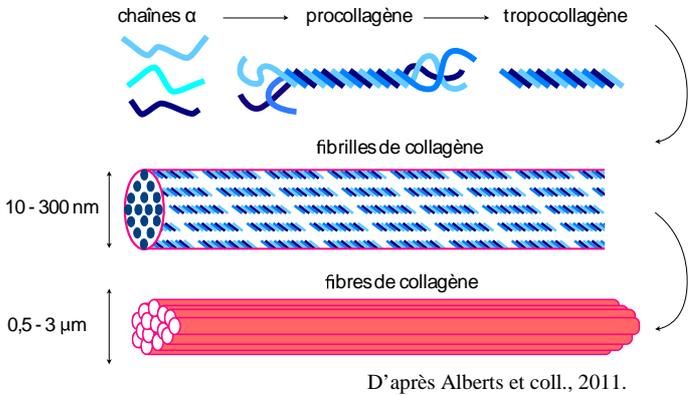
2 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Dans la peau, la matrice extracellulaire est un réseau tridimensionnel complexe de macromolécules au sein duquel les cellules du derme sont dispersées. La matrice extracellulaire n'est pas seulement un échafaudage structural qui supporte les tensions mécaniques auxquelles le tissu est soumis, elle joue aussi un rôle important dans les mécanismes qui régulent l'adhérence, la migration, la prolifération ainsi que la différenciation cellulaire [Alberts et coll., 2011]. Dans la peau, la matrice extracellulaire est principalement synthétisée par les fibroblastes. Parmi les composants moléculaires de la matrice extracellulaire, les protéines fibreuses que sont les collagènes et l'élastine (organisés sous forme de fibres) représentent les éléments de structure les plus importants. Les autres éléments protéiques principaux de la matrice extracellulaire (**fibronectine**, laminine) contribuent à la fois à organiser les éléments structuraux de la matrice et à favoriser l'adhérence des cellules à celle-ci. Enfin, des chaînes polysaccharidiques de glycosaminoglycanes¹⁷ viennent constituer une substance de base fortement hydratée dans laquelle les protéines fibreuses et les cellules sont incluses. La matrice extracellulaire est un tissu dont le remodelage permanent repose sur l'équilibre entre synthèse et destruction de ses constituants : cette dernière fonction est assurée par des métalloprotéases matricielles et des sérines-protéases.

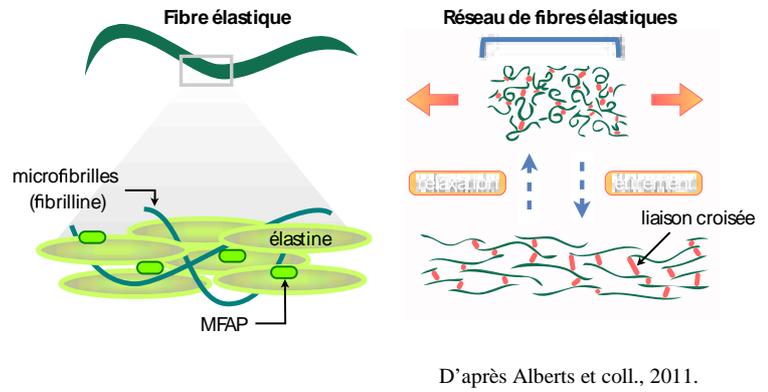
¹⁷ Associés de façon covalente avec un corps protéique, les glycosaminoglycanes forment des protéoglycanes.

Figure 6 : Principaux éléments de la matrice extracellulaire

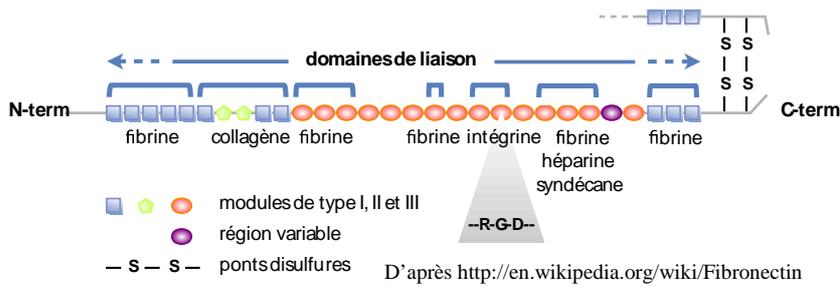
Collagène



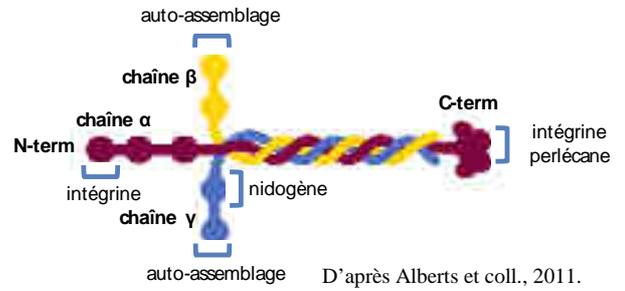
Fibres élastiques



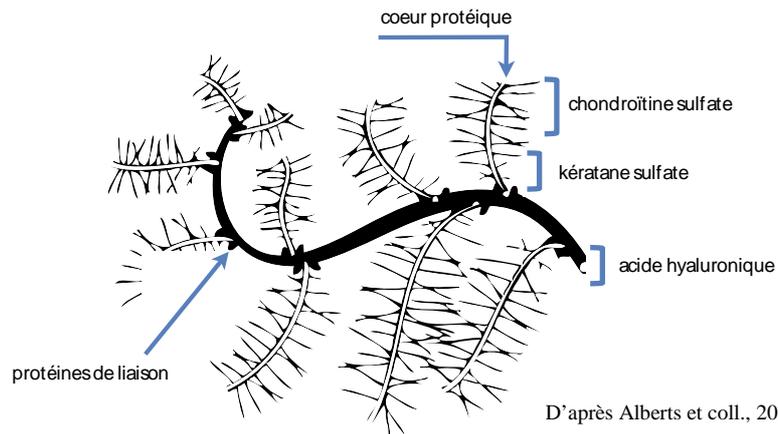
Fibronectine



Laminines



Protéoglycanes



Composants principaux de la matrice extracellulaire

Les fibres de collagène : une molécule de collagène est formée par l'assemblage hélicoïdal de trois chaînes α , la polymérisation des molécules de collagène permet la formation de fibrilles de collagène (10 à 300 nm de diamètre) et l'agrégation finale de ces polymères permet la constitution des fibres de collagène (plusieurs micromètres de diamètre) [Alberts et coll., 2011]. La grande majorité des fibres présentes dans le derme sont des fibres de collagène de type I et III¹⁸ : le derme réticulaire contient plus de collagène de type III que le derme papillaire et les fibres de collagène y sont plus organisées [Kanitakis, 2002]. Les fibres de collagène sont responsables de la résistance aux tensions mécaniques qui s'exercent sur le derme.

Les fibres élastiques : les fibres élastiques sont constituées d'un noyau protéique fibreux central – l'élastine –, recouvert d'une gaine de microfibrilles. Les microfibrilles sont elles-mêmes principalement composées d'une glycoprotéine qui se lie à l'élastine – la fibrilline –, associée à de petites molécules, les *microfibril-associated glycoproteins* (MFAP) [Alberts et coll., 2011]. Le réseau de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire du derme confère à la peau son élasticité.

La fibronectine : la fibronectine est un dimère composé de deux sous-unités¹⁹ réunies par des ponts disulfures à l'une de leurs extrémités, et chaque sous-unité est repliée en une série de domaines fonctionnels distincts, connectés par des segments polypeptidiques flexibles [Alberts et coll., 2011]. Les différents domaines fonctionnels représentent des sites

¹⁸ Plus de 42 gènes humains codent des chaînes α de collagène différentes et 27 types de collagènes résultent des différentes combinaisons d'assemblage de ces chaînes α .

¹⁹ Dans le génome humain, un seul gène code la fibronectine, mais l'épissage alternatif des transcrits est à l'origine de nombreuses isoformes différentes de la fibronectine.

spécifiques d'interaction avec d'une part les constituants moléculaires de la matrice extracellulaire (comme le collagène ou l'héparine) et d'autre part les cellules. Une séquence particulière de trois acides aminés – arginine/glycine/acide aspartique (ou RGD) – constitue un site d'interaction important pour la fixation des intégrines et représente ainsi une des composantes de l'interaction entre cellules et matrice extracellulaire [Alberts et coll., 2011].

Les laminines : les laminines sont une des composantes principales de la lame basale. Il s'agit d'une famille de protéines flexibles, composées de trois longues chaînes polypeptidiques (α , β et γ)²⁰ reliées par des ponts disulfures, arrangées à la manière d'un bouquet à trois fleurs dont les tiges sont enroulées et les têtes restent séparées [Alberts et coll., 2011]. Les molécules de laminine jouent un rôle majeur dans l'assemblage et l'organisation de la lame basale et dans son ancrage aux cellules (par son domaine de liaison aux intégrines).

Les glycosaminoglycane et les protéoglycane : les glycosaminoglycane (GAG) sont des chaînes polysaccharidiques composées de répétitions d'unités disaccharidiques²¹. Il existe quatre groupes de GAG – les acides hyaluroniques, les chondroïtines/dermatanes sulfates, les héparines sulfates et les kératanes sulfates –, et à l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAG établissent une liaison covalente avec une protéine pour former un protéoglycane [Alberts et coll., 2011]. Parmi les protéoglycane d'intérêt, on peut citer le perlécane qui est un composant de la lame basale, et la **décorine** qui se lie aux fibres de collagène et en contrôle l'assemblage.

²⁰ Cinq types de chaînes α , trois types de chaînes β et trois types de chaîne γ sont connues, mais seules 12 isoformes de laminines sont décrites chez l'homme.

²¹ Un des deux sucres qui composent le disaccharide répétitif est toujours aminé et aussi le plus souvent sulfaté.

Les enzymes protéolytiques : métalloprotéases et sérine-protéases

La capacité des cellules du derme à détruire la matrice extracellulaire est aussi importante que leur capacité à la synthétiser et à se lier à elle. Cette capacité est mise à profit dans les processus de réparation tissulaire, mais également dans les mécanismes de prolifération et de migration cellulaire. Ainsi, même dans un tissu sain, la matrice extracellulaire n'est pas statique, il s'agit vraiment d'un tissu dynamique soumis à un lent renouvellement constant. La destruction des composantes de la matrice extracellulaire repose sur l'activité d'enzymes protéolytiques (protéases) qui appartiennent principalement à la classe des **métalloprotéases**²² matricielles ou à la classe des **sérines-protéases**²³.

Certaines métalloprotéases comme la collagénase MMP1²⁴ (qui clive le collagène de type I et II) ou l'élastase MMP12 (qui clive l'élastine des fibres élastiques) sont assez spécifiques, d'autres comme la stromélysine MMP3 ou la matrilysine MMP7 ont une activité catalytique sur un plus grand nombre de substrats, et le spectre protéolytique de ces différentes métalloprotéases est parfois chevauchant [Vu et coll., 2000]. L'intégrité structurale de la matrice est obtenue grâce à un contrôle étroit de l'activité des métalloprotéases matricielles. La régulation de cette activité est assurée par le contrôle de l'activation des précurseurs enzymatiques, la sécrétion d'inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP²⁵), et le confinement de certaines protéases à la surface cellulaire (métalloprotéases membranaires MMP14, MMP15, MMP16 et MMP17) [Vu et coll., 2000]. Outre leur rôle majeur dans le remodelage de la matrice extracellulaire, les métalloprotéases matricielles interviennent également dans le contrôle et la modulation de la réponse inflammatoire et de l'immunité

²² Le site catalytique des métalloprotéases contient un ion métallique (zinc le plus souvent), d'où leur nom.

²³ La séquence peptidique du site catalytique des sérines-protéases contient toujours une sérine, d'où leur nom.

²⁴ MMP : *matrix metalloprotease*.

²⁵ TIMP : *tissue inhibitors of metalloproteases*.

innée, par leur action potentialisatrice ou inhibitrice sur l'activité des cytokines et des chimiokines [Parks et coll., 2004]. Par exemple, la métalloprotéase MMP9 induit le clivage et l'activation de la chimiokine IL-8 [Van den Steen et coll., 2000]. À l'inverse, d'autres métalloprotéases comme MMP1, -3, -13 et -14 induisent le clivage et l'inactivation des chimiokines CCL2, CCL8 et CCL13 [McQuibban et coll., 2002].

Des sérines-protéases participent également à la destruction des composants protéiques matriciels. L'exemple typique de ces sérines-protéases est la plasmine, enzyme clé du processus de fibrinolyse, et dont le rôle tissulaire est moins souvent évoqué. La plasmine est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif – le plasminogène. L'activation du plasminogène en plasmine est sous la dépendance d'activateurs du plasminogène (tPA²⁶ et uPA²⁷), eux-mêmes contrôlés par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI-1²⁸ et PAI-2). Dans les tissus, la plasmine est capable de détruire directement les composants protéiques de la matrice extracellulaire (à l'exception du collagène) [Saksela et coll., 1988], ou indirectement par l'activation des métalloprotéases (comme MMP1 et MMP9) [Davis et coll., 2001].

²⁶ tPA : *t*issue-*t*ype *p*lasminogen *a*ctivator.

²⁷ uPA : *u*rokinase-*t*ype *p*lasminogen *a*ctivator.

²⁸ PAI : *p*lasminogen *a*ctivator *i*nhibitor.

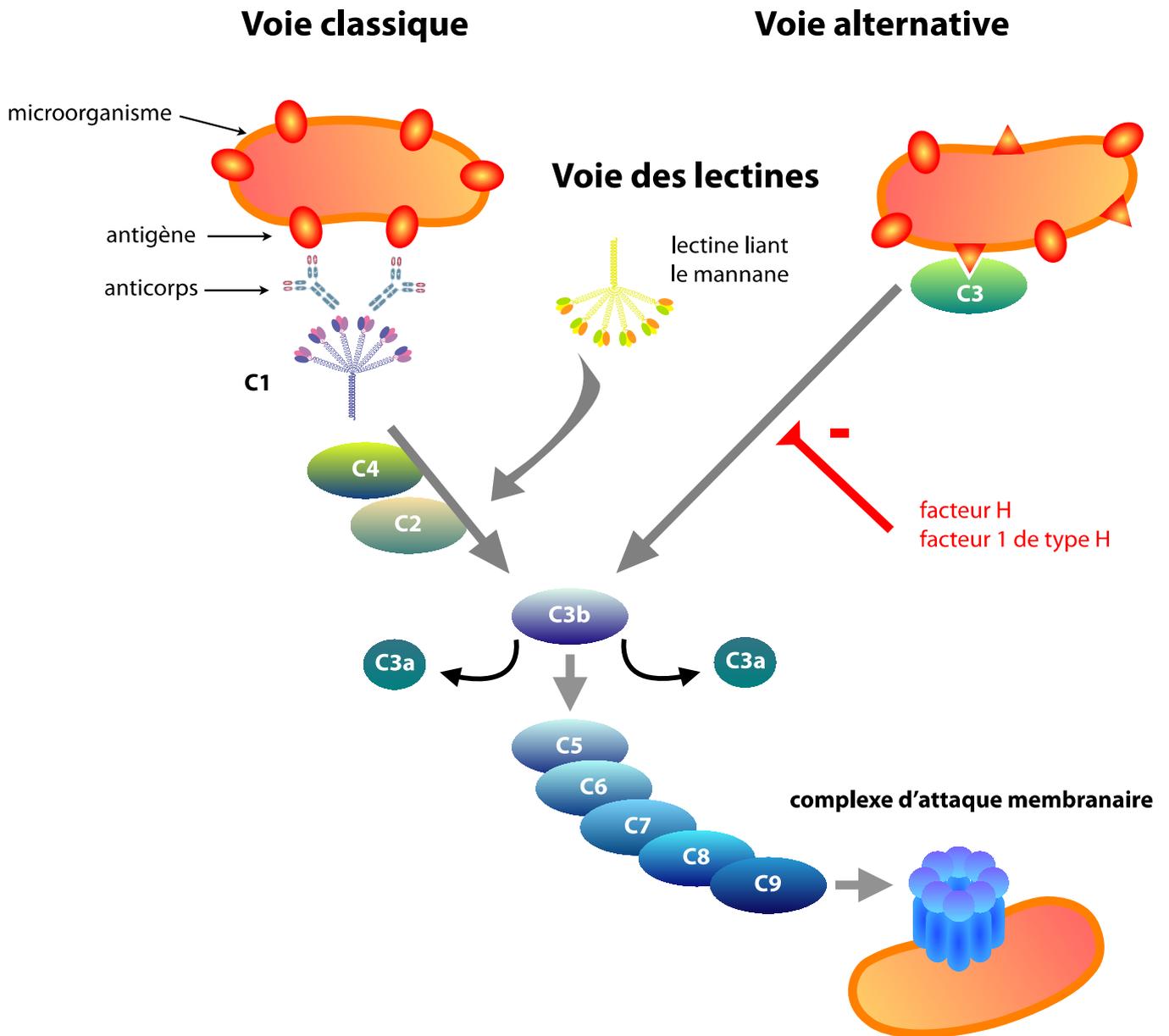
D LES DÉFENSES IMMUNITAIRES DE LA PEAU

La première ligne de défense de la peau contre les agents pathogènes est la barrière physique que l'épiderme (et en particulier sa couche cornée) constitue. La flore commensale cutanée contribue également à la protection de la peau contre les agents pathogènes, dans la mesure où les germes commensaux entrent en compétition avec les germes pathogènes pour la même niche écologique [Alberts et coll., 2011]. À cette première protection s'ajoutent les défenses immunitaires spécialisées, dont les composantes innée et adaptative sont étroitement liées.

1 LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE

La principale fonction du système immunitaire inné (dans la peau mais également dans tous les autres organes) est d'assurer la défense immédiate de l'organisme contre les agents pathogènes, avant que les mécanismes plus spécifiques – mais aussi plus lents à se développer – du système immunitaire adaptatif ne se mettent en place. De plus, le système immunitaire inné contribue, par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigènes et des très nombreuses molécules de signalisation extracellulaires qu'il produit, à l'activation des réponses adaptatives. Le système immunitaire inné de la peau s'articule autour de médiateurs solubles variés (cascade du complément, peptides antimicrobiens, cytokines et chimiokines), de cellules immunitaires spécialisées, et de cellules épithéliales et conjonctives (kératinocytes, fibroblastes), qui participent à la synthèse des médiateurs solubles.

Figure 7 : Système du complément



La cascade du complément

Le système du complément²⁹ (Figure 7) est composé de plus d'une trentaine de protéines, présentes à la fois dans le compartiment plasmatique et dans les espaces extracellulaires tissulaires. Il est organisé sous la forme d'une cascade enzymatique comportant trois voies d'activation, un composant central (C3) et une voie effectrice commune. Le système comprend également un ensemble complexe de protéines régulatrices qui assurent son contrôle et permettent de protéger les cellules de l'hôte. La **voie classique** (activation initiale de C1) est initiée par la fixation d'anticorps de type IgG ou IgM à leurs antigènes cibles³⁰ ; la **voie des lectines** (activation initiale de la lectine liant le mannane) et la **voie alternative** (activation directe de C3³¹) sont initiées par divers résidus (comme le mannose ou la N-acétylglucosamine pour la voie des lectines, ou le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif pour la voie alternative) présents à la surface des microorganismes [Male et coll., 2007]. Les trois voies conduisent à l'immobilisation du fragment **C3b** à la surface du pathogène, qui déclenche à son tour l'activation des composants tardifs du complément (C5 à C9), dont l'assemblage en « **complexe d'attaque membranaire** » aboutit à la formation d'un pore transmembranaire qui entraîne finalement la lyse du pathogène cible. Outre l'action lytique directe exercée sur les agents pathogènes, le complément participe également au recrutement des cellules phagocytaires (effets chimiotactiques de petits composants formés comme C3a et C5a), à l'induction du processus de phagocytose (opsonisation de la cible), et à

²⁹ Le terme « complément » a été proposé par Paul Ehrlich en 1897 pour désigner les capacités de ce système à amplifier (ou « compléter ») les propriétés bactéricides du sérum.

³⁰ Cette voie nécessite que l'hôte ait préalablement développé des anticorps spécifiques contre le pathogène cible. À ce titre, la voie classique du complément est liée à la réponse immunitaire adaptative.

³¹ L'hydrolyse naturelle de C3 permet la génération permanente à bas bruit de C3a et C3b.

la sélection de lymphocytes B spécifiques (reconnaissance simultanée des complexes C3d/antigènes par les récepteurs CR2 et BCR³²) [Male et coll., 2007].

Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont de petites molécules cationiques³³ qui, comme leur nom l'indique, exercent une activité antimicrobienne directe sur un large spectre de microorganismes (bactéries à Gram positif et négatif, champignons, parasites, virus). Dans la peau, les deux principales familles de peptides antimicrobiens sont les **défensines** et les **cathélicidines** [Yamasaki et coll., 2008], mais d'autres peptides possédant une activité antimicrobienne y sont également synthétisés, comme la psoriasine [Gläser et coll., 2005], la dermcidine [Schitteck et coll., 2001], la RNase7 [Harder et coll., 2002] ou encore le lysozyme [Klenha et coll., 1967]. L'unique membre des cathélicidines chez l'homme – LL-37 – est produit par de nombreuses cellules cutanées, incluant les kératinocytes, les polynucléaires neutrophiles et les mastocytes. Les défensines les plus exprimées dans la peau chez l'homme sont les β -défensines³⁴ : les kératinocytes participent notamment à la synthèse de hBD-1³⁵, -2 et -3. Outre leur activité antimicrobienne, les peptides antimicrobiens ont une activité chimiotactique sur une large variété de cellules immunitaires spécialisées³⁶ [Yamasaki et coll., 2008] ; ils stimulent également la migration, la prolifération et la production de cytokines par les kératinocytes (à ce titre, ils contribuent également aux mécanismes de cicatrisation cutanée) [Niyonsaba et coll., 2007]. Les peptides antimicrobiens représentent

³² BCR : *B cell receptor*.

³³ Les peptides antimicrobiens sont riches en acides aminés basiques (arginine et lysine).

³⁴ La distinction entre α -, β - et θ -défensines est liée à la répartition des ponts disulfures qui unissent les feuillets β dont ces molécules sont constituées ; l'homme ne produit pas de θ -défensines.

³⁵ hBD : *human β -defensin*.

³⁶ LL-37 stimule le recrutement des polynucléaires neutrophiles, des monocytes/macrophages et des lymphocytes T ; les β -défensines stimulent le recrutement des polynucléaires neutrophiles, des monocytes/macrophages, des lymphocytes T, des cellules dendritiques, et des mastocytes.

donc d'importants « signaux de dangers », et le concept émergeant d'« **alarmine** » qui leur est attaché [Oppenheim et coll., 2007] résume la diversité de leurs effets sur les réponses immunitaires innée et adaptative.

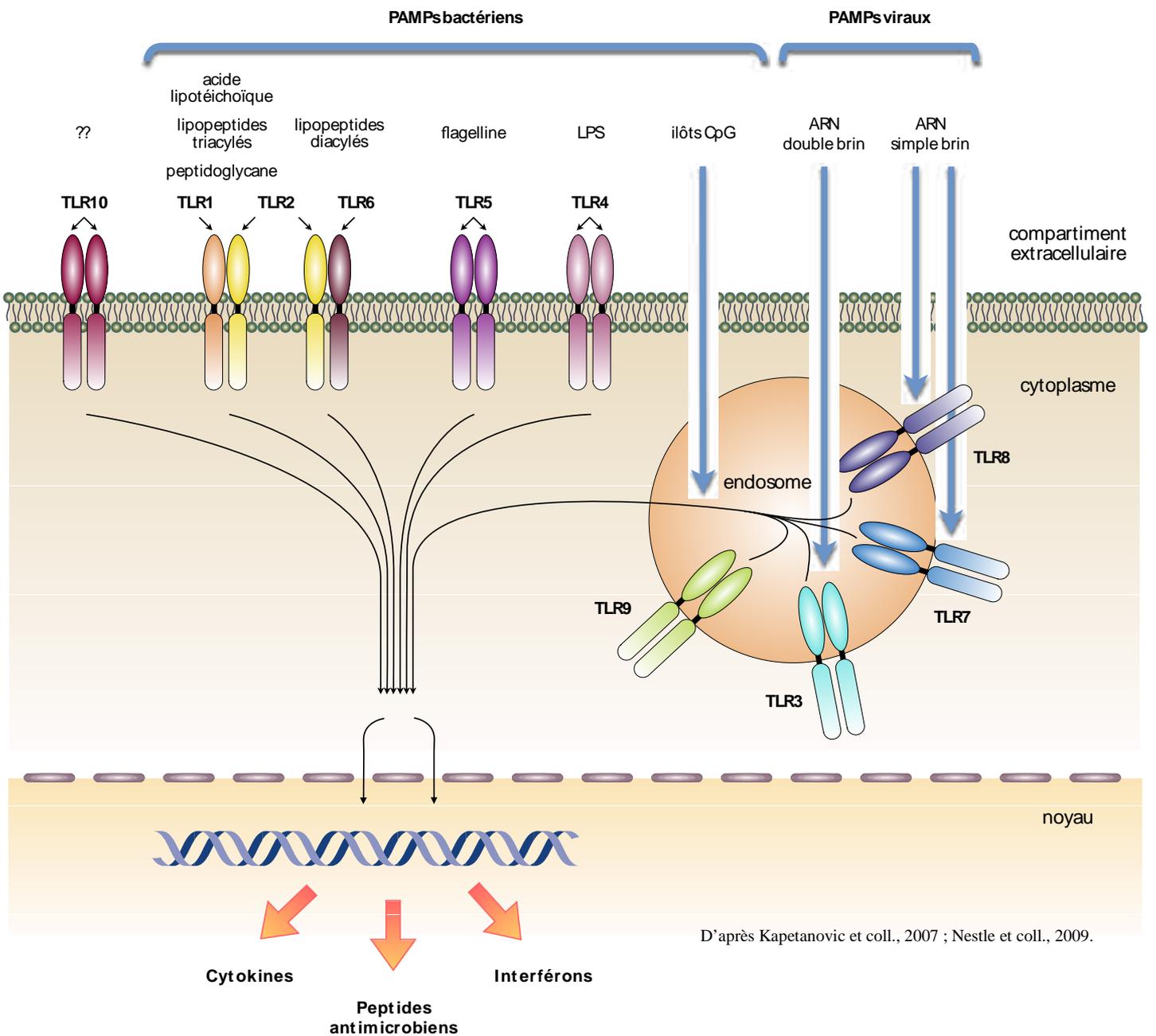
Activation de la composante cellulaire de l'immunité innée

De nombreuses cellules participent à la réponse immunitaire innée cutanée. Les cellules immunitaires spécialisées qui résident dans la peau, ou qui y sont recrutées à la faveur d'un processus inflammatoire, en font bien entendu partie au premier plan : il s'agit des cellules dendritiques (cellules de Langerhans et cellules dendritiques dermiques), des monocytes/macrophages, des polynucléaires neutrophiles, des mastocytes, et des cellules NK³⁷ [Nestle et coll., 2009]. Les fonctions principales de ces cellules sont :

- la phagocytose : elle est assurée par les cellules phagocytaires professionnelles (macrophages et polynucléaires neutrophiles) ;
- la lyse directe des pathogènes ou des cellules les ayant internalisés : elle repose sur la libération dans le milieu extracellulaire du contenu des granules des polynucléaires neutrophiles (lysozyme, hydrolase acide, peptides antimicrobiens) et des cellules NK (perforine et granzymes) [Male et coll., 2007] ;
- l'apprêtement puis la présentation des antigènes aux cellules de l'immunité adaptative par les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques) ;

De plus, les mastocytes [Kumar et coll., 2010] ainsi que les principales cellules résidentes épithéliales (kératinocytes) ou conjonctives (fibroblastes) de la peau participent également à l'initiation et la coordination de la réponse inflammatoire générée lors d'un processus infectieux.

³⁷ NK : *natural killer*.

Figure 8 : Les récepteurs de type Toll

L'activation de ces différents types cellulaires nécessite au préalable la reconnaissance sélective des agents pathogènes par ces cellules. Cette reconnaissance repose sur des récepteurs capables de distinguer les immunostimulants associés aux pathogènes (non-soi) des molécules de l'hôte (soi). Ces immunostimulants sont fréquemment présents sous forme de motifs répétés à la surface des pathogènes, et sont ainsi appelés motifs moléculaires associés aux agents pathogènes – ou **PAMPs**³⁸. Le peptidoglycane et les flagelles bactériens, les ilots dinucléotidiques – cytosine polyguanine (CpG) – non méthylés de l'ADN bactérien et viral, le LPS des bactéries à Gram négatif, ou encore le mannane et la chitine des champignons font partie des PAMPs les mieux caractérisés [Alberts et coll., 2011]. Ces PAMPs sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motif – ou **PRRs**³⁹. Les PRRs incluent la famille emblématique des récepteurs de type Toll⁴⁰ – ou TLRs^{41,42} [Medzhitov et coll., 1997], mais d'autres familles de récepteurs comme les récepteurs intracellulaires de type NOD – ou NLRs⁴³ – et certains récepteurs de type lectine (à l'exemple du récepteur au mannose, DC-SIGN⁴⁴, ou dectine-1 et -2, exprimés notamment par les cellules phagocytaires mononucléées et les cellules dendritiques) sont également impliqués dans la reconnaissance des pathogènes [Kapetanovic et coll., 2007]. À l'heure actuelle, dix TLRs fonctionnels (Figure 8) ont été identifiés chez l'homme [Kawai et coll., 2011]. TLR1, -2, -4, -5, -6, et -10 sont exprimés à la surface des cellules, alors que TLR-3, -7, -8 et -9 sont des récepteurs

³⁸ PAMPs : *pathogen associated molecular patterns*.

³⁹ PRR : *pattern recognition receptors*.

⁴⁰ Chez la drosophile, la protéine Toll, initialement décrite comme un récepteur cellulaire impliqué dans le positionnement embryonnaire de l'axe dorso-ventral, est impliquée dans la défense immunitaire anti-fongique.

⁴¹ TLR : *Toll-like receptor*.

⁴² Les TLRs (homologues de la protéine Toll de drosophile) ont été décrits pour la première fois chez l'homme à la fin des années quatre-vingt-dix.

⁴³ NLR : initialement acronyme de *NOD (Nucleotide Oligomerization Domain)-like receptors*, le terme NLR représente actuellement l'acronyme de *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing molecules*.

⁴⁴ DC-SIGN : *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*.

intracellulaires situés dans la voie endosomale [Blasius et coll., 2010]. Chez l'homme, les TLRs sont très largement exprimés par les cellules immunitaires, mais également par les kératinocytes [Nestle et coll., 2009] et les fibroblastes [Wang et coll., 2011].

La stimulation de ces différents récepteurs active les voies de signalisation intracellulaire (et notamment la voie NF- κ B⁴⁵) qui conduisent à la synthèse de **cytokines** pro-inflammatoires. Les cytokines contribuent à initier, amplifier et coordonner les réponses immunitaires innée et adaptative. Il est impossible ici d'en faire une description détaillée – tant le nombre et la diversité de ces médiateurs solubles sont grands. Les cytokines sont classées dans un certain nombre de catégories, dont les principales sont :

- les interleukines : elles sont produites majoritairement par les leucocytes, mais les kératinocytes et les fibroblastes sont également capables de les synthétiser ;
- les chimiokines⁴⁶ : leur principale fonction (chimiotactisme) est de stimuler la migration et le recrutement cellulaire sur le site d'une réaction inflammatoire ; elles sont produites par les cellules immunitaires spécialisées, mais aussi par les cellules épithéliales et conjonctives ;
- les familles du TNF⁴⁷, du TGF (éléments clés du processus inflammatoire), et les CSF⁴⁸ (qui contrôlent la division et différenciation des cellules d'origine hématopoïétique) ;
- les interférons : les interférons de type I (IFN- α et IFN- β en particulier) sont principalement produits par les cellules infectées par un virus ; l'interféron de type II (IFN- γ) est produit par les lymphocytes T et les cellules NK. Bien connus pour leur rôle dans l'immunité antivirale [Sadler et coll., 2008], les interférons sont également impliqués dans la défense contre les bactéries intra- [Perry et coll., 2005] et extracellulaires [Mancuso et coll., 2009].

⁴⁵ NF- κ B : *nuclear factor κ B*.

⁴⁶ L'espace des deux premières cystéines définit quatre catégories de chimiokines (CC, CXC, C, et CX₃C).

⁴⁷ TNF : *tumor necrosis factor*.

⁴⁸ CSF : *colony stimulating factor*.

2 LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE

La réponse immunitaire adaptative est un système de défense contre les pathogènes, propre aux vertébrés. Contrairement à la réponse immunitaire innée, la réponse immunitaire adaptative se caractérise par sa spécificité à l'égard de l'agent pathogène qui l'induit, et sa capacité à conserver une mémoire immunologique, à même d'assurer plus efficacement et plus rapidement la destruction d'un pathogène « connu » lors d'une réinfection. Néanmoins, la distinction dichotomique (dont l'objectif didactique fait pourtant sens) entre réponse immunitaire innée et adaptative est très réductrice, car les deux systèmes sont interdépendants. L'activation efficace du système immunitaire adaptatif nécessite par exemple qu'il soit préalablement stimulé par le système immunitaire inné, et plusieurs types cellulaires – de même que de nombreux médiateurs solubles – participent aux deux systèmes. Les deux bras armés du système immunitaire adaptatif – la réponse à médiation cellulaire et la réponse de type humorale (médiée par les anticorps) – reposent respectivement sur les lymphocytes de type T et les lymphocytes de type B (ainsi que leur forme mature plasmocytaire). Alors que les lymphocytes B reconnaissent les antigènes associés aux pathogènes dans leur configuration native, les lymphocytes T reconnaissent des fragments antigéniques apprêtés par les cellules présentatrices d'antigènes, en association aux protéines CMH⁴⁹.

Dans la peau, on retrouve les cellules présentatrices d'antigène capables d'initier la réponse adaptative : ce sont les cellules dendritiques dermiques et les cellules de Langerhans dans l'épiderme [Nestle et coll., 2009]. Elles sont l'exemple type des cellules situées à l'interface entre immunité innée et adaptative. Après avoir capté l'antigène, les cellules dendritiques quittent la peau par les vaisseaux lymphatiques pour rejoindre les ganglions lymphatiques locorégionaux correspondants, au sein desquels ils présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs. La stimulation (spécifique de l'antigène présenté) et l'expansion clonale

⁴⁹ CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

des lymphocytes conduisent à la génération d'un grand nombre de lymphocytes effecteurs et de lymphocytes mémoires. Dans l'épiderme, la majorité des lymphocytes T résidents sont des lymphocytes T CD8⁺ mémoires, alors que dans le derme la proportion entre lymphocytes T CD8⁺ et lymphocytes T CD4⁺ (mémoires pour la plupart) est approximativement équivalente [Nestle et coll., 2009]. La plupart de ces lymphocytes expriment le marqueur CLA⁵⁰ dont l'affinité pour la E-sélectine (ou ELAM-1⁵¹) – exprimée plus spécifiquement par les cellules endothéliales d'un site cutané inflammatoire – permet leur adressage spécifique dans la peau [Picker et coll., 1991]. Lors d'un processus inflammatoire cutané, les différentes chimiokines et autres médiateurs solubles chimiotactiques exprimés localement contribuent au recrutement approprié des leucocytes circulants et leur migration depuis le courant circulatoire vers la peau, au niveau du site inflammatoire. Les lymphocytes T auxiliaires (T *helper*), dont la capacité à stimuler la production d'anticorps par les lymphocytes B est essentielle pour l'élimination des pathogènes extracellulaires, sont également présents dans la peau, en particulier lorsqu'une réaction inflammatoire s'y produit. Les Th1, Th2 et Th17 en sont les principaux sous-types [Nestle et coll., 2009] ; cependant, une autre catégorie de lymphocytes T auxiliaires – les Th22 – sécrétant l'IL-22 mais (à la différence des Th17) pas l'IL-17 ni l'IFN- γ , semblent également impliqués dans la réponse immunitaire adaptative cutanée [Eyerich et coll., 2009].

⁵⁰ CLA : *cutaneous lymphocyte-associated antigen*.

⁵¹ ELAM-1 : *endothelial leukocyte adhesion molecule 1*.

II BORRÉLIOSE DE LYME : ASPECTS ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET CLINIQUES

A HISTORIQUE

Les premières descriptions de la maladie de Lyme ont été rapportées en Europe dès la fin du XIX^e siècle. Buchwald en 1883 [Buchwald, 1883], puis Pick en 1894 [Pick, 1894], décrivaient les caractéristiques cliniques de ce qui fut identifié par Herxheimer et Hartmann en 1902 [Herxheimer et coll., 1902] comme l'acrodermatite chronique atrophiante⁵² (ACA). La manifestation clinique cardinale de la maladie de Lyme, l'érythème migrant, a été décrite dès le début du XX^e siècle. Afzelius en 1910 [Afzelius, 1910] décrivait un érythème faisant suite à une piqûre de tique, évoquant déjà ainsi la possibilité d'une maladie infectieuse à transmission vectorielle, puis Lipschütz en 1913 [Lipschütz, 1913] proposa le terme d'« *erythema chronicum migrans* »⁵³. Garin et Bujadoux en 1922 [Garin et coll., 1922] furent les premiers à décrire les manifestations neurologiques de la maladie⁵⁴. Garin et Bujadoux décrivaient alors le cas d'une méningoradiculite survenue chez un patient ayant présenté un érythème migrant. La notion d'une piqûre de tique préalable et d'un test de Bordet-Wassermann⁵⁵ positif chez ce patient en l'absence d'arguments cliniques en faveur d'une syphilis a conduit ces auteurs dès cette époque à évoquer l'hypothèse d'une spirochétose transmise par les tiques. Quelques années plus tard, Bannwarth rapporta la première description de méningite lymphocytaire après piqûre de tique [Bannwarth, 1941]. Parmi les autres manifestations cutanées de la maladie de Lyme, le lymphocytome cutané bénin (dont le

⁵² L'acrodermatite chronique atrophiante est également connue sous le nom de maladie de Pick-Herxheimer.

⁵³ L'érythème migrant (terme à préférer à celui d'érythème chronique migrant) est également connu sous le nom d'érythème de Lipschütz.

⁵⁴ L'atteinte méningoradiculaire de la neuroborréliose précoce est également appelée syndrome de Garin-Bujadoux-Bannwarth.

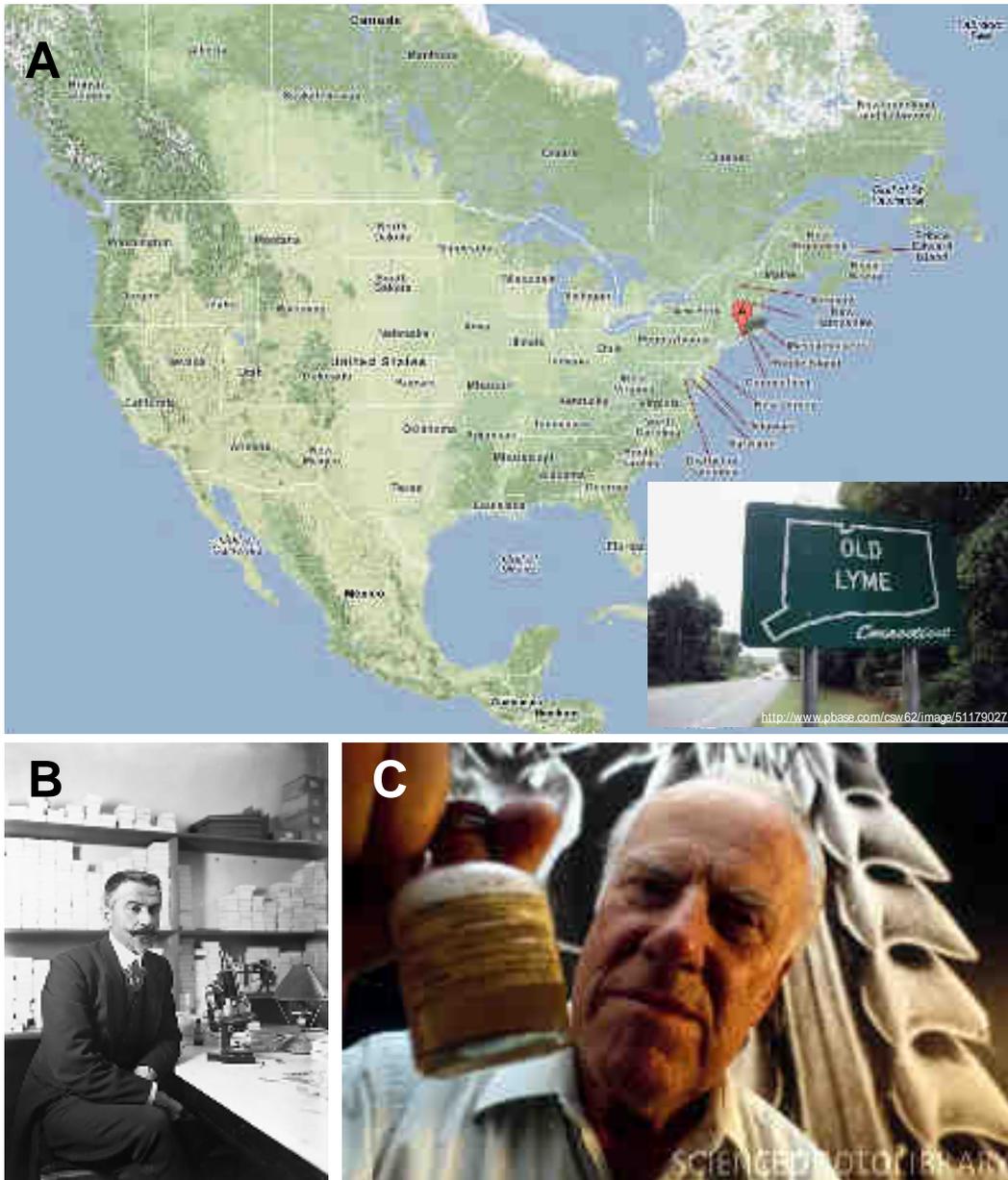
⁵⁵ Le test de Bordet-Wassermann est un test sérologique basé sur la réaction de fixation du complément, utilisé à cette époque pour le diagnostic biologique de la syphilis.

terme fut introduit en 1943 par Bäfverstedt [Bäfverstedt, 1943], et dont l'usage consacré désormais le nom de « lymphocytome borrélien ») fut décrit pour la première fois en 1911 par Burckhardt [Burckhardt, 1911].

Bien que les aspects dermatologiques et neurologiques de la maladie aient été identifiés dès le début du XX^e siècle en Europe, il aura fallu attendre le début des années soixante-dix pour que soit décrite par Scrimenti la première observation clinique de la maladie (un érythème migrant) en Amérique du Nord [Scrimenti, 1970]. Le nom de la maladie de Lyme provient de celui de la commune d'Old Lyme (Connecticut, États-Unis, Figure 9) où, en 1977, les manifestations articulaires de la maladie ont été décrites pour la première fois par Steere [Steere et coll., 1977a]. Steere et ses collaborateurs ont ensuite pu établir un lien entre les manifestations cutanées et articulaires observées avec les autres aspects neurologiques et cardiaques de la maladie [Steere et coll., 1977b]. Les diverses manifestations cliniques de la maladie n'ont été finalement regroupées dans le cadre nosologique de la borréliose de Lyme que dans les années quatre-vingt, après la découverte de l'agent étiologique par Burgdorfer [Burgdorfer et coll., 1982], un spirochète dont l'espèce type, *Borrelia*⁵⁶ *burgdorferi*, porte désormais le nom.

⁵⁶ La dénomination du genre bactérien est un hommage à Amédée Borrel, directeur de l'Institut d'hygiène et de bactériologie de Strasbourg, de 1919 à 1936.

Figure 9 : *Borrelia burgdorferi*, maladie de Lyme – origine des mots



NOTE. (A) Localisation géographique de la commune de Old Lyme, (Connecticut, États-Unis).

(B) Amédée Borrel (<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-00000f-025>)

(C) Willy Burgdorfer (<http://www.sciencephoto.com/image/>)

B ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA BORRÉLIOSE DE LYME

La borréliose de Lyme est la maladie à transmission vectorielle la plus fréquente de l'hémisphère nord. Elle survient en Europe, en Amérique du Nord, en Asie ainsi que dans quelques pays du Maghreb, suivant ainsi la distribution géographique de son vecteur (Figure 19, page 61). En l'absence de systèmes de déclaration obligatoire de la maladie dans la plupart des pays concernés, les chiffres d'incidence rapportés sont à considérer avec précaution : dans une récente revue de la littérature, le nombre annuel moyen de cas était estimé à environ 65 000 en Europe, 16 000 en Amérique du Nord et 3 000 en Asie [Hubalek, 2009]. En Europe, les taux d'incidence présentent d'importantes variations géographiques avec un gradient décroissant d'est en ouest : les plus fortes incidences sont observées en Europe centrale avec plus de 100 cas pour 100 000 habitants en Autriche et en Slovénie [Hubalek, 2009]. En France, l'incidence de la borréliose de Lyme a été estimée à 9,4 cas pour 100 000 habitants⁵⁷ avec également de fortes variations régionales, les incidences les plus élevées étant observées dans le Nord-Est (et en particulier en Alsace) et dans le Limousin [Letrilliart et coll., 2005]. Enfin, aux États-Unis, l'incidence est estimée à environ 6 cas pour 100 000 habitants et par an [Hubalek, 2009].

⁵⁷ Estimation obtenue sur une période d'observation de mai 1999 à avril 2000.

C MANIFESTATIONS CLINIQUES

1 ASPECTS CLINIQUES PRINCIPAUX ET HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE

La maladie de Lyme évolue en deux phases, précoce et tardive. La phase précoce localisée (anciennement phase primaire) correspond à l'apparition d'un érythème migrant qui survient après un délai de quelques jours le plus souvent, et parfois jusqu'à quelques semaines après la piqûre de tique. Sa fréquence est variable en fonction des études, mais se situe environ autour de 70 à 80 % des patients présentant une borréliose de Lyme confirmée [Strle et coll., 2009]. La lésion cutanée évolue généralement sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois avant de régresser spontanément ; l'administration d'un traitement antibiotique adapté permet de réduire la durée globale de son évolution.

De façon parfois presque concomitante, ou plus souvent décalée par rapport à la phase précoce localisée, peut suivre une phase précoce disséminée. Cette phase précoce disséminée (anciennement phase secondaire) correspond à la dissémination du pathogène, par voie sanguine, vers ses organes cibles profonds (système nerveux central et périphérique, articulations, cœur, œil notamment), mais aussi superficiels puisque la peau est l'un des sites de dissémination possible et même privilégié de la bactérie. La dissémination hématogène de la bactérie peut se traduire par des signes généraux à type de syndrome pseudogrippal. Les manifestations cliniques observées à ce stade sont très variées avec une prédominance des formes neurologiques et rhumatologiques ; les atteintes dermatologiques, cardiaques ou ophtalmologiques étant plus rares. L'atteinte neurologique⁵⁸ se manifeste principalement par des méningo-radiculites sensitives, et les localisations crâniennes de la méningo-radiculite sont fréquentes [Oschmann et coll., 1998]⁵⁹. Toutes les paires de nerfs crâniens peuvent être

⁵⁸ On parle à ce stade de neuroborréliose précoce.

⁵⁹ Dans cette étude, l'atteinte des nerfs crâniens concernait 47 % des 330 cas de neuroborréliose étudiés.

potentiellement touchées, mais l'atteinte uni- ou bilatérale du nerf facial est prépondérante [Oschmann et coll., 1998], en particulier chez l'enfant [Christen et coll., 1993]. La borréliose de Lyme représente d'ailleurs en zone d'endémie une des étiologies les plus fréquentes des paralysies faciales de l'enfant [Jenke et coll., 2011]⁶⁰. Des atteintes méningées ou motrices périphériques pures isolées sont possibles, mais plus rares ; il en est de même pour les atteintes encéphalitiques, cérébelleuses ou médullaires, qui surviennent principalement lors de la phase tardive de la maladie [Strle et coll., 2009]. Les manifestations rhumatologiques sont essentiellement des arthrites inflammatoires, mono- ou plus rarement oligoarticulaires, qui concernent principalement les grosses articulations comme le genou [Strle et coll., 2009]. Les manifestations dermatologiques de la phase disséminée précoce sont représentées par l'érythème migrant multiple et par le lymphocytome borrélien (anciennement lymphocytome cutané bénin). Les manifestations cardiaques de la borréliose de Lyme sont principalement en rapport avec des troubles de la conduction à type de bloc auriculo-ventriculaire [Strle et coll., 2009]. L'atteinte oculaire peut concerner toutes les tuniques de l'œil⁶¹ (conjonctive, cornée, corps vitré, rétine) ainsi que le nerf optique [Bodaghi, 2007]. Le spectre clinique des manifestations oculaires associées à la borréliose de Lyme étant particulièrement large et sa fréquence particulièrement faible, leur diagnostic demeure difficile.

Les manifestations tardives de la maladie (anciennement phase tertiaire) peuvent survenir plusieurs mois voire plusieurs années après le début de l'infection ; elles sont de nature cutanée, neurologique ou articulaire et elles évoluent sur un mode chronique. L'atteinte cutanée tardive de la borréliose de Lyme correspond à l'ACA. Le rôle pathogénique de *Borrelia* dans la survenue d'autres dermatoses chroniques comme les morphées, les lichens scléreux ou encore les dermatites granulomateuses interstitielles [Moreno et coll., 2003] a été

⁶⁰ Dans cette étude, les neuroborrélioses représentaient 23,5 % des cas de paralysie faciale (106 enfants inclus).

⁶¹ Dans le cadre d'une neuroborréliose, la symptomatologie oculaire peut aussi être liée à l'atteinte méningoencéphalitique ou à l'atteinte des nerfs crâniens III, IV et VI (oculomoteurs) ainsi que du V et du VII.

évoqué. Les études dont le diagnostic étiologique est basé sur la sérologie sont non seulement contestables par leur méthodologie (la sérologie ne permettant pas à elle seule d'apporter la preuve d'une infection active à *Borrelia*) mais également contradictoires, les unes affirmant [Aberer et coll., 1985; Aberer et coll., 1987b; Aberer et coll., 1987c; Weber et coll., 1988; Aberer et coll., 1991b] et les autres infirmant [Hansen et coll., 1987; Hoesly et coll., 1987; Vaillant et coll., 1992; Akimoto et coll., 1996] l'existence d'un lien entre infection à *Borrelia* et survenue de morphées/lichens scléreux. Par ailleurs, les études basées sur la recherche de la bactérie par PCR dans ces lésions cutanées sont également contradictoires, car même si la plupart d'entre elles excluent ce lien de causalité [Meis et coll., 1993; Ranki et coll., 1994; Dillon et coll., 1995; Fan et coll., 1995; Wienecke et coll., 1995; Weide et coll., 2000; Goodlad et coll., 2002], deux études suggèrent cependant que certaines espèces particulières de *Borrelia* (*B. afzelii* et *B. garinii* notamment) pourraient être responsables de morphées ou de lichens scléreux dans des zones géographiques bien déterminées (Allemagne, Japon) [Schempp et coll., 1993; Fujiwara et coll., 1997]. La controverse sur ce sujet pourrait être liée, en partie au moins, à la confusion des différentes entités nosologiques, très proches sur le plan anatomo-clinique, ainsi qu'à la coexistence, chez un même individu, de ces différentes manifestations cliniques [Aberer et coll., 1987a; Coulson et coll., 1989; Carlesimo et coll., 2010]. Les complications neurologiques⁶² sont essentiellement des encéphalomyélites chroniques et des polyneuropathies sensitives axonales qui surviennent principalement chez des patients atteints d'une ACA, dans les dermatomes concernés par l'atteinte cutanée [Kindstrand et coll., 1997; Oschmann et coll., 1998]. Enfin, les manifestations rhumatologiques tardives sont caractérisées par des arthrites chroniques qui viennent compliquer l'évolution des arthrites de la phase précoce.

⁶² On parle à ce stade de neuroborréliose tardive.

Une présentation complète de la maladie – un érythème migrant après piqûre de tique, suivi de manifestations disséminées neurologiques ou articulaires, et le développement tardif d'une acrodermatite ou de lésions neurologiques ou articulaires chroniques – est relativement rare. Si la description schématique de l'histoire naturelle de la maladie sous forme de phases (primaire localisée, primaire disséminée et tardive) présente un avantage didactique indéniable, elle présente aussi malheureusement l'inconvénient d'une vue trop théorique et parfois décalée par rapport à la réalité des observations rapportées par les praticiens de terrain. Les différentes phases de la maladie peuvent être chevauchantes et la progression de la maladie d'une phase à une autre n'est pas systématique. Même en l'absence de traitement, les manifestations de la phase précoce (localisée ou disséminée) peuvent régresser spontanément sans jamais conduire au développement des manifestations de la phase tardive. Inversement, la phase précoce peut être totalement asymptomatique ou ses manifestations cliniques peuvent passer inaperçues, les manifestations tardives de la maladie survenant alors de façon inaugurale sans qu'aucun élément de la phase précoce de la maladie ait pu être décelé.

Le seul signe clinique permettant d'établir de façon formelle le diagnostic de borréliose de Lyme est la présence d'un érythème migrant typique, qu'on peut à ce titre considérer comme une manifestation pathognomonique de la maladie. Cependant, aux États-Unis, l'existence d'une autre pathologie transmise par les tiques, le STARI⁶³, responsable de lésions cutanées de présentation très similaire à celle de l'érythème migrant, ne permet pas d'être aussi catégorique et doit faire évoquer la possibilité d'un diagnostic différentiel [Strle et coll., 2009]. D'autres manifestations cliniques, comme le lymphocytome cutané bénin et l'ACA, de diagnostic parfois difficile, sont également extrêmement évocatrices d'une borréliose de Lyme. Les autres manifestations cliniques de la maladie ne sont pas spécifiques de la borréliose de Lyme : c'est l'exposition possible à des piqûres de tique en zone d'endémie

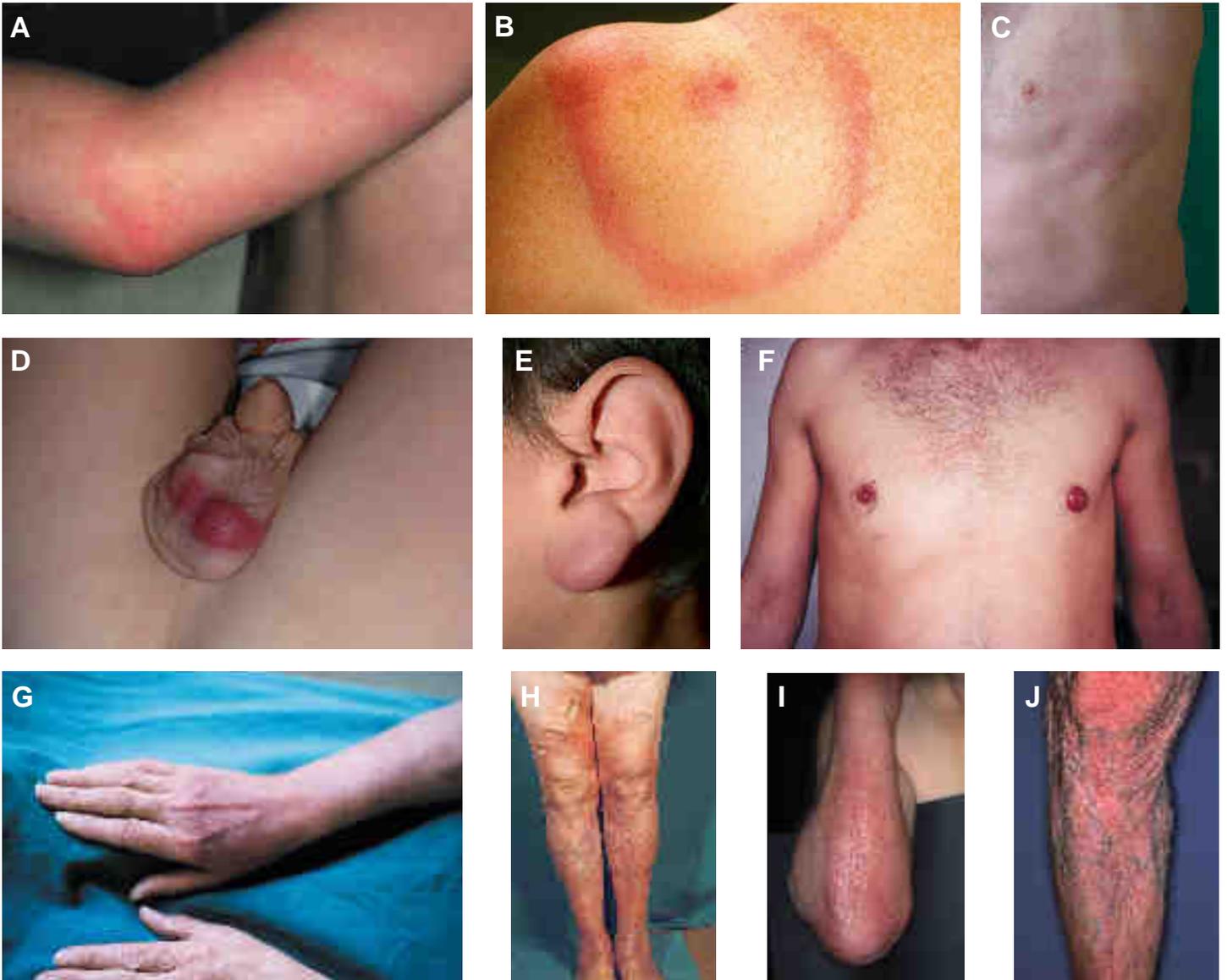
⁶³ STARI : *southern tick-associated rash illness*. Le STARI est dû à *Borrelia lonestari* (espèce génétiquement proche du groupe des *Borrelia* des fièvres récurrentes), transmise par la tique dure *Amblyomma americanum*.

associée à des arguments cliniques et des données biologiques compatibles qui permettent d'évoquer le diagnostic. À l'exception de l'érythème migrant typique, la positivité d'un test biologique est requise pour confirmer le diagnostic de borréliose de Lyme [Schramm et coll., 2009].

L'infection par *Borrelia* est plus souvent symptomatique aux États-Unis (90 % des cas avec séroconversion) qu'en Europe (<50 % des cas) [Strle et coll., 2009] et la présentation clinique de la borréliose de Lyme aux États-Unis et en Europe est différente. Ces différences sont en partie liées à la distribution géographique transatlantique très différente des espèces pathogènes de *Borrelia* et à l'existence d'un organotropisme relatif lié à l'espèce de *Borrelia* en cause [Baranton et coll., 2009]. En Amérique du Nord, la borréliose de Lyme se complique plus souvent d'atteintes articulaires que d'atteintes neurologiques et les manifestations cutanées représentées par le lymphocytome borrélien et l'ACA ne sont que très rarement rapportées [DiCaudo et coll., 1994; Lipsker, 2007; Strle et coll., 2009; Smetanick et coll., 2010]. Si l'on excepte les exceptionnelles identifications de *B. bissettii* chez l'homme, *B. burgdorferi* ss est la seule espèce pathogène présente aux États-Unis [Girard et coll., 2011], et toutes les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme qui y sont observées lui sont entièrement attribuées. À l'inverse, toutes les espèces pathogènes actuellement connues sont présentes en Europe, y compris *B. lusitaniae* [Collares-Pereira et coll., 2004], *B. valaisiana* [Diza et coll., 2004; Saito et coll., 2007] et *B. bissettii* [Rudenko et coll., 2009b], même si les descriptions cliniques sont rares et parfois sujettes à discussion [Baranton et coll., 2009], et quatre d'entre elles sont plus fréquemment observées chez l'homme : *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss. De façon schématique, en Europe *B. burgdorferi* ss est plus souvent associé aux manifestations articulaires de la borréliose de Lyme [Jaulhac et coll., 2000], *B. garinii* et *B. bavariensis* aux manifestations neurologiques [Ruzic-Sabljić et coll., 2001; Fingerle et coll., 2008] et *B. afzelii* aux manifestations cutanées

(lymphocytome et ACA) [Lenormand et coll., 2009; Smetanick et coll., 2010]. Cependant, l'organotropisme attribué aux différentes espèces de *Borrelia* n'est pas exclusif. À titre d'exemple, bien que *B. afzelii* soit l'espèce la plus souvent associée à l'ACA [Ruzic-Sabljić et coll., 2002], trois autres espèces – *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* et *B. valaisiana* – ont également été occasionnellement détectées dans des lésions d'ACA [Rijpkema et coll., 1997; Picken et coll., 1998].

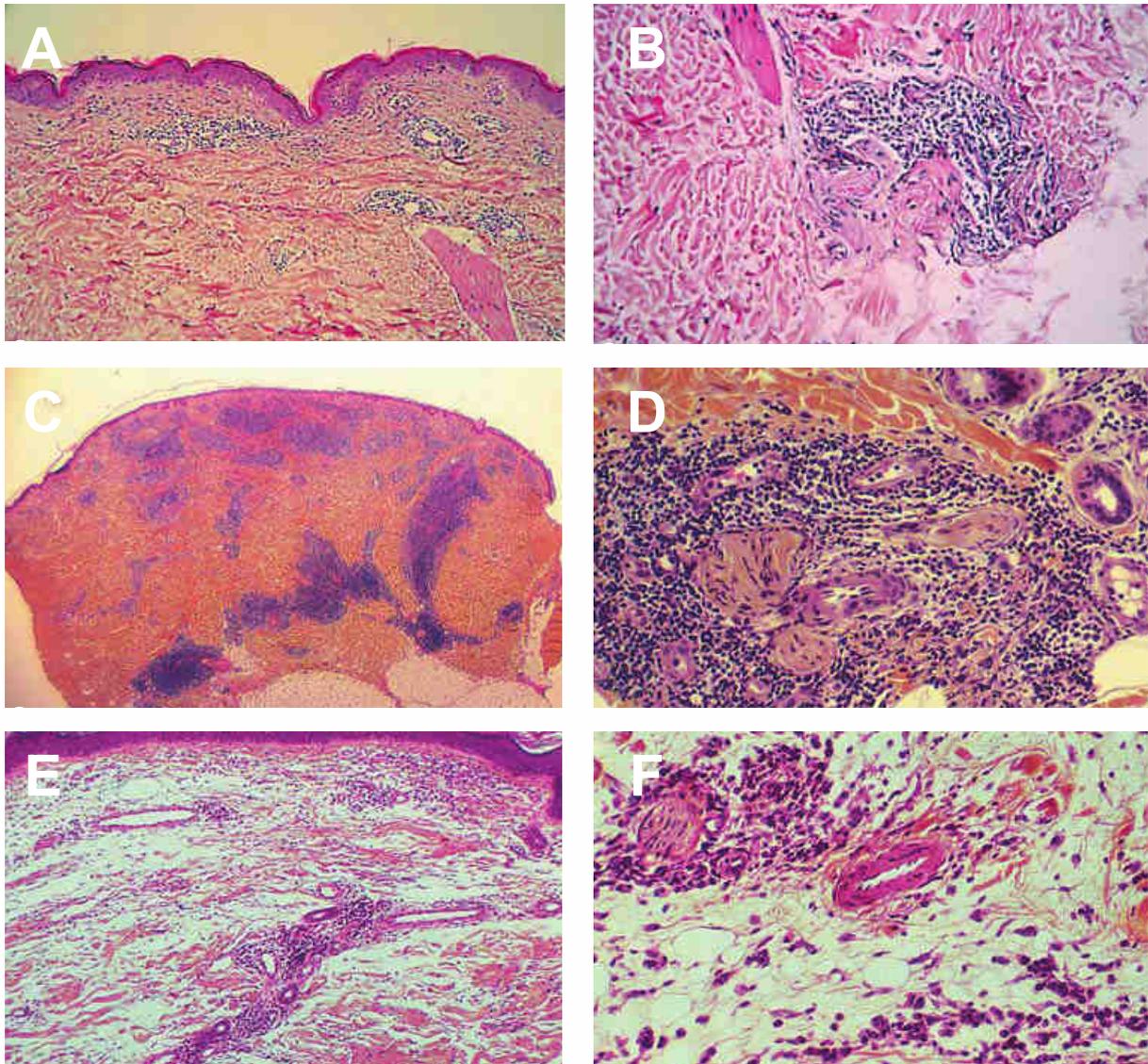
Figure 10 : Manifestations cutanées de la borréliose de Lyme



NOTE. (A, B, C) Érythème migrant. (D, E, F) Lymphocytome borrélien. (G, H, I, J) Acrodermatite chronique atrophiante.

Illustrations : Müllegger et coll., 2008 ; Strle et coll., 2008 (dans Current problems in dermatology – Lipsker D, Jaulhac B, eds ; Karger) ; Stanek et coll., 2003 ; <http://www.zeckenrollen.de/Zeckenschutz/Zecken-und-Krankheiten#>.

Figure 11 : Aspects histologiques des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme



NOTE. (A, B) Érythème migrant. (C, D) Lymphocytome borrélien. (E, F) Acrodermatite chronique atrophiante.

Illustrations : Strle et coll., 2008 (dans Current problems in dermatology – Lipsker D, Jaulhac B, eds ; Karger)

2 MANIFESTATIONS CUTANÉES DE LA BORRÉLIOSE DE LYME

L'érythème migrant

L'érythème migrant est à la fois la plus fréquente des manifestations cliniques de la borréliose de Lyme⁶⁴ et la première à apparaître après le début de l'infection [Berglund et coll., 1995] : c'est la manifestation cardinale de la maladie. L'érythème migrant débute quelques jours à quelques semaines après le début de l'infection par une lésion maculopapuleuse érythémateuse, centrée par le site de la piqûre de tique, qui s'étend progressivement de manière annulaire et centrifuge sur une période de quelques jours à quelques semaines pour former une lésion cutanée qui peut atteindre jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres de diamètres [Müllegger et coll., 2008]. Bien qu'inconstant, un éclaircissement central progressif partiel ou total de la lésion peut survenir et lui donner son aspect annulaire typique à centre clair et à bordure inflammatoire. La bordure active de la lésion représente le front de migration des *Borrelia* dans la peau et la réaction inflammatoire cutanée, mais l'isolement de la bactérie par culture à partir du centre de la lésion [Jurca et coll., 1998] ou en peau « saine » périlésionnelle [Berger et coll., 1992] est possible. La topographie de la lésion est variable puisqu'elle dépend de la localisation de la piqûre de tique : les localisations préférentielles sont les membres inférieurs, les zones de striction des vêtements et les plis chez l'adulte ; la partie supérieure du corps, la face, le cou et les oreilles sont plus fréquemment concernés chez l'enfant [Berglund et coll., 1995]. Même en l'absence de traitement, la lésion est spontanément résolutive, mais la disparition complète de celle-ci peut prendre plusieurs mois alors qu'elle est obtenue en quelques jours après instauration d'une antibiothérapie efficace.

⁶⁴ Dans cette étude suédoise, la survenue de l'érythème migrant concernait 77 % des cas (1 471 patients inclus).

Les lésions multiples d'érythème migrant ont une signification bien différente de l'érythème migrant « unique », puisqu'elles sont la conséquence d'une diffusion hémotogène de la bactérie puis de sa localisation et de sa multiplication dans la peau à distance du site d'inoculation. L'érythème migrant multiple est défini par la présence d'au moins 2 lésions cutanées évocatrices. Ces lésions secondaires sont généralement de taille équivalente, mais sont cependant de plus petite taille que la lésion initiale et sont dépourvues de l'induration centrale correspondant au point de piqûre de la tique [Müllegger et coll., 2008]. L'érythème migrant multiple est plus fréquent chez l'enfant que chez l'adulte et son incidence est plus élevée aux États-Unis qu'en Europe [Berglund et coll., 1995; Gerber et coll., 1996].

L'analyse histologique de biopsies réalisées dans la partie centrale de lésions d'érythème migrant montre un infiltrat interstitiel et périvasculaire du derme à prédominance lymphohistiocytaire, et la présence dans une moindre mesure de plasmocytes, de polynucléaires neutrophiles et de cellules de Langerhans [de Koning, 1993; Hulinska et coll., 1994]. L'aspect histologique de la bordure inflammatoire des lésions et de la peau « saine » périlésionnelle montre également un infiltrat lymphohistiocytaire du derme, essentiellement périvasculaire. L'épiderme est épargné, mais l'infiltration lymphohistiocytaire en regard de la jonction dermo-épidermique en zone centrale de la lésion peut s'accompagner d'une rupture de la membrane basale [de Koning, 1993; Hulinska et coll., 1994]. Les caractéristiques histologiques de l'érythème migrant sont donc peu spécifiques, mais la présence de plasmocytes au sein de l'infiltrat ainsi que son caractère neurotrope et syringotrope permettent d'évoquer une étiologie infectieuse – en particulier borrélienne [Lipsker, 2007].

La production accrue dans les lésions d'érythème migrant de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN- γ [Müllegger et coll., 2000] (stimulant le recrutement et l'activation des macrophages), et des chimiokines CXCL9 et CXCL10 (stimulant le recrutement des lymphocytes T) [Müllegger et coll., 2007] est bien corrélée avec les observations

histologiques montrant la prédominance des lymphocytes et des macrophages activés dans l'infiltrat lésionnel. L'infiltrat lymphocytaire, d'immunophénotype T, associé à l'augmentation du nombre de cellules de Langerhans suggère une participation forte de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans la réponse initiale de l'hôte à l'infection par *Borrelia*.

Le lymphocytome borrélien

Le lymphocytome est l'une des manifestations cutanées disséminées de la borréliose de Lyme. Cette manifestation de la maladie ne concerne presque que les borrélioses de Lyme européennes ; elle est exceptionnelle en Amérique (de rares cas ont été rapportés aux États-Unis [Finkel et coll., 1990; Strle et coll., 2009] ainsi qu'au Mexique [Gordillo-Perez et coll., 2007]). En Europe, le lymphocytome demeure une manifestation relativement rare de la maladie : dans une cohorte suédoise, sa fréquence était respectivement de 2 % et 7 % chez les adultes et les enfants présentant une borréliose de Lyme confirmée⁶⁵ [Berglund et coll., 1995]. L'aspect clinique est celui d'un nodule solitaire, ou plus rarement d'une plaque ferme, de quelques centimètres de diamètre et dont la couleur est variable – rose, rouge, voire bleu violacé. Ses localisations préférentielles sont le lobe de l'oreille (chez l'enfant) et la région aréolo-mamelonnaire (chez l'adulte) [Stanek et coll., 2003], mais le visage, le tronc et le scrotum peuvent également être concernés par cette lésion [Müllegger et coll., 2008].

L'aspect histologique de ces lésions montre un infiltrat dermique dense à prédominance lymphocytaire, structuré en follicules lymphocytaires avec centre germinatif : l'infiltrat est mixte, à prédominance de lymphocytes B⁶⁶, mais comprend également des plasmocytes, des macrophages et des polynucléaires éosinophiles [de Koning, 1993]. La lésion respecte l'épiderme et en est séparée par une bande dermique d'aspect normal. À la différence de

⁶⁵ Confirmation clinique et biologique (sérologique) des cas dans cette étude.

⁶⁶ Le diagnostic différentiel avec un lymphome cutané de type B peut se poser.

l'érythème migrant et de l'ACA où la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10 stimulant le recrutement des lymphocytes T est majoritaire, les lésions cutanées du lymphocytome montrent au contraire une faible expression de CXCL9 et CXCL10 et une forte expression de CXCL13 dont l'activité principale est le recrutement des lymphocytes B et leur organisation au sein des follicules lymphocytaires [Müllegger et coll., 2007].

L'acrodermatite chronique atrophiante

L'acrodermatite chronique atrophiante est la manifestation cutanée de la phase tardive de la borréliose de Lyme. Cette atteinte cutanée n'est que très rarement rencontrée aux États-Unis [DiCaudo et coll., 1994; Smetanick et coll., 2010], elle reste donc l'apanage des borrélioses européennes. Dans une étude suédoise, sa fréquence globale était estimée à 3 % des cas confirmés de borréliose de Lyme [Berglund et coll., 1995]. Par ailleurs, l'ACA concerne un peu plus souvent la femme que l'homme⁶⁷ [Aberer et coll., 1991a; de Koning et coll., 1995; Brehmer-Andersson et coll., 1998] et cette manifestation clinique est très exceptionnellement rencontrée chez l'enfant [Brzonova et coll., 2002; Zalaudek et coll., 2005; Andres et coll., 2010]. Du fait de la très longue durée d'incubation et d'évolution des lésions [Asbrink et coll., 1986; Brehmer-Andersson et coll., 1998], il est très difficile d'établir un lien précis entre la notion d'une piqûre de tique, sa topographie et la survenue d'une ACA. Néanmoins, si la majorité des patients relatent une exposition fréquente à des piqûres de tique, seuls 10 % à 20 % d'entre eux se souviennent avoir présenté un érythème migrant localisé dans le même territoire que l'ACA dans les quelques mois ou années précédents [Asbrink, 1985; Müllegger et coll., 2008]. L'évolution de l'ACA se fait en deux phases. Elle débute par une phase initiale inflammatoire caractérisée par l'apparition de plaques érythémateuses infiltrées, plus ou moins œdémateuses, parfois cyanotiques, et dont la localisation prédomine

⁶⁷ Ratios femme/homme : **1,7** – 19 patients – dans l'étude de Aberer et coll., 1991 ; **2,3** – 23 patients – dans l'étude de de Koenig et coll., 1995 ; **2** – 111 patients – dans l'étude de Brehmer-Andersson et coll., 1998.

sur les faces d'extension des membres, dans leur région acrale et en regard des surfaces articulaires [Müllegger et coll., 2008]. Un traitement antibiotique efficace administré à ce stade peut permettre une régression complète des lésions inflammatoires, mais en l'absence de traitement l'ACA progresse en quelques mois vers une phase atrophique irréversible qui lui confère son nom et son aspect caractéristique [Lipsker, 2007]. En zone lésée, la peau devient plus fine, elle prend un aspect en « papier cigarette » et laisse apparaître par transparence le réseau veineux sous-jacent. Au toucher, la peau est lisse et a perdu son élasticité. Des lésions fibrotiques peuvent se surajouter aux lésions atrophiques, elles prennent alors l'aspect de nodules fibrotiques ou de bandes fibreuses [Marsch et coll., 1993; Brehmer-Andersson et coll., 1998]. Par ailleurs, une allodynie⁶⁸ et l'association d'une ACA avec une polyneuropathie sensitive axonale plus symptomatique dans le territoire de l'ACA sont très fréquentes (environ deux patients sur trois) [Kindstrand et coll., 1997]. Enfin, des troubles ostéo-articulaires à type de luxation ou subluxations des petites articulations et des arthralgies voire des arthrites des grosses articulations situées dans le territoire des lésions cutanées peuvent aussi s'observer [Müllegger et coll., 2008].

À la phase inflammatoire, l'étude histopathologique des lésions montre un infiltrat lymphoplasmocytaire dermique périvasculaire et périannexiel – pouvant s'étendre à l'hypoderme, mais respectant l'épiderme –, des modifications vasculaires à type de télangiectasies⁶⁹, ainsi qu'un certain degré d'œdème [Brehmer-Andersson, 1993]. À ce stade, l'épiderme peut encore être intact ou présenter un léger amincissement. Au stade atrophique, le derme est très aminci et la fibrose dermique est nette. Le nombre des fibres de collagène et des fibres élastiques est très réduit, l'infiltrat cellulaire est beaucoup moins dense, mais constitué d'une plus grande proportion de plasmocytes, et les annexes sont raréfiées [de

⁶⁸ L'allodynie est une douleur ressentie à la suite d'une stimulation non nociceptive.

⁶⁹ La télangiectasie est une dilatation vasculaire anormale par sa taille et par sa permanence.

Koning et coll., 1995; Brehmer-Andersson et coll., 1998]. L'épiderme est lui aussi très atrophique et l'interdigitation dermo-épidermique disparaît au profit d'une ligne basale aplatie. La réponse immunitaire cellulaire de type T observée dans les lésions d'ACA – objectivée par l'infiltrat lymphocytaire, d'immunophénotype majoritaire T, et l'expression par ces lymphocytes de molécules d'activation⁷⁰ – [Buechner et coll., 1993], suggère que les lésions d'ACA résultent d'une réaction immunitaire dirigée contre *Borrelia* [Lipsker, 2007]. Au plan moléculaire, les lésions d'ACA montrent une expression élevée des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IFN- γ , ainsi qu'une expression forte et plus élevée que celle observée dans les lésions d'érythème migrant pour les chimiokines CXCL9 et CXCL10 [Müllegger et coll., 2007].

⁷⁰ LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1).

Figure 12 : Position taxonomique des tiques du genre *Ixodes*

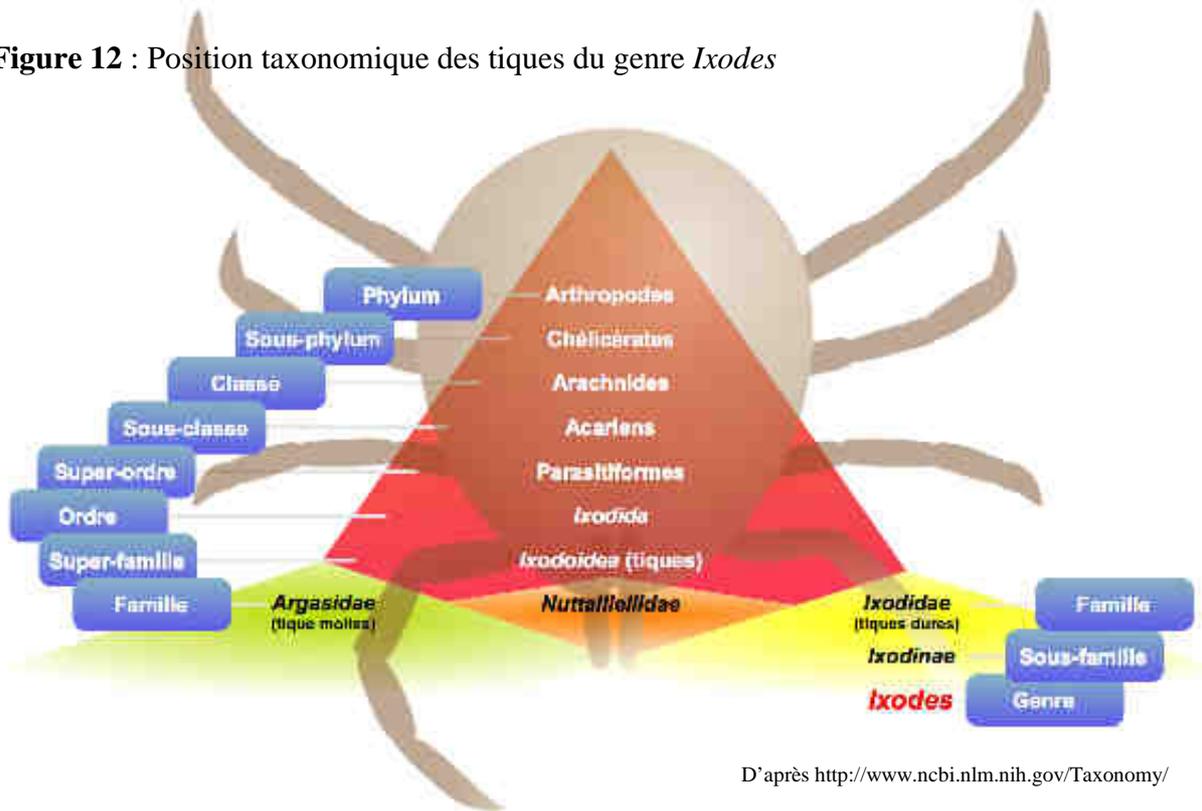
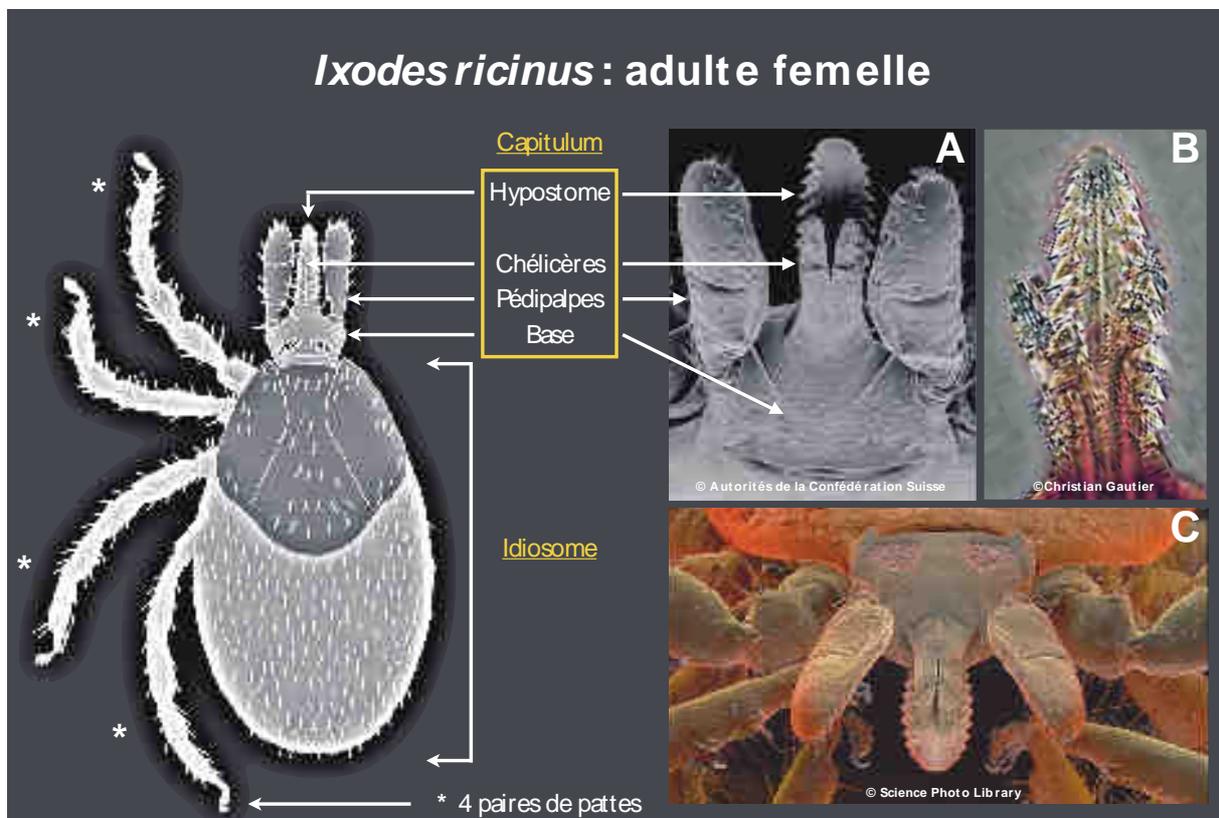


Figure 13 : Principaux éléments anatomiques de la tique et de ses pièces piqueuses



III BORRÉLIOSE DE LYME : LE VECTEUR, LA BACTÉRIE ET SA TRANSMISSION

A BIOLOGIE DES TIQUES

1 GÉNÉRALITÉS

Taxonomie

Les tiques, ou *Ixodoidea*, sont des acariens : ils appartiennent donc sur le plan taxonomique à l'embranchement des arthropodes⁷¹, et à la classe des arachnides (Figure 12). On distingue deux principales familles de tiques, les tiques dures (famille des *Ixodidae*) et les tiques molles (famille des *Argasidae*)⁷². La borréliose de Lyme est une maladie transmise à l'homme par des tiques dures du genre *Ixodes*.

Anatomie

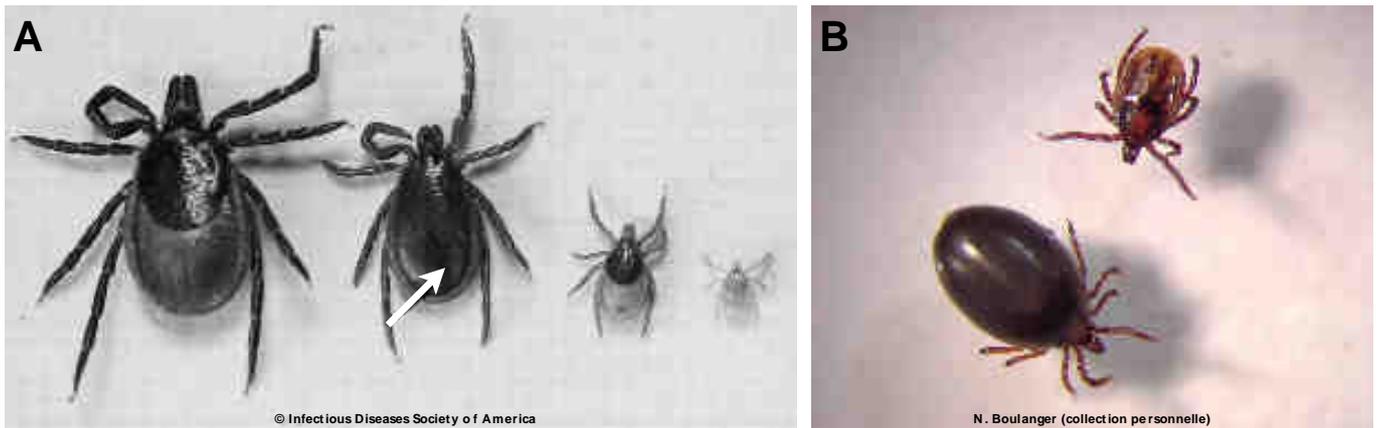
À la différence des insectes dont le corps est segmenté en trois parties (tête, thorax et abdomen), les tiques présentent un corps globuleux non segmenté – l'idiosome –, dont la partie postérieure (équivalent de l'abdomen) est fusionnée avec la partie antérieure (équivalent du thorax), laquelle se détache nettement, chez les tiques du genre *Ixodes*, du capitulum⁷³ (équivalent de la tête) (Figure 13). La base du capitulum porte elle-même trois pièces piqueuses – un hypostome en position ventrale et deux chélicères en position dorsale – ainsi que deux pièces sensorielles – les pédipalpes en position latérale [Pérez-Eid, 2007].

⁷¹ Les arthropodes constituent un embranchement des animaux invertébrés.

⁷² Une troisième famille, les *Nuttalliellidae* est représentée par une seule espèce présente en Afrique du Sud.

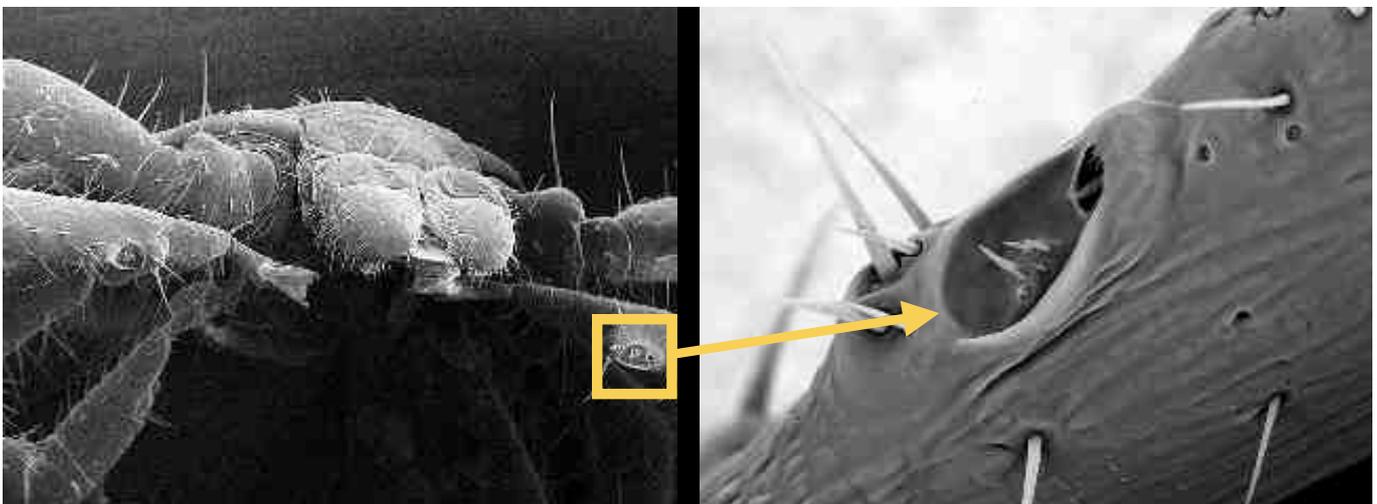
⁷³ Le capitulum est en position antérieure chez les *Ixodidae* et en position ventrale chez les *Argasidae*.

Figure 14 : Stases de développement de la tique *I. ricinus*



NOTE. A : Les quatre stases de développement de la tique *I. ricinus* non gorgée (de la gauche vers la droite) : adulte femelle, adulte mâle, nymphe et larve [Parola et coll., 2001]. La cuticule rigide (flèche) recouvre la totalité de la surface dorsale chez le mâle, mais reste limitée à la partie antérieure du corps chez la femelle. B : Nymphe gorgée (en bas) et non gorgée (en haut) d'*I. ricinus*.

Figure 15 : Organe de Haller



<http://www.flickr.com/photos/28088928@N07/sets/72157605874720396/>

<http://www.flickr.com/photos/28088928@N07/sets/72157605874720396/>

Les tiques du genre *Ixodes* présentent trois stases⁷⁴ de développement : la larve (qui sort de l'œuf⁷⁵), la nymphe et l'adulte (Figure 14-A). La stase larvaire est la seule à ne posséder que trois paires de pattes, les stases nymphales et adultes en possèdent quatre.

La cuticule des *Ixodidae* porte sur sa face dorsale un écusson sclérifié rigide, le reste du tégument est plus lâche et permet la dilatation du corps de la tique lors de la prise du repas sanguin (Figure 14-B). Les organes internes sont composés d'un tube digestif ramifié, de deux glandes salivaires s'abouchant dans le rostre et d'organes sexuels. L'ensemble des organes internes baigne dans un liquide circulatoire, l'hémolymphe. Les structures sensorielles de la tique comprennent les pédipalpes, des soies distribuées sur le tégument, ainsi qu'un complexe sensoriel – l'organe de Haller (Figure 15) – localisé à la partie dorsale du tarse de la première paire de pattes [Parola et coll., 2001] : ces différentes « organes » sensoriels permettent à la tique de repérer ses hôtes cibles.

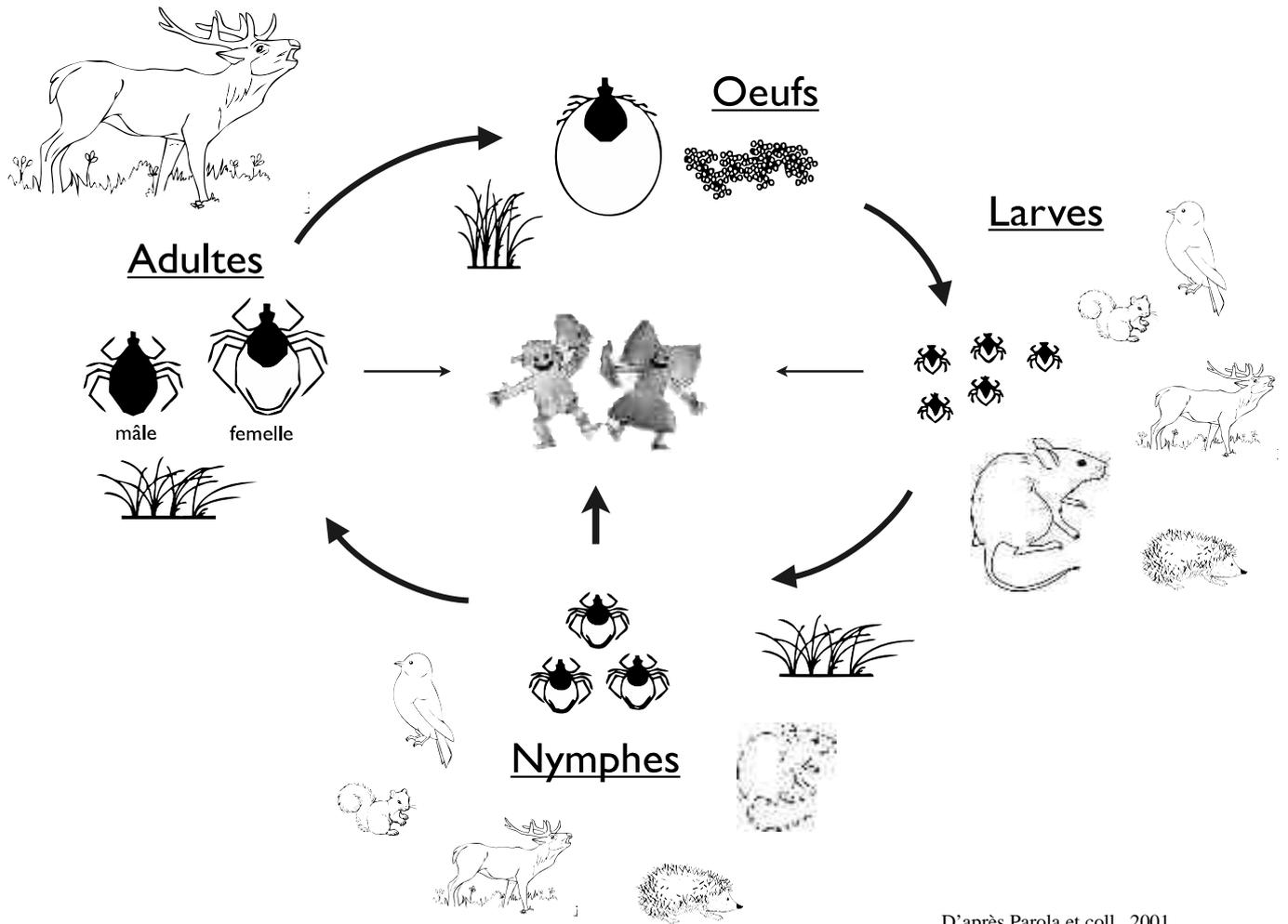
Cycle de développement

À toutes les stases de développement, la tique est un ectoparasite hématophage strict⁷⁶. Le caractère parasitaire n'est que temporaire et correspond pour chaque stase à la prise d'un unique repas sanguin sur un hôte vertébré. Le repas sanguin dure plusieurs jours, mais les *Ixodes* pouvant survivre plusieurs années dans leur biotope, la tique passe donc la plus grande partie de son existence à l'état libre. Les trois phases parasitaires sont séparées entre elles par deux phases à terre où se passent les métamorphoses : le cycle parasitaire est donc triphasique.

⁷⁴ Alors que le « stade » est la forme prise par un acarien après une simple mue de croissance, la « stase » est la forme prise après une métamorphose qui entraîne en plus des modifications de croissance un changement d'aspect. À la différence de certains autres groupes d'acariens, les tiques n'ont qu'un seul stade par stase.

⁷⁵ La femelle pond entre 500 et 2 000 œufs.

⁷⁶ À l'exception de l'adulte mâle qui ne prend que rarement un repas sanguin de faible volume.

Figure 16 : Cycle de développement de la tique

D'après Parola et coll., 2001.

La durée totale du cycle est variable (de 2 à 3 ans en moyenne, et jusqu'à 6 ans), et cette variation dépend principalement des conditions environnementales [Parola et coll., 2001]. La larve et la nymphe n'ont pas de tropisme particulier et peuvent se nourrir sur 300 espèces de vertébrés (oiseaux, mammifères de petite et grande taille, reptiles) [Anderson, 1991] alors que les adultes en revanche ont un tropisme plus marqué pour les animaux de grande taille : le cycle des *Ixodes* est de type télotrope⁷⁷ (Figure 16). Dans le cycle parasitaire de la tique, l'homme n'est qu'un hôte accidentel. La transmission de *Borrelia* à l'homme (voir aussi chapitre « Transmission de *Borrelia* », page 80) peut survenir quelle que soit la stase de développement de la tique – larve, nymphe ou adulte. Néanmoins, la transmission par les larves est d'autant moins probable que le passage vertical transovarien des *Borrelia* chez *I. persulcatus* [Nefedova et coll., 2004], *I. pacificus* [Schoeler et coll., 1993], *I. scapularis* [Magnarelli et coll., 1987] et *I. ricinus* [Bellet-Edimo et coll., 2005] est rare ; la transmission par un adulte mâle est elle aussi très peu probable, car celui-ci ne prend que très exceptionnellement un repas sanguin. Ce sont les nymphes qui sont le plus souvent⁷⁸ responsables de la transmission de la borréliose de Lyme à l'homme [Matuschka et coll., 1992; Nahimana et coll., 2004], car leur dispersion au niveau du biotope colonisé est large, leur densité en zone endémique est élevée – jusqu'à 10 voire 30 fois celle observée pour les adultes [Mermod et coll., 1975] –, et leur petite taille rend leur détection sur la peau beaucoup plus difficile et tardive que pour les adultes femelles.

⁷⁷ Les individus immatures (larves et nymphes) sont ubiquistes et les adultes plutôt spécialistes.

⁷⁸ Dans l'étude de Nahimana et coll., 2004, concernant les régions ouest de la Suisse, le risque relatif de transmission de la borréliose de Lyme après piqûre de nymphe était trois fois plus élevé qu'après piqûre de tique adulte.

Figure 17 : Tique « à l'affût » sur la végétation, en attendant le passage d'un hôte



<http://www.biopix.dk/photo.asp?photoid=35842&photo=ixodes-ricinus> http://photographienature.blogspot.com/2009_06_01_archive.html

Figure 18 : Piqûre de tique



http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ixodes_ricinus_PL.jpg

Figure 19 : Distribution géographique des principales tiques vectrices de la borréliose de Lyme



D'après Gern, 2009 ; Dennis et coll., 1998.

En dehors des périodes de diapause hivernale, les tiques à l'état libre sont en quête d'un hôte vertébré pour la prise du repas sanguin. Les espèces du genre *Ixodes* sont exophiles⁷⁹ : leur « quête » s'effectue au-dessus de la strate herbacée, elles grimpent sur la végétation basse où elles attendent à l'affût le passage d'un l'hôte (Figure 17) qu'elles repèrent avec différents « organes » sensoriels (pédipalpes, organe de Haller, soies ...), sensibles à des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques. Une fois la tique sur l'hôte, celle-ci se déplace sur lui et peut mettre jusqu'à plusieurs heures avant de piquer la peau pour la prise du repas sanguin (Figure 18). Le repas sanguin s'effectue en une phase initiale de gorgement lent, suivie d'une deuxième phase de gorgement rapide durant laquelle l'alternance d'ingestion de sang et de salivation-régurgitation permet de concentrer le repas sanguin ingéré. La durée du repas varie entre 3 et 10 jours en fonction de la stase de développement de la tique. Une fois repue, la tique se laisse tomber sur le sol puis digère son repas sanguin qui va permettre sa métamorphose [Pérez-Eid, 2007]. Lors du repas sanguin, la femelle peut ingérer jusqu'à 150 fois son poids de sang [Capinera, 2008].

Biotope et répartition géographique des espèces vectrices de la borréliose de Lyme

Les tiques sont très sensibles à la dessiccation, on les retrouve essentiellement dans les zones forestières humides. Elles sont exclues des biotopes trop secs comme le pourtour méditerranéen et les zones d'altitude⁸⁰. La nécessité de coloniser des biotopes humides conditionne leur activité saisonnière et leur distribution géographique. *I. ricinus*, vecteur principal de la borréliose de Lyme en Europe, présente une distribution géographique (Figure 19) qui s'étend du nord vers le sud entre les latitudes 65 °N (Islande) et 39 °N (sud de l'Italie), ainsi qu'en Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc) et de l'ouest vers l'est depuis le Portugal jusqu'en Russie [Gern, 2009]. Une autre espèce de tique très répandue en Europe,

⁷⁹ Le cycle de développement, depuis la ponte jusqu'au stade adulte, s'effectue en milieu extérieur ouvert.

⁸⁰ La limite verticale de distribution d'*I. ricinus* est variable en Europe, autour de 1 000 à 1 500 mètres.

I. hexagonus, pourrait aussi transmettre la borréliose de Lyme : la compétence⁸¹ de ce vecteur pour la transmission du pathogène a été démontrée expérimentalement [Gern et coll., 1991], et le hérisson (hôte habituel de *I. hexagonus*), dont le contact avec l'homme est possible en dehors des zones forestières, représente également un réservoir potentiel pour *Borrelia* [Gern et coll., 1997]. *I. persulcatus*, vecteur principal de la borréliose de Lyme en Asie, est présent depuis la partie la plus orientale de l'Europe jusqu'en Chine et au Japon [Parola et coll., 2001]. En Amérique du Nord les deux vecteurs principaux de la borréliose de Lyme sont *I. scapularis*⁸², présent dans le centre et la moitié est des États-Unis ainsi qu'au sud et sud-est du Canada, et *I. pacificus*, principalement présent sur la côte ouest des États-Unis jusqu'en Colombie-Britannique au sud-ouest du Canada [Dennis et coll., 1998; Ogden et coll., 2008].

⁸¹ La compétence représente ici la capacité à être infecté, puis se comporter comme un réservoir pour la bactérie, et à transmettre celle-ci à une tique lors de son repas sanguin.

⁸² *I. scapularis* est la dénomination actuelle de l'espèce anciennement connue sous le nom de *I. dammini*.

Tableau 1 : Protéines anti-hémostatiques et immunomodulatrices de la salive de tique.

| Protéines | Espèces | Cibles | Références |
|---|---|---|--|
| Propriétés anti-hémostatiques | | | |
| IRIS | <i>I. ricinus</i> | facteur X activé, thrombine | Prevot et coll., 2006 |
| IRS-2 | <i>I. ricinus</i> | cathepsine G, thrombine | Chmelar et coll., 2011 |
| Ixolaris | <i>I. scapularis</i> | facteur tissulaire / facteur VII activé | Francischetti et coll., 2002 ; Nazareth et coll., 2006 |
| Penthalaris | <i>I. scapularis</i> | facteur tissulaire / facteur VII activé | Francischetti et coll., 2004 |
| Salp14 | <i>I. scapularis</i> | facteur X activé | Narasimhan et coll., 2002 |
| Prostaglandine E2 | <i>I. scapularis</i> | vasodilatation | Sa-Nunes et coll., 2007 |
| Propriétés immunomodulatrices (sur l'immunité innée) | | | |
| LIRs | <i>I. ricinus</i> | histamine, sérotonine | Beaufays et coll., 2008a |
| LIPERs | <i>I. persulcatus</i> | histamine, sérotonine | Konnai et coll., 2011 |
| métalloenzyme | <i>I. scapularis</i> | bradykinine | Ribeiro et coll., 1986 ; Ribeiro et coll., 1998 |
| Isac | <i>I. scapularis</i> | facteur B et composant C3b du complément | Valenzuela et coll., 2000 |
| Salp20 | <i>I. scapularis</i> | facteur B et composant C3b du complément | Tyson et coll., 2007 |
| Irac-1 / Irac-2 | <i>I. ricinus</i> | analogues structuraux de Isac | Schroeder et coll., 2007 |
| Ixac B1-5 | <i>I. ricinus</i> | analogues structuraux de Isac | Couvreur et coll., 2008 |
| ISL-929 / ISL-1373 | <i>I. scapularis</i> | polynucléaires neutrophiles : inhibition de la production d'O ₂ ⁻ | Guo et coll., 2009 |
| Ir-LBP | <i>I. ricinus</i> | leucotriène B4 | Beaufays et coll., 2008b |
| IRIS | <i>I. ricinus</i> | cytokines pro-inflammatoires | Prevot et coll., 2009 |
| IRS-2 | <i>I. ricinus</i> | sérines protéases leucocytaires (cathepsine G, chymase) | Pejler et coll., 2007; Korkmaz et coll., 2008 ; Chmelar et coll., 2011 |
| Prostaglandine E2 | <i>I. scapularis</i> | cellules dendritiques | Sa-Nunes et coll., 2007 |
| Propriétés immunomodulatrices (sur l'immunité adaptative) | | | |
| Bip | <i>I. ricinus</i> | lymphocytes B | Hannier et coll., 2004 |
| Sialostatine L | <i>I. scapularis</i> | lymphocytes T / cellules dendritiques (cathepsine S) | Kotsyfakis et coll., 2006 ; Sa-Nunes et coll., 2009 |
| Protéine de liaison à l'IL-2 | <i>I. scapularis</i> | macrophages, lymphocytes T | Gillespie et coll., 2001 |
| IRIS | <i>I. ricinus</i> | lymphocytes T | Leboule et coll., 2002 |
| Salp15 | <i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i> | lymphocytes T / cellules dendritiques | Anguita et coll., 2002 ; Garg et coll., 2006 ; Juncadella et coll., 2007 ; Hovius et coll., 2008a |

2 LA SALIVE DE TIQUE

La salive de tique présente de très nombreuses fonctions. La salive joue tout d'abord un rôle important dans la dynamique du repas sanguin, puisque sa sécrétion est nécessaire pour éliminer l'eau contenue dans le sang ingurgité et concentrer ce dernier ; la salive participe également à la constitution d'un ciment autour des pièces piqueuses, favorisant l'ancrage de la tique à la peau ; enfin, la salive véhicule un ensemble complexe de molécules dont les effets anti-hémostatiques, antalgiques/anti-inflammatoires et immunomodulateurs – déjà décrits depuis plus de 25 ans [Ribeiro et coll., 1985] – permettent d'inhiber la réaction de rejet – générée lors d'une effraction cutanée par un corps étranger (ici les pièces piqueuses de la tique, et les sécrétions salivaires injectées) –, autorisant ainsi la poursuite du repas sanguin, dont la durée s'étale sur plusieurs jours. Les fonctions des molécules contenues dans la salive de tique sont redondantes (une même cible pour plusieurs molécules), et de nombreuses molécules de la salive de tique sont multifonctionnelles (une même molécule pour plusieurs cibles). Dans ce chapitre ne seront évoquées que les activités pharmacologiques principales de la salive de tique, et seuls quelques exemples choisis (concernant plus particulièrement les espèces vectrices de la borréliose de Lyme) seront présentés (Tableau 1). Pour une revue détaillée, se référer articles de Francischetti et coll., 2009 et de Hovius et coll., 2008b.

Activité anti-hémostatique

La salive de tique agit sur les trois volets de l'hémostase, que représentent la vasoconstriction, l'agrégation plaquettaire et la coagulation. La salive de tique contient en particulier des protéines de la famille des serpines⁸³, qui jouent un rôle important dans le contrôle des sérines protéases impliquées dans la cascade de la coagulation. Parmi ces

⁸³ Serpin : *serin protease inhibitor*.

protéines, **IRIS**⁸⁴ contribue à l'activité anti-hémostatique de la salive d'*I. ricinus*, en inhibant à la fois l'agrégation plaquettaire et la coagulation : la capacité d'IRIS à inhiber la cascade de la coagulation repose notamment sur l'inhibition de sérines protéases clés, comme la thrombine ou le facteur Xa [Prevot et coll., 2006]. Une autre serpine présente dans la salive d'*I. ricinus*, **IRS-2**⁸⁵ (plus récemment décrite), inhibe l'agrégation plaquettaire induite par deux sérines protéases, la cathepsine G et – à forte dose – la thrombine [Chmelar et coll., 2011]. D'autres molécules de la salive à activité anticoagulante sont maintenant bien caractérisées, en particulier chez *I. scapularis*, comme les protéines **Ixolaris** et **Penthalaris**, inhibant la voie extrinsèque de la coagulation (Ixolaris et Penthalaris inhibent l'activation du facteur X par le complexe facteur tissulaire/facteur VII activé) [Francischetti et coll., 2002; Francischetti et coll., 2004; Nazareth et coll., 2006], ou encore la protéine **Salp14**⁸⁶ inhibant l'activité du facteur Xa (à la convergence des deux voies d'activation de la cascade de la coagulation) [Narasimhan et coll., 2002]. La **prostaglandine E2** (composé lipidique présent dans la salive d'*I. scapularis*) contribue également aux effets anti-hémostatiques de la salive par son action vasodilatatrice [Sa-Nunes et coll., 2007].

Activité anti-inflammatoire de la salive et modulation de la réponse immunitaire innée

L'inflammation cutanée, provoquée par la piqûre de tique, libère un grand nombre de médiateurs. Parmi ces médiateurs, l'histamine (produite par les mastocytes et les polynucléaires basophiles) – entraînant un prurit –, la sérotonine (produite par les plaquettes, les mastocytes ou encore les macrophages) et la bradykinine (dont la production est secondaire à l'activation du facteur XII de la cascade de la coagulation) – entraînant une

⁸⁴ IRIS : *Ixodes ricinus immunosuppressor*.

⁸⁵ IRS-2 : *Ixodes ricinus serpin-2*.

⁸⁶ Salp14 : *salivary protein 14*.

sensation douloureuse⁸⁷ [Julius et coll., 2001] –, ont des effets délétères pour la tique, car la réaction de grattage induite pourrait perturber la prise du repas sanguin, obérant dès lors les chances de son succès. Une famille de protéines contenues dans la salive de tique – les **lipocalines** – (dont plusieurs membres, dénommés **LIRs**⁸⁸ et **LIPERs**⁸⁹, ont été respectivement décrits chez *I. ricinus* [Beaufays et coll., 2008a] et chez *I. persulcatus* [Konnai et coll., 2011]), ont la capacité de séquestrer et d'inhiber l'action de l'histamine et de la sérotonine [Sangamnatdej et coll., 2002]. Par ailleurs, les lipocalines constituent une famille protéique aux multiples fonctions⁹⁰ [Flower, 1996], dont certaines (anti-inflammatoire, antiagrégant plaquettaire, inhibition du complément) ont été caractérisées dans la salive d'espèces variées de tiques dures et de tiques molles [Francischetti et coll., 2009]. La salive d'*I. scapularis* contient également une métallo-enzyme dont l'activité kininasique induit l'hydrolyse de la bradykinine [Ribeiro et coll., 1986; Ribeiro et coll., 1998].

La voie alternative du complément est un des piliers, le plus efficace et le plus précoce, de la réponse immunitaire innée. L'inactivation du complément représente pour la tique un impératif absolu, devant lui permettre d'échapper à la réaction cutanée de rejet, à laquelle s'expose tout corps étranger qui pénètre la peau en profondeur. La corrélation entre la spécificité d'hôte de certaines espèces du genre *Ixodes*⁹¹, et l'aptitude de la salive de ces mêmes espèces à inhiber plus spécifiquement la cascade du complément de leurs hôtes préférentiels, mise en évidence par l'équipe de Nuttall et coll. [Lawrie et coll., 1999], témoigne de l'importance particulière que revêt l'inhibition du complément pour la réussite du repas sanguin, et des capacités développées par les tiques pour s'adapter à leurs hôtes et se

⁸⁷ La sérotonine et la bradykinine activent les terminaisons des fibres nerveuses nociceptives afférentes.

⁸⁸ LIR : *lipocalin from Ixodes ricinus*.

⁸⁹ LIPER : *lipocalin from Ixodes persulcatus*.

⁹⁰ Exemples de fonctions des lipocalines : modulation de la réponse immunitaire, transport de molécules (rétinol, phéromones ...), régulation de l'hémostase.

⁹¹ Les espèces de tique étudiées dans cet article étaient *I. ricinus*, *I. hexagonus*, et *I. uriae*.

prémunir de leurs défenses. Plusieurs protéines de la salive de tique inhibant l'activité du complément sont maintenant bien caractérisées. La protéine **Isac**⁹², isolée de la salive d'*I. scapularis*, empêche (à la manière du facteur H) la formation de la C3 convertase en inhibant le recrutement du facteur B (fB) par le composant C3b, et accélère également la dissociation des complexes C3bB préformés [Valenzuela et coll., 2000]. **Salp20**, une autre protéine salivaire identifiée chez *I. scapularis*, inhibe de façon similaire la C3 convertase, en dissociant la liaison covalente entre fB et C3b [Tyson et coll., 2007]. Par ailleurs, deux analogues structuraux d'Isac ont été identifiés dans la salive d'*I. ricinus*, et respectivement dénommés **Irac-1** et **Irac-2**⁹³ [Daix et coll., 2007] : la coexpression de ces deux protéines confère à la salive d'*I. ricinus* une activité inhibitrice sur la cascade du complément d'une large variété d'hôtes vertébrés, dont l'homme [Schroeder et coll., 2007]. Plus récemment, ont encore été décrites cinq autres protéines de la salive d'*I. ricinus* – **IxAC-B1**⁹⁴, **IxAC-B2**, **IxAC-B3**, **IxAC-B4** et **IxAC-B5** – et dont le mécanisme d'action est similaire à celui des protéines Isac et Irac [Couvreur et coll., 2008]. Enfin, une analyse transcriptomique a également permis d'identifier dans la salive d'*I. pacificus* une séquence nucléotidique analogue à celle du gène codant pour la protéine Isac [Francischetti et coll., 2005b].

Devant la blessure cutanée induite par les pièces piqueuses de la tique, la réussite de la mise en place des réponses immunitaires à médiation cellulaire repose sur la capacité de l'hôte à produire, de façon efficace et coordonnée, les chimiokines et cytokines permettant le recrutement et l'activation des leucocytes sur le site de la piqûre de tique. Les mécanismes de défense élaborés par les tiques incluent la sécrétion salivaire de molécules possédant une activité anticytokinique et antichimiokinique large. Dans une étude de Nutall et coll., l'activité de sept cytokines/chimiokines – IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3),

⁹² Isac : *Ixodes scapularis* salivary anticomplement protein.

⁹³ Irac : *Ixodes ricinus* salivary anticomplement protein.

⁹⁴ IxAC : *Ixodes* anti-complement.

RANTES (CCL5), Eotaxin (CCL11) – était inhibée (à des degrés divers) par la salive des tiques dures (*Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum* et *I. ricinus*) [Hajnicka et coll., 2005]. Des travaux plus récents ont identifié, dans la salive de tique, une nouvelle famille de molécules capables d'inhiber l'activité des chimiokines pro-inflammatoires, dénommées « évasines ». **Evasin-1** (premier membre de cette famille, décrit chez *Rhipicephalus sanguineus*) inhibe de façon sélective les chimiokines CCL3, CCL4 et CCL18 [Frauenschuhr et coll., 2007] ; **Evasin-3**⁹⁵ inhibe l'activité de CXCL1 et CXCL8, et **Evasin-4** inhibe l'activité de CCL5 et CCL11 [Deruaz et coll., 2008].

Les polynucléaires neutrophiles représentent une composante cellulaire importante de la réponse immunitaire innée, à laquelle les tiques sont confrontées : ils infiltrent précocement et massivement le derme lésé par les piqûres piqueuses de la tique [Castelli et coll., 2008]. Les tiques ont développé des mécanismes de protection contre l'activité de ces cellules. La salive d'*I. scapularis* altère certaines fonctions clés des polynucléaires neutrophiles, comme la phagocytose [Ribeiro et coll., 1990] ; la production d'ions superoxydes par les polynucléaires neutrophiles est également altérée par deux protéines salivaires, dénommées **ISL-929** et **ISL-1373** [Guo et coll., 2009]. Une lipocaline de la salive d'*I. ricinus* est également capable d'altérer le recrutement *in vitro* et *in vivo* des polynucléaires neutrophiles, en inhibant le leucotriène B4 (agent chimiotactique de premier plan pour ces cellules) : il s'agit de LIR6, maintenant renommée **Ir-LBP**⁹⁶ [Beaufays et coll., 2008b].

Les cellules NK semblent peu impliquées dans l'immunité développée par l'hôte vertébré contre la piqûre de tique [Wikel, 1999]. Si la salive de certaines espèces de tique (comme *D. reticulatus*) présente la capacité d'inhiber l'activité des cellules NK humaines *in vitro*, la salive d'*I. ricinus* semble au contraire dépourvue d'une telle action [Kubes et coll., 2002].

⁹⁵ La fonction et le ligand de Evasin-2 ne sont pas connus à ce jour.

⁹⁶ Ir-LBP : *Ixodes ricinus* leukotriene B4-binding protein.

Enfin, les molécules IRIS, IRS-2, et la prostaglandine E2, dont l'activité anti-hémostatique a été évoquée plus haut, présentent également une activité immunosuppressive. **IRIS** agit sur la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte, en inhibant à la fois la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, et en modulant l'activité des macrophages et des lymphocytes T [Leboulle et coll., 2002]. L'activité d'IRIS sur les monocytes/macrophages repose en particulier sur sa capacité à inhiber la sécrétion du TNF- α [Prevot et coll., 2009]. **IRS-2** présente quant à elle des propriétés anti-inflammatoires, qui reposent sur sa capacité à inhiber spécifiquement deux sérines protéases leucocytaires – la cathepsine G⁹⁷ et la chymase⁹⁸ [Pejler et coll., 2007; Korkmaz et coll., 2008; Chmelar et coll., 2011]. La **prostaglandine E2** participe quant à elle aux effets immunomodulateurs de la salive en inhibant la maturation des cellules dendritiques [Sa-Nunes et coll., 2007], dont le rôle, à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative, est essentiel. Outre ses effets inhibiteurs sur la maturation des cellules dendritiques, la salive de tique inhibe également leur migration vers les ganglions lymphatiques de drainage cutanés, ainsi que leur capacité à y présenter les antigènes transformés aux lymphocytes T [Skallova et coll., 2008].

Effet sur la réponse immunitaire adaptative

Alors qu'une tique ne doit faire face « qu'aux seuls » mécanismes de la réponse immunitaire innée de l'hôte lors du premier repas sanguin, c'est aux deux types de réponse immunitaire – innée et adaptative – auxquels une tique doit répondre pour éviter la réaction cutanée de rejet lors d'un deuxième repas sanguin. L'acquisition d'une « résistance » aux

⁹⁷ La cathepsine G est une protéase contenue dans les grains azurophiles des polynucléaires neutrophiles, impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire et possédant une activité antimicrobienne et une activité chimiotactique directe sur les leucocytes.

⁹⁸ La chymase est une protéase mastocytaire, impliquée dans l'activation de l'IL-1 β et de l'IL-18, ainsi que dans la dégradation de nombreux substrats comme l'angiotensine I et différents composants de la matrice extracellulaire.

piqûres de tique est un phénomène qui dépend à la fois de l'espèce de tique et de l'hôte concerné par la piqûre : par exemple, s'il est établi que la résistance acquise des cobayes aux piqûres de *Dermacentor andersoni* est liée au développement d'une réponse immunitaire spécifique à médiation cellulaire [Wikel et coll., 1978], le développement d'une immunité adaptative chez la souris ne semble en revanche pas suffisante pour altérer significativement la prise du repas sanguin d'*I. scapularis* ou d'*I. pacificus* [Schoeler et coll., 2000]. Néanmoins, une étude histologique comparée de biopsies cutanées (murines et humaines) a montré que la réponse inflammatoire locale après piqûre unique d'*I. scapularis* (dilatation vasculaire importante, mais infiltration cellulaire très modérée au niveau des pièces piqueuses) est très différente de celle observée après piqûres répétées (faible dilatation vasculaire mais infiltration cellulaire massive par des lymphocytes, des histiocytes, ainsi que des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles) [Krause et coll., 2009] : ces données soulignent l'importance des mécanismes immunitaires adaptatifs dans la réaction cutanée aux piqûres de tique.

Le rôle des anticorps et des lymphocytes B, dans les mécanismes de résistance aux piqûres de tique développés par les hôtes vertébrés n'est pas formellement établi [Francischetti et coll., 2009]. Cependant, la salive de tique d'*I. ricinus* est capable d'inhiber la fonction et les capacités de prolifération de lymphocytes B murins [Hannier et coll., 2003]. La protéine salivaire responsable de cette activité inhibitrice sur les lymphocytes B a été caractérisée, et dénommée **Bip**⁹⁹ ; son mécanisme d'action n'a pas été clairement déterminé, mais il semble intervenir sur la voie de signalisation des TLRs [Hannier et coll., 2004].

L'inhibition des lymphocytes T par des constituants salivaires représente un autre volet des mécanismes de défense des tiques face à la réponse immunitaire adaptative de l'hôte.

⁹⁹ Bip : *B-cell inhibitory protein*.

L'équipe de Ribeiro et coll. a montré qu'une cystatine¹⁰⁰ sécrétée dans la salive d'*I. scapularis* – la **sialostatine L**¹⁰¹ – inhibe la prolifération de lymphocytes T cytotoxiques murins *in vitro*, et présente également une activité anti-inflammatoire *in vivo* [Kotsyfakis et coll., 2006]. Les effets inhibiteurs de la salive de tique sur la capacité des cellules dendritiques à présenter les antigènes aux lymphocytes T est connue [Sa-Nunes et coll., 2007; Skallova et coll., 2008], et la sialostatine L participe au défaut d'activation lymphocytaire T, secondaire à l'altération de la présentation antigénique par les cellules dendritiques : celui-ci est lié à un défaut de clivage des antigènes à présenter, induit *in vivo* par l'inhibition directe de la sialostatine L sur la cathepsine S [Sa-Nunes et coll., 2009]. Par ailleurs la salive d'*I. scapularis* contient une autre cystatine, la **sialostatine L2**, dont le rôle essentiel pour la réussite du repas sanguin a été démontré par ARN interférence [Kotsyfakis et coll., 2007]. Une **protéine de liaison à l'IL-2**, capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T humains *in vitro*, a également été mise en évidence dans la salive d'*I. scapularis* [Gillespie et coll., 2001]. Enfin, l'action de la protéine **IRIS** sur les lymphocytes T, déjà évoquée plus haut, repose en particulier sur l'inhibition de la prolifération et de la capacité des lymphocytes T murins à produire de l'IFN- γ [Leboulle et coll., 2002].

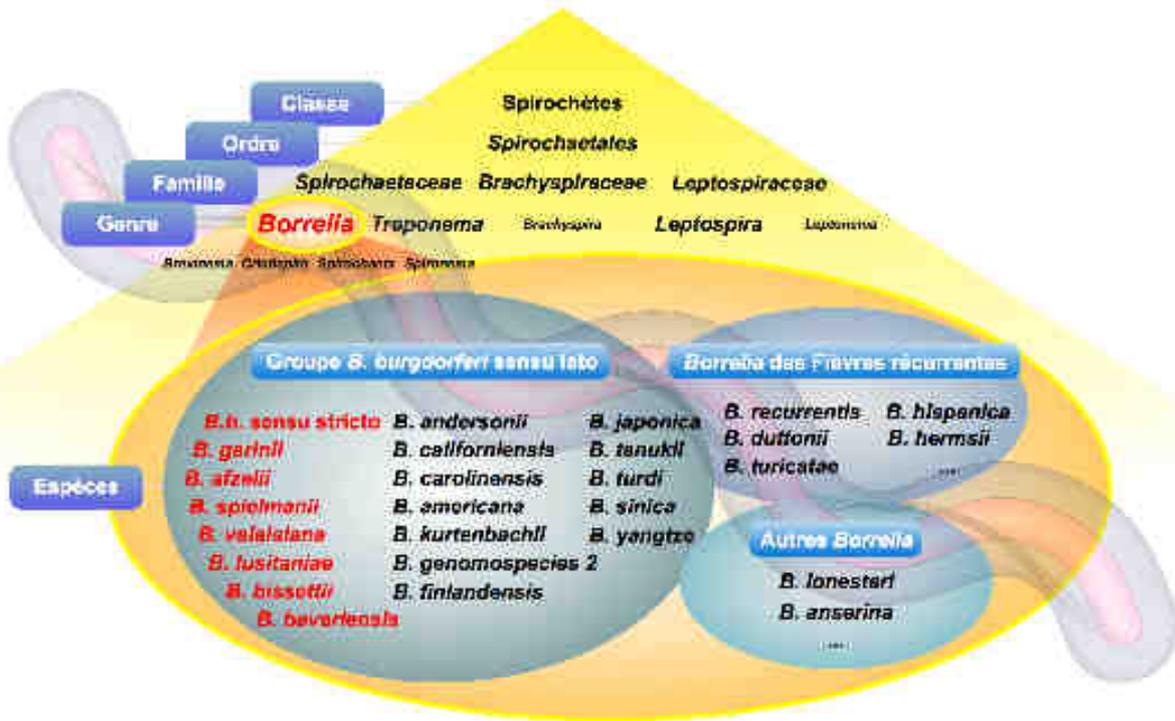
Parmi les nombreuses protéines de la salive de tique, **Salp15** (initialement décrite chez *I. scapularis* [Das et coll., 2001]) est de loin la protéine la plus étudiée, car c'est probablement la protéine salivaire qui contribue le plus aux mécanismes d'échappement de *Borrelia* à la réponse immunitaire cutanée de l'hôte, lors de la phase initiale de l'infection (voir chapitre « Contribution de la salive de tique aux mécanismes d'échappement de *Borrelia* », page 108). La protéine Salp15 agit en particulier sur la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. L'interaction de Salp15 avec le co-récepteur CD4 inhibe l'activation des lymphocytes T CD4⁺

¹⁰⁰ Les cystatines sont une famille protéique dont la fonction métabolique principale est l'inhibition des cystéine-protéases (comme les cathepsines ou les caspases).

¹⁰¹ Cet inhibiteur présente, *in vitro*, une forte affinité pour la cathepsine L, d'où son nom.

[Anguita et coll., 2002; Garg et coll., 2006; Juncadella et coll., 2007], et l'interaction de Salp15 avec le récepteur DC-SIGN inhibe à la fois la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques [Hovius et coll., 2008a].

Figure 20 : Position taxonomique des bactéries du genre *Borrelia*



NOTE. Les espèces en caractère rouge sont celles pour lesquelles des cas d'infection humaine ont été rapportés.

D'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>.

B BIOLOGIE DES *BORRELIA*

Taxonomie et répartition géographique

La borréliose de Lyme est due à des spirochètes (bactéries spiralées) appartenant à l'ordre des *Spirochaetales*, à la famille des *Spirochaetaceae* et au genre *Borrelia* (Figure 20) [Paster et coll., 2000]. Outre le genre *Borrelia*, les spirochètes comptent trois autres genres bactériens d'intérêt médical : *Treponema*, *Leptospira* et *Brachyspira*. Le genre *Treponema* comprend l'espèce *Treponema pallidum* – agent de la syphilis –, ainsi que les espèces responsables des tréponématoses non vénériennes ; le genre *Leptospira* comprend plusieurs espèces de leptospires responsables de la leptospirose ; le genre *Brachyspira* comprend différentes espèces responsables de spirochètoses intestinales, mais leur caractère pathogène est controversé [Tsinganou et coll., 2010].

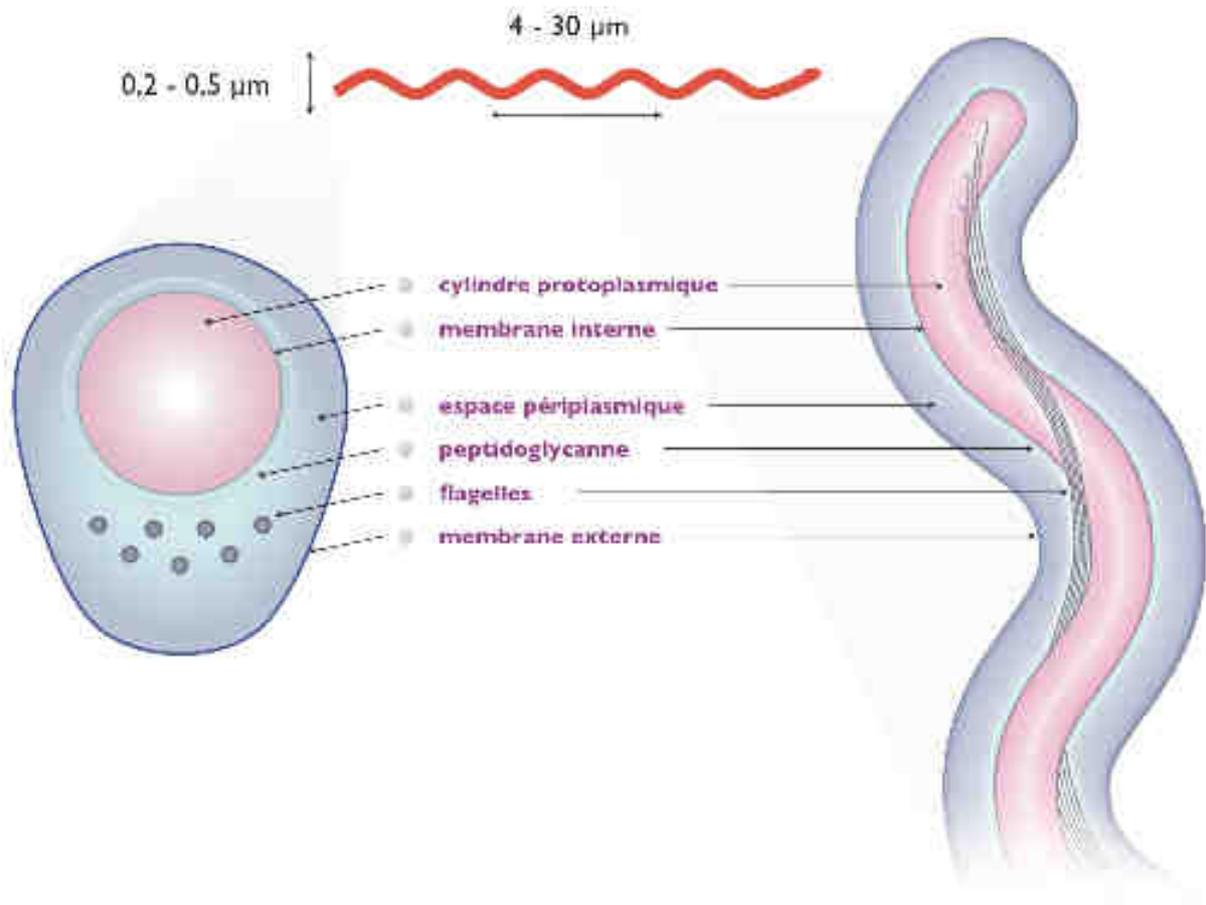
Le genre *Borrelia* comprend quant à lui les espèces bactériennes responsables des fièvres récurrentes ainsi que l'ensemble des espèces responsables ou apparentées phylogénétiquement aux agents de la borréliose de Lyme. Ces dernières sont regroupées dans le complexe *B. burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sl). À ce jour, le complexe *B. burgdorferi* sl compte 19 espèces¹⁰² et un genomospecies¹⁰³ décrits. Huit d'entre elles sont impliquées en pathologie humaine : *B. burgdorferi* sensu stricto [Burgdorfer et coll., 1982; Johnson et coll., 1984], *B. garinii* [Baranton et coll., 1992], *B. afzelii* [Canica et coll., 1993], *B. spielmanii* [Richter et coll., 2004], *B. valaisiana* [Wang et coll., 1997], *B. lusitaniae* [Le Fleche et coll., 1997], *B. bavariensis* [Margos et coll., 2009] et *B. bissettii* [Postic et coll.,

¹⁰² Toutes ces espèces ne sont pas encore formellement validées, cinq espèces sont proposées mais pas encore confirmées : *B. americana*, *B. bavariensis*, *B. kurtenbachii*, *B. yangtze* et *B. finlandensis*.

¹⁰³ *Borrelia* genomospecies 1 (depuis renommée *Borrelia americana*) et *Borrelia* genomospecies 2 n'avaient pas été proposées initialement comme des espèces à part entière en raison de données insuffisantes et d'un nombre d'isolats trop restreint.

1998]. En Europe, toutes les espèces pathogènes sont présentes, mais trois d'entre elles sont plus fréquentes : *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss, avec une plus grande prévalence de *B. garinii* et *B. afzelii*. À l'inverse, en Amérique du Nord, *B. burgdorferi* ss est la seule espèce pathogène pour l'homme présente (en exceptant les exceptionnelles descriptions de cas humains liés à *B. bissettii* [Girard et coll., 2011]). Les autres espèces du groupe *B. burgdorferi* sl, majoritairement décrites aux États-Unis (*B. californiensis* [Postic et coll., 2007], *B. carolinensis* [Rudenko et coll., 2011], *B. americana* [Rudenko et coll., 2009a], *B. andersonii* [Marconi et coll., 1995], *B. kurtenbachii* [Margos et coll., 2010], et *Borrelia* genomospecies 2 [Postic et coll., 2007]), en Asie (*B. japonica* [Kawabata et coll., 1993], *B. turdi* [Fukunaga et coll., 1996], *B. tanukii* [Fukunaga et coll., 1996], *B. sinica* [Masuzawa et coll., 2001], et *B. yangtze* [Chu et coll., 2008]) ou en Europe (*B. finlandensis* [Casjens et coll., 2011]) n'ont pas été identifiées à ce jour chez l'homme et sont donc considérées comme des espèces non pathogènes [Baranton et coll., 2009].

Figure 21 : Structure des bactéries du genre *Borrelia*



D'après Guerau-de-Arellano et coll., 2005 ; Rosa et coll. 2005.

Structure et organisation génomique de la bactérie

Comme les autres spirochètes d'intérêt médical, les bactéries du genre *Borrelia* sont facilement reconnaissables en microscopie optique à fond noir par leur morphologie hélicoïdale et leur mobilité caractéristique. D'une longueur de 4 à 30 µm et d'un diamètre de 0,2 à 0,5 µm, les bactéries du genre *Borrelia* se caractérisent par une ultrastructure particulière (Figure 21) qui se compose, de l'intérieur vers l'extérieur, par [Barbour et coll., 1986] :

- le cylindre protoplasmique, correspondant au corps cellulaire délimité par la membrane cytoplasmique et un peptidoglycane¹⁰⁴ très mince [Rosa et coll., 2005] ;
- l'espace périplasmique, contenu entre la membrane externe et le cylindre protoplasmique, renfermant 7 à 30 endoflagelles (associés à une protéine, la flagelline) insérés aux extrémités du cylindre protoplasmique et dont l'enroulement autour de ce dernier confère à la bactérie à la fois sa mobilité caractéristique (associant des mouvements de rotation, de torsion et de compression) et sa forme spiralée [Motaleb et coll., 2000] ;
- la membrane externe, de structure trilamellaire, où sont enchâssés plus d'une centaine de polypeptides et de lipoprotéines [Fraser et coll., 1997].

La structure de la paroi des *Borrelia* présente des similitudes avec la paroi des bactéries à Gram négatif, mais celle-ci ne prend pas la coloration de Gram. Une différence importante avec de nombreuses autres bactéries à Gram négatif est l'absence de LPS [Takayama et coll., 1987] impliqué dans la physiopathologie du sepsis. En revanche, elle comprend de très nombreuses protéines de surface (comme les protéines Osp¹⁰⁵ dont il existe 6 membres connus – OspA à OspF [Norris et coll., 1992; Lam et coll., 1994] – ou encore les protéines

¹⁰⁴ La synthèse de ce peptidoglycane est la cible des β-lactamines, classe antibiotique majeure du traitement de la borréliose de Lyme.

¹⁰⁵ Osp : *Outer surface protein*.

VlsE¹⁰⁶), dont la diversité et la variabilité d'expression témoignent des importantes capacités d'adaptation de la bactérie à des hôtes et environnements différents. Ces protéines de surface jouent également un rôle essentiel dans la transmission, la dissémination et l'échappement de *Borrelia* au système immunitaire de l'hôte.

Le génome de *B. burgdorferi* est de petite taille (environ 1,5 Mb). Il est segmenté, composé d'un chromosome linéaire de petite taille (environ 900 kb) et de très nombreux plasmides linéaires et circulaires (d'une taille de 5 à 56 kb), dont la somme représente près de 40 % du génome. Le chromosome présente un faible taux de guanine et de cytosine, avec un contenu en G+C moyen de 28,6 % [Fraser et coll., 1997] distinguant *Borrelia* des genres *Leptospira* (G+C \approx 35 %) et *Treponema* (G+C \approx 53 %) [Hyde et coll., 1984]. Le matériel génétique de *B. burgdorferi* est inhabituel : cette bactérie présente en effet la double singularité de posséder à la fois un chromosome et des plasmides linéaires – alors que la plupart des bactéries ont un chromosome circulaire et ne possèdent pas de plasmides linéaires – et d'être au sein du règne bactérien l'espèce qui compte le plus grand nombre de plasmides connue [Fraser et coll., 1997; Casjens et coll., 2000]. À titre d'exemple, la souche B31 de *B. burgdorferi* ss compte au total 21 plasmides¹⁰⁷, dont 9 circulaires et 12 linéaires [Stewart et coll., 2005].

¹⁰⁶ VlsE : VMP (*vesicular membrane protein*)-*like sequence* E.

¹⁰⁷ On peut même imaginer que la souche native comptait plus que les 21 plasmides décrits, certains plasmides ayant pu être perdus lors de la culture *in vitro* de la souche étudiée.

C TRANSMISSION DE *BORRELIA*

Chez la tique à jeun, c'est à dire avant le début du repas sanguin, *Borrelia* est localisée dans l'intestin de la tique. Cependant, il est maintenant bien établi que la transmission de *Borrelia* à l'hôte vertébré ne se fait pas par régurgitation passive du contenu intestinal, mais fait suite au contraire à une migration active des spirochètes qui franchissent successivement la barrière constituée par l'épithélium intestinal pour disséminer dans l'hémolymphe, puis la paroi des glandes salivaires avant d'être injectés avec la salive de tique dans la peau [Dunham-Ems et coll., 2009]. Lorsque la tique infectée par *Borrelia* débute son repas sanguin, l'environnement physiologique initial dans lequel se trouvent les spirochètes est considérablement transformé : sa composition, mais aussi ses constantes physiques de température et de pH sont modifiées¹⁰⁸ [Yang et coll., 2000], d'abord par la transsudation de liquide interstitiel dans l'intestin de la tique, puis par l'irruption soudaine des facteurs solubles plasmatiques et des éléments figurés du sang ingéré. Aux changements environnementaux majeurs auxquels *Borrelia* doit faire face lors du gorgement de la tique, la bactérie répond par une modification tout aussi majeure de sa dynamique de croissance et de l'expression de ses protéines de surface majoritaires.

¹⁰⁸ L'afflux de sang dans l'intestin de la tique induit une augmentation de température et une diminution du pH.

1 DYNAMIQUE DE LA TRANSMISSION

Évolution topographique et dynamique de *Borrelia* chez le vecteur

Le gorgement de la tique induit une multiplication rapide des *Borrelia* : plusieurs études réalisées *in vivo* chez la tique montrent une augmentation très importante du nombre de *Borrelia* dans l'intestin de celle-ci, passant de la centaine de bactéries avant la prise du repas sanguin à la dizaine, voire la centaine de milliers d'organismes 72 heures après [de Silva et coll., 1995; Piesman et coll., 2001]. La multiplication bactérienne exponentielle et la très forte population de *Borrelia* au niveau intestinal [de Silva et coll., 1995] contrastent avec le très faible nombre de *Borrelia* qui disséminent dans l'hémolymphe après avoir franchi la barrière intestinale, puis pénètrent dans les glandes salivaires [Piesman et coll., 2001; Dunham-Ems et coll., 2009]. Ainsi, l'infection de l'hôte vertébré repose sur la transmission d'un inoculum bactérien très faible, mais composé de bactéries virulentes [Ohnishi et coll., 2001; Lima et coll., 2005]. La migration de *Borrelia* dans la tique est biphasique : à la phase initiale d'adhérence aux parois latérales des cellules épithéliales intestinales, pendant laquelle les spirochètes – alors immobiles – migrent vers la profondeur de l'épithélium digestif, succède une phase de migration « active » permettant aux spirochètes devenus mobiles de franchir la membrane basale, puis de pénétrer dans les glandes salivaires *via* l'hémolymphe [Dunham-Ems et coll., 2009]. Le délai au bout duquel les premiers spirochètes sont observables dans les glandes salivaires de la tique, une fois le repas sanguin débuté, reflète le temps nécessaire à la migration des *Borrelia* depuis l'intestin jusqu'à l'invasion des glandes salivaires : ce délai moyen (36 à 72 heures) [Ohnishi et coll., 2001; Dunham-Ems et coll., 2009], est concordant avec les délais moyens de transmission – observés ou estimés – chez l'homme et l'animal.

Délai de transmission du vecteur à l'hôte

La transmission de *Borrelia* à l'homme ne survient effectivement pas au tout début du repas sanguin. Le risque théorique de transmission existe dès les premières heures qui suivent l'attachement de la tique, mais l'expérience clinique montre que le risque est faible durant les 24 premières heures et il est également clairement établi que ce risque augmente avec la durée d'attachement de la tique¹⁰⁹. Les données expérimentales obtenues chez l'animal montrent une transmission possible de *Borrelia* par la tique *I. scapularis* dès 24 heures après le début du repas sanguin avec une efficacité maximale de transmission à 72 heures [Piesman et coll., 1987; Hojgaard et coll., 2008]. Une transmission encore plus précoce de *Borrelia* à l'animal par la tique *I. ricinus* a été décrite dès 17 heures après l'attachement de la tique avec une efficacité maximale de transmission à 47 heures [Kahl et coll., 1998]. Sur le modèle européen, la dynamique de transmission semble également être influencée par la nature du couple *Borrelia/Ixodes* : *I. ricinus* est en effet capable de transmettre *B. afzelii* plus précocement et plus efficacement que *B. burgdorferi* ss [Crippa et coll., 2002].

¹⁰⁹ Les recommandations en matière de prévention de la borréliose de Lyme insistent sur la nécessité de retirer une tique fixée à la peau le plus rapidement possible afin de limiter le risque d'infection.

2 BASES MOLÉCULAIRES DE LA TRANSMISSION

Situation avant la prise du repas sanguin

Dans le vecteur – la tique du genre *Ixodes* –, et avant que celle-ci ne puisse prendre un repas sanguin chez un nouvel hôte vertébré, les spirochètes se développent dans l'intestin de la tique au contact de la muqueuse intestinale. Dans cet environnement, *Borrelia* y exprime de façon prédominante les protéines de surface OspA et OspB, alors que l'expression de la protéine de surface OspC reste indétectable [Schwan et coll., 1995; Schwan et coll., 2000]. Les gènes *ospA* et *ospB* sont localisés sur le plasmide linéaire de 54 kb (lp54) et organisés dans un seul et unique opéron sous le contrôle du même promoteur [Bergstrom et coll., 1989]. Les protéines OspA et OspB jouent un rôle essentiel pour la colonisation et la survie de *Borrelia* dans l'intestin de la tique [Yang et coll., 2004]. OspA interagit notamment de façon spécifique avec une protéine de la tique, TROSPA¹¹⁰, située à la surface des cellules épithéliales intestinales et plus particulièrement exprimée au niveau des jonctions serrées qui unissent ces dernières [Pal et coll., 2004a]. L'interaction d'OspA avec son récepteur TROSPA permet non seulement l'adhésion de *Borrelia* à la surface de l'épithélium intestinal de la tique, mais aussi la persistance de la bactérie dans l'environnement physiologique hostile que constituent la lumière intestinale et son contenu [Fikrig et coll., 2006]. L'importance de cette protéine de surface pour le cycle de *Borrelia* chez la tique est soulignée par les expériences qui montrent que des mutants *ospA*- sont incapables de coloniser efficacement la tique, mais gardent leur capacité à infecter la souris [Yang et coll., 2004]. OspB semble également constituer un facteur de virulence, essentiel à l'adhésion de *Borrelia* à l'intestin de la tique, mais son récepteur n'a pas encore été identifié [Fikrig et coll., 2004; Neelakanta et coll., 2007].

¹¹⁰ TROSPA : *tick receptor for OspA*.

Modifications moléculaires engendrées par le gorgement

Le gorgement de la tique induit la synthèse rapide et l'expression majoritaire par *Borrelia* de la protéine de surface OspC, initialement non exprimée chez la tique à jeun [Schwan et coll., 1995]. OspC ne semble pas strictement indispensable à la dissémination systémique de *Borrelia* dans la tique et son passage dans les glandes salivaires [Grimm et coll., 2004; Tilly et coll., 2006], mais son expression pourrait cependant faciliter ce processus [Pal et coll., 2004b]. L'induction de OspC n'est observée que de façon transitoire lors du gorgement (la proportion de *Borrelia* dans l'intestin de la tique exprimant OspC diminue à nouveau à la fin du repas sanguin), et seulement chez la tique déjà infectée par *Borrelia* avant le repas sanguin, alors que OspC n'est pas exprimée par *Borrelia* lorsque la tique acquiert la bactérie lors de la prise d'un repas sanguin sur un hôte infecté [Schwan et coll., 2000]. Ces données indiquent un rôle important d'OspC dans la transmission du pathogène de la tique vers l'hôte mammifère, mais pas dans la transmission de l'hôte mammifère vers la tique.

Par ailleurs, l'induction de la protéine OspC lors du repas sanguin s'accompagne d'une réduction réciproque de l'expression de la protéine OspA [Schwan et coll., 2000; Pal et coll., 2004a]. Ce changement dans l'expression des protéines de surface OspA et OspC observé *in vivo* est bien corrélé avec les données obtenues *in vitro*, lesquelles soulignent notamment l'importance de la température dans ce mécanisme avec une expression faible d'OspA mais forte d'OspC à 37 °C, et une inversion de tendance rendant la protéine OspC indétectable à 24 °C [Schwan et coll., 1995]. La protéine de surface OspA intervient néanmoins dans la dissémination systémique de *Borrelia* dans la tique au tout début de la phase de gorgement rapide, car elle présente un domaine de liaison pour le plasminogène et pour un activateur du plasminogène – uPA [Fuchs et coll., 1994; Klempner et coll., 1995]. Le plasminogène de l'hôte vertébré, contenu dans le sang ingéré par la tique, est ainsi lié puis transformé en son principe actif – la plasmine –, dont l'activité protéolytique est mise à profit par la bactérie

pour franchir la barrière intestinale de la tique. À ce titre, OspA est un élément important dans la transmission de *Borrelia* à l'hôte vertébré, car cette protéine permet d'amorcer la migration systémique de la bactérie depuis l'intestin vers l'hémolymphe puis les glandes salivaires de la tique [Coleman et coll., 1997]. Enfin, la répression d'OspA lors du gorgement de la tique s'accompagne également d'une répression de son récepteur TROSPA ; ces modifications parallèles et concomitantes contribuent au « décrochement » des spirochètes, facilitant ainsi le franchissement de la barrière épithéliale intestinale par les spirochètes et leur passage dans l'hémolymphe [Pal et coll., 2004a].

Initiation de l'infection chez l'hôte vertébré

Parmi les lipoprotéines de surface de *Borrelia*, OspC est certainement celle qui joue le rôle le plus important dans la transmission de *Borrelia* à l'hôte vertébré puis sa dissémination. Des souches déficientes pour la synthèse d'OspC sont en effet incapables d'induire une infection chez la souris [Grimm et coll., 2004; Tilly et coll., 2006]. De tels mutants *ospC*^{-/-} sont éliminés de la peau moins de 48 heures après leur injection : étant donné l'importance d'OspC aux étapes les plus précoces de l'infection, l'équipe de Rosa et coll. évoque un rôle possible de cette protéine dans les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte [Tilly et coll., 2007]. Cependant, l'équipe de Liang et coll. a démontré que l'absence d'OspC peut être compensée par la surexpression d'autres lipoprotéines de surface (OspA, OspE, VlsE ou DbpA), prévenant ainsi la destruction rapide des souches déficientes pour OspC, et restaurant la capacité de *Borrelia* à établir l'infection initiale puis à disséminer vers ses organes cibles [Xu et coll., 2008]. Ces nouvelles données indiquent que le rôle d'OspC évoqué par Rosa et coll. repose principalement sur la capacité d'OspC et des autres lipoprotéines de surface à maintenir l'intégrité de la membrane externe de *Borrelia*, protégeant ainsi la bactérie des défenses immunitaires innées de l'hôte. Néanmoins, OspC étant la lipoprotéine de surface majoritairement exprimée lors de la transmission, c'est bien

d'elle dont dépend la réussite de l'infection initiale, et il apparaît également que cette protéine de surface est spécifiquement requise pour la dissémination efficace de *Borrelia* vers ses organes cibles [Xu et coll., 2008; Seemanapalli et coll., 2010].

L'histoire du vaccin

Enfin, il est difficile de terminer ce chapitre portant sur les bases moléculaires de la transmission de *Borrelia* à l'homme sans évoquer l'« aventure » du seul vaccin humain de la borréliose de Lyme ayant été commercialisé jusqu'à ce jour [Steere et coll., 1998] et dont le mode d'action reposait précisément sur l'inhibition de la transmission de *Borrelia* de la tique vectrice vers l'hôte accidentel que représente l'homme. Il s'agissait d'un vaccin recombinant de la protéine de surface OspA, choisie pour son rôle essentiel dans le cycle des *Borrelia* au niveau du vecteur et les bonnes performances observées avec son utilisation lors des phases précliniques de développement du vaccin [Fikrig et coll., 1990]. La stratégie vaccinale était basée sur la neutralisation du pathogène dans l'intestin de la tique au tout début de la phase de gorgement rapide (c'est à dire avant la modification de l'expression des lipoprotéines de surface OspA/B et OspC) par les anticorps anti-OspA ingérés avec le repas sanguin [de Silva et coll., 1996]. La neutralisation du pathogène était attendue (et confirmée lors des différentes expérimentations *in vivo*) par un effet bactéricide direct ou par blocage de la multiplication, de l'attachement à la muqueuse intestinale et de la dissémination systémique des *Borrelia* dans la tique [Pal et coll., 2001]. Le vaccin¹¹¹, dont la *Food and Drug Administration* (FDA) a autorisé la mise sur le marché le 21 décembre 1998 aux États-Unis, a vu sa production volontairement abandonnée par son fabricant tout juste trois ans après sa commercialisation en raison d'un trop faible succès commercial lié non seulement au coût et à la lourdeur du

¹¹¹ Vaccin commercialisé sous le nom de LYMERixTM par la société GlaxoSmithKline.

protocole vaccinal,¹¹² mais aussi, et surtout à une controverse autour d'un risque potentiel d'arthrite auto-immune dont la survenue chez l'homme n'a pourtant jamais été démontrée [Abbott, 2006; Nigrovic et coll., 2007].

¹¹² Le vaccin présentait également une efficacité insuffisante (protection estimée à 80 % des individus ayant reçu trois doses vaccinales) limitée dans le temps (obligeant le recours à des doses *booster* additionnelles) et une protection croisée avec des souches non nord-américaines probablement limitée.

IV INTERACTION DE *BORRELIA* AVEC LA PEAU ET SON SYSTÈME IMMUNITAIRE

1 INTERACTION DE *BORRELIA* AVEC LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Dans la peau, mais également dans tous les autres tissus et organes que *Borrelia* est susceptible de coloniser et au sein desquels *Borrelia* se multiplie, la bactérie entretient des liens étroits avec les éléments de la matrice extracellulaire, grâce à plusieurs protéines de surface dont certaines jouent le rôle de véritables adhésines. *Borrelia* étant par ailleurs dépourvue d'activité protéolytique intrinsèque, la bactérie détourne à son profit les propres systèmes de destruction de la matrice extracellulaire (métalloprotéases et sérines-protéases) de l'hôte pour se mouvoir dans les espaces intercellulaires.

Les adhésines de *Borrelia*

Borrelia exprime à sa surface plusieurs lipoprotéines capables de lier la fibronectine, dont la plus étudiée est **BBK32** [Probert et coll., 1998]. La synthèse de BBK32 (codée par le gène *bbk32* situé sur le plasmide lp36) débute lors du gorgement de la tique et son expression est fortement induite après transmission à l'hôte vertébré [Fikrig et coll., 2000]. *In vitro*, les données expérimentales indiquent que les modifications de température et de pH sont deux facteurs environnementaux importants qui participent à la modification de l'expression de BBK32 [He et coll., 2007]. Au même titre que d'autres protéines de liaison à la fibronectine exprimées par des pathogènes extracellulaires, comme les protéines FnbpA¹¹³ de *Staphylococcus aureus* ou SfbI¹¹⁴ de *Streptococcus pyogenes*, avec lesquelles BBK32 possède des analogies structurales et fonctionnelles [Raibaud et coll., 2005], BBK32 appartient à la

¹¹³ Fnbp : fibronectin binding protein.

¹¹⁴ Sfbp : streptococcal fibronectin binding protein.

famille des MSCRAMMs¹¹⁵ [Kim et coll., 2004] – molécules de surface spécialisées dans l'adhésion aux éléments de la matrice extracellulaire [Patti et coll., 1994]. Outre sa capacité d'adhésion à la fibronectine, BBK32 est également capable de lier différents glycosaminoglycanes de l'hôte (comme le dermatane ou l'héparine sulfate) [Fischer et coll., 2006]. Grâce à ces différents types d'interactions, BBK32 semble impliquée dans la capacité des *Borrelia* circulantes à adhérer aux vaisseaux et à pénétrer dans les tissus à partir du système circulatoire [Norman et coll., 2008]. Les données expérimentales concernant les conséquences d'une perte de fonction de BBK32 indiquent que l'absence de BBK32 réduit l'infectiosité de *Borrelia* [Seshu et coll., 2006], mais que sa présence n'est cependant pas essentielle à la transmission et à la dissémination du pathogène [Li et coll., 2006]. D'autres lipoprotéines de surface, comme **RevA**¹¹⁶ et **RevB**, sont également capables d'assurer une liaison de *Borrelia* avec la fibronectine [Brissette et coll., 2009a], et permettent probablement de compenser la perte de fonction de BBK32 dans ces modèles expérimentaux. La redondance des fonctions d'adhérence (une même cible tissulaire pouvant être reconnue par différentes protéines de surface de *Borrelia*), et la multiplicité des cibles tissulaires avec lesquelles *Borrelia* interagit, contribuent certainement à limiter pour la bactérie les conséquences fonctionnelles inhérentes à la perte de matériel génétique (BBK32 est codée par un gène plasmidique), et traduit un fort potentiel d'adaptation de *Borrelia* aux différents environnements rencontrés.

Deux autres lipoprotéines, **DbpA**¹¹⁷ et **DbpB**, permettent l'adhésion de *Borrelia* à la décorine [Guo et coll., 1995], et assurent ainsi une liaison indirecte entre la bactérie et les fibres de collagène du derme et des autres tissus conjonctifs cibles de l'infection. Elles sont, comme BBK32, à considérer comme de véritables membres de la famille des MSCRAMMs

¹¹⁵ MSCRAMMs : microbial surface components recognising adhesive matrix molecules.

¹¹⁶ L'appellation *rev* indique l'orientation réverse des gènes *rev* par rapport aux gènes adjacents dénommés *rep*.

¹¹⁷ Dbp : decorin binding protein.

[Guo et coll., 1998]. DbpA et DbpB sont respectivement codées par les gènes *dbpA* et *dbpB* situés sur le plasmide Ip54, et la transcription de ces derniers est induite après transmission à l'hôte vertébré [Hagman et coll., 1998]. DbpA et DbpB représentent des facteurs de virulence importants pour *Borrelia* [Shi et coll., 2008b] : les résultats expérimentaux sur modèle murin indiquent notamment que l'infectivité des souches déficientes en protéines de liaison à la décorine est diminuée [Shi et coll., 2008a], et que la dissémination de *Borrelia* chez des souris déficientes en décorine est également altérée [Brown et coll., 2001]. Enfin, bien que l'étude initiale de Guo et coll. n'ait pas permis de démontrer que *Borrelia* peut interagir de façon directe avec les fibres de collagène [Guo et coll., 1995], des données plus récentes indiquent au contraire que la bactérie est capable non seulement d'adhérer aux fibres de collagène de type I, mais également d'y former des microcolonies, et ce en l'absence de décorine ou d'autres protéoglycanes [Zambrano et coll., 2004]. Outre les protéines de liaison à la décorine, d'autres protéines de surface de *Borrelia*, comme **BBK32** mais aussi **Bgp**¹¹⁸ permettent l'adhésion de la bactérie aux protéoglycanes et glycosaminoglycanes de l'hôte [Parveen et coll., 2000]. Si Bgp représente l'une des nombreuses protéines d'adhésion de *Borrelia*, Bgp est en revanche l'une des rares protéines sécrétées dans le milieu extérieur par la bactérie [Cluss et coll., 2004].

Par ailleurs, des travaux récents ont permis de mettre en évidence une interaction directe entre *Borrelia* et la laminine (composant majeur des lames basales) et d'identifier plusieurs protéines de surface impliquées dans cette interaction. Il s'agit d'un membre de la famille des lipoprotéines Erps¹¹⁹ – **ErpX** – [Brissette et coll., 2008; Brissette et coll., 2009c], ainsi que de la lipoprotéine **BmpA**¹²⁰ et de ses trois paralogues **BmpB**, **BmpC**, et **BmpD** [Verma et coll.,

¹¹⁸ Bgp : *Borrelia* gag binding protein. Le gène codant Bgp est situé sur le chromosome linéaire de *Borrelia*.

¹¹⁹ Erp : *OspE-F related lipoprotein*.

¹²⁰ Bmp : *Borrelia* membrane protein. La fonction de BmpA, initialement décrite comme la protéine P39, et de ses paralogues n'a pas encore été identifiée.

2009] : ces protéines constituent ainsi encore d'autres facteurs d'adhésion de *Borrelia* à la matrice extracellulaire, probablement impliqués dans la dissémination, puis l'invasion et la persistance des tissus cibles de l'infection.

Enfin, une autre protéine de surface – **P66** –, bien que n'interagissant pas directement avec la matrice extracellulaire, représente une autre adhésine majeure de *Borrelia* [Antonara et coll., 2007]. La protéine P66 (également connue sous le nom de Oms66¹²¹), codée par un gène chromosomique [Probert et coll., 1995], est une protéine exposée à la surface membranaire de *Borrelia* [Bunikis et coll., 1995; Probert et coll., 1995; Skare et coll., 1997]. Alors que la synthèse de P66 est indétectable chez la tique non gorgée, son expression est induite par le gorgement [Cugini et coll., 2003]. P66 reconnaît spécifiquement la sous-unité β_3 des intégrines, et permet notamment l'adhésion de *Borrelia* aux plaquettes *via* l'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ¹²² et à l'endothélium *via* l'interaction avec l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ [Coburn et coll., 1993; Coburn et coll., 1999; Coburn et coll., 2003] : l'adhésion de *Borrelia* aux plaquettes activées, agrégées sur la paroi des vaisseaux lésés, pourrait constituer l'un des mécanismes par lesquels la bactérie accède à la circulation sanguine systémique et dissémine vers ses organes cibles.

***Borrelia* et destruction de la matrice extracellulaire**

Au contraire d'autres bactéries invasives qui produisent et excrètent dans le milieu extérieur des protéases (on pourra citer par exemple la synthèse par *Staphylococcus aureus* des protéases SspA, ScpB et de l'auréolysine [Skare et coll., 1997]), *Borrelia* est dépourvue d'activité protéolytique intrinsèque [Coleman et coll., 1995; Klempner et coll., 1995]. Néanmoins, *Borrelia* compense l'absence de cette activité en induisant la synthèse de diverses métalloprotéases (MMP-1, MMP-3, MMP-9, par exemple) à la fois *in vitro* [Gebbia et coll.,

¹²¹ Oms66 : *outer membrane-spanning 66-kDa protein*.

¹²² L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est également connue sous le nom de glycoprotéine GpIIb-IIIa.

2001; Hu et coll., 2001; Behera et coll., 2004] et *in vivo* [Lin et coll., 2001; Zhao et coll., 2003]. Par ailleurs, *Borrelia* peut lier le plasminogène ainsi que les activateurs tissulaires du plasminogène [Klempner et coll., 1995] (dont la production locale est – au moment de la transmission à l’hôte vertébré – avantageusement augmentée par l’inflammation générée à la fois par la blessure liée à la piqûre de tique et par la réponse immunitaire dirigée contre la bactérie). L’activation du plasminogène en plasmine, liée à la surface de *Borrelia*, permet à la bactérie de détruire les composants adjacents de la matrice extracellulaire et des membranes basales [Coleman et coll., 1999] (à la faveur du large spectre protéolytique intrinsèque de la plasmine et à l’activation indirecte des métalloprotéases, voir chapitre « Les enzymes protéolytiques : métalloprotéases et sérine-protéases », page 25), favorisant ainsi la migration tissulaire et probablement aussi la pénétration vasculaire du spirochète [Coleman et coll., 1995; Klempner et coll., 1995]. Plusieurs protéines de surface de *Borrelia* sont capables de lier le plasminogène. **OspA** est la première d’entre elles [Fuchs et coll., 1994], mais comme nous l’avons vu plus haut, si la liaison OspA/plasminogène présente en effet une importance fonctionnelle pour la migration de *Borrelia* dans la tique [Coleman et coll., 1997], la synthèse de la protéine OspA est ensuite réprimée chez l’hôte vertébré au profit d’OspC. La protéine **OspC** présente aussi une affinité pour le plasminogène, mais si le rôle de la liaison OspC/plasminogène comme facteur de virulence potentiel pour *Borrelia* a également été suggéré [Lagal et coll., 2006], la diminution de la production d’OspC jusqu’à son absence complète de synthèse dans les quelques jours qui suivent de début de l’infection chez l’hôte vertébré [Liang et coll., 2002a; Crother et coll., 2004] ne permet pas de considérer cette liaison comme un facteur de virulence déterminant pour les manifestations disséminées de la phase tardive de la maladie. Trois lipoprotéines de la famille Erp – **ErpP**, **ErpA** et **ErpC** – sont capables de lier le plasminogène [Brissette et coll., 2009b], mais à la différence d’OspA et OspC, les lipoprotéines de la famille Erp sont fortement exprimées tout au long de

l'infection chez l'hôte vertébré [Miller et coll., 2005; Miller et coll., 2006]. Ces protéines Erp contribuent probablement à la dissémination du pathogène, en particulier dans les phases tardives de la maladie [Brissette et coll., 2009b]. Enfin, une autre protéine de surface, **CRASP-1**¹²³, mieux connue pour son rôle dans le mécanisme d'échappement de *Borrelia* à la lyse médiée par le complément (voir chapitre « Mécanismes d'échappement à l'action du complément », page 101), est également capable de lier le plasminogène (ainsi que plusieurs autres composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine, et le collagène), et de le convertir en plasmine [Hallstrom et coll., 2010].

2 INITIATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE PAR *BORRELIA*

Borrelia interagit avec une grande variété de cellules immunitaires spécialisées – comme les cellules dendritiques [Filgueira et coll., 1996; Suhonen et coll., 2003], les lymphocytes [Knigge et coll., 1996; Kalish et coll., 2003; Kinjo et coll., 2006; Collins et coll., 2008], les monocytes/macrophages [Cruz et coll., 2008; Salazar et coll., 2009], ou encore les mastocytes [Talkington et coll., 1999] – dont la présence dans la peau constitue un réseau de surveillance, indispensable à la défense de l'organisme contre les infections [Nestle et coll., 2009]. Mais *Borrelia* est également capable d'induire l'activation de cellules résidentes « structurales » comme les kératinocytes et les fibroblastes [Ebnet et coll., 1997; Marchal et coll., 2009], ou encore les cellules endothéliales [Sellati et coll., 1995; Sellati et coll., 1996; Ebnet et coll., 1997], qui participent elles aussi (directement ou indirectement) à ce réseau de surveillance. L'activation de ces différentes catégories cellulaires par *Borrelia* repose d'une part sur l'interaction de la bactérie avec les récepteurs cellulaires de reconnaissance de motif (comme les récepteurs TLRs ou NODs) impliqués principalement dans la réponse immunitaire innée

¹²³ CRASP : *complement regulator-acquiring surface protein*.

non spécifique, et d'autre part sur l'interaction plus spécifique entre les cellules de l'immunité adaptative et les antigènes bactériens apprêtés par les cellules présentatrices d'antigènes.

Interaction de *Borrelia* avec les TLRs

Les TLRs jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire dirigée contre *Borrelia* [Guerau-de-Arellano et coll., 2005]. *Borrelia* ne produit pas de LPS [Takayama et coll., 1987] mais possède au contraire de nombreuses lipoprotéines de surface fortement immunogènes [Brandt et coll., 1990], dont un motif triacylé¹²⁴ de la partie lipidique constitue un véritable PAMP [Singh et coll., 2006]. *In vivo*, l'injection intra-articulaire [Gondolf et coll., 1994] ou intradermique [Norgard et coll., 1995] de lipoprotéines (ou de leurs équivalents lipopeptidiques) de *Borrelia* induit une atteinte inflammatoire localisée. Les lipoprotéines de *Borrelia* sont en effet capables d'induire une réponse pro-inflammatoire caractérisée par la production de cytokines et chimiokines résultant de l'activation de la voie NF- κ B, elle-même activée par la stimulation des récepteurs TLRs [Singh et coll., 2006].

Cette réponse pro-inflammatoire est liée *in vitro* à l'interaction des lipoprotéines de *Borrelia* avec **TLR2** [Hirschfeld et coll., 1999]. Les modèles expérimentaux dans lesquels TLR2 ou MyD88¹²⁵ (son effecteur intracellulaire) sont inactivés montrent que la voie de signalisation TLR2 joue un rôle majeur dans le contrôle initial de l'infection tissulaire : les charges bactériennes tissulaires observées à la phase initiale de l'infection dans les systèmes TLR2^{-/-} ou MyD88^{-/-} sont en effet jusqu'à 250 fois plus élevées que dans leurs témoins « sauvages » [Wooten et coll., 2002; Bolz et coll., 2004; Liu et coll., 2004; Wang et coll., 2004; Behera et coll., 2006]. Néanmoins, *Borrelia* est capable d'induire des lésions inflammatoires (parfois même plus sévères ou touchant des tissus habituellement non concernés par l'infection à *Borrelia* [Wooten et coll., 2002; Behera et coll., 2006]) en

¹²⁴ N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl, encore appelé Pam₃Cys.

¹²⁵ MyD88 : *myeloid differentiation primary response gene 88*.

l'absence d'une voie de signalisation TLR2 opérationnelle : ces données indiquent que d'autres TLRs (et d'autres PRRs) sont impliqués dans la reconnaissance de la bactérie.

Une étude a démontré que les individus « faiblement répondeurs » à la vaccination par le LYMERix (protéine OspA recombinante) ont une faible expression cellulaire de TLR1 et que des souris déficientes en TLR1 et TLR2 ne produisent qu'une très faible réponse anticorps à la vaccination par OspA [Alexopoulou et coll., 2002]. Ces résultats suggèrent que TLR1 joue aussi (avec TLR2) un rôle important dans la reconnaissance des lipoprotéines triacylées de *Borrelia* ; ces résultats sont par ailleurs en accord avec les données de la littérature indiquant que l'association hétérodimérique **TLR2/TLR1** est responsable de la détection de motifs lipopeptidiques spécifiques triacylés (l'association TLR2/TLR6 est quant à elle responsable de la détection des motifs diacylés) [Kawai et coll., 2011]. De plus, une coopération **TLR2/TLR6** dans l'activation de cellules endothéliales par la lipoprotéine OspA ayant été démontrée *in vitro* [Bulut et coll., 2001], il n'est pas exclu que TLR6 participe également *in vivo* à la reconnaissance de *Borrelia* et à l'induction de la réponse immunitaire dirigée contre elle. En revanche, TLR4 ne participe pas à la reconnaissance de la bactérie, car le ligand principal de TLR4 est le LPS des bactéries à Gram négatif [Kawai et coll., 2011], et *Borrelia* en est dépourvue [Takayama et coll., 1987].

Par ailleurs, d'autres composants bactériens que les lipoprotéines de surface sont susceptibles d'interagir avec les TLRs de l'hôte. Les macrophages de souris déficients en TLR2, bien qu'insensibles aux lipoprotéines de *Borrelia*, restent par exemple sensibles à l'activation par d'autres composants de la bactérie [Wooten et coll., 2002]. La flagelline (protéine principale des flagelles bactériens) pourrait être l'un de ces composants. La flagelline est en effet reconnue par TLR5 [Kawai et coll., 2011], mais la flagelline de *Borrelia* n'est pas exposée à la surface de la bactérie (car contenue intégralement dans l'espace périplasmique). Lorsque TLR2 est fonctionnel, TLR5 ne semble pas jouer de rôle significatif

dans la production de cytokines en réponse à la stimulation par des *Borrelia* vivantes [Salazar et coll., 2009]. Deux études ont pourtant mis en évidence un rôle possible de **TLR5** dans la réponse inflammatoire induite par *Borrelia* [Bernardino et coll., 2008; Shin et coll., 2008], mais l'induction de la voie TLR5 observée est probablement liée à la stimulation du récepteur par des constituants flagellaires de bactéries lysées. Par ailleurs, TLR9 reconnaît les ilots CpG de l'ADN des pathogènes¹²⁶ [Kawai et coll., 2011]. Ces motifs CpG pourraient également être à l'origine de l'induction d'une réponse inflammatoire par *Borrelia* : si deux équipes ayant évalué la question n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse [Bernardino et coll., 2008; Shin et coll., 2008], seule l'équipe de Schwartz a jusqu'à présent pu montrer que *Borrelia* est capable d'induire (après phagocytose dans un système de culture *ex vivo* de PBMCs¹²⁷ humains) la synthèse d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires en stimulant non seulement **TLR9**, mais aussi **TLR7** [Petzke et coll., 2009] – impliqué quant à lui dans la reconnaissance d'ARN simple brin viraux, bactériens ou fongiques [Kawai et coll., 2011]. Encore plus récemment, Cervantes et coll. ont découvert que **TLR8** (situé comme TLR7 et TLR9 dans la voie phagolysosomiale en position intracellulaire, et impliqué comme TLR7 dans la reconnaissance d'ARN simple brin [Kawai et coll., 2011]) intervient également dans la modulation de la réponse immunitaire induite par *Borrelia* (après phagocytose dans des monocytes humains), de façon coopérative avec TLR2, et même exclusive pour la synthèse d'IFN- β [Cervantes et coll., 2011].

Interaction de *Borrelia* avec les autres PRRs

La reconnaissance de *Borrelia* par d'autres PRRs que les TLRs a jusqu'à présent été peu étudiée. Néanmoins, des études récentes indiquent que *Borrelia* interagit avec les récepteurs intracellulaires de type NOD (sensibles au peptidoglycane des bactéries). L'interaction de

¹²⁶ Les ilots CpG sont fréquemment présents dans l'ADN bactérien et viral, mais rares chez les mammifères.

¹²⁷ PBMCs : *peripheral blood mononuclear cells*.

Borrelia avec NOD2 induit notamment la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, et cette réponse se surajoute à celle déjà produite par l'interaction de la bactérie avec TLR2 [Oosting et coll., 2010]. *Borrelia* induit également *in vitro* l'expression de NOD2 par des cellules gliales [Sterka et coll., 2006b] et microgliales [Sterka et coll., 2006a] murines. La stimulation du récepteur NOD2 joue un rôle important dans la réponse inflammatoire (observée à la fois *in vitro* et *in vivo*¹²⁸) provoquée par *Borrelia* dans le système nerveux central [Chauhan et coll., 2009].

Par ailleurs, un autre PRR, le récepteur au mannose (MR) – élément majeur de la fonction phagocytaire des cellules présentatrices d'antigènes et des macrophages, impliqué dans la reconnaissance de motifs polysaccharidiques mannosylés présents à la surface de nombreux pathogènes (bactéries à Gram positif et négatif, mycobactéries, levures, parasites ...) [Apostolopoulos et coll., 2001] – pourrait également participer à la reconnaissance de *Borrelia*, dans la mesure où le rôle de l'interaction *Borrelia*/MR dans l'adhésion de la bactérie aux macrophages a été démontré *in vitro* [Cinco et coll., 2001].

Activation des réponses immunitaires spécifiques

Les **cellules présentatrices d'antigènes** (CPA) jouent un rôle central dans la réponse immunitaire contre *Borrelia*, à l'interface entre les réponses innées et adaptatives. Dans la peau, les CPA (cellules dendritiques dermiques et cellules de Langerhans) représentent une des premières lignes de défense contre l'infection à *Borrelia* : elles sont capables de phagocyter la bactérie (dérivés notamment des lipoprotéines de surface) et d'apprêter ses antigènes [Filgueira et coll., 1996; Suhonen et coll., 2003] pour les présenter aux lymphocytes T CD8⁺ [Beermann et coll., 2000]. *In vivo*, la participation des lymphocytes T dans la réponse immunitaire dirigée contre *Borrelia* a été démontrée dans plusieurs modèles expérimentaux

¹²⁸ Dans cette étude, le volet *in vivo* du protocole expérimental reposait sur l'injection intracérébrale de *Borrelia* chez des souris NOD2^{-/-} ou chez des souris témoins sauvages.

murins¹²⁹ [Pachner et coll., 1991; Keane-Myers et coll., 1995]. Chez l'homme également, la réactivité spécifique des populations lymphocytaires T à divers antigènes de *Borrelia* a été mise en évidence, en particulier chez des patients atteints de manifestations tardives chroniques de la maladie [Dattwyler et coll., 1988; Yoshinari et coll., 1991; Kalish et coll., 2003]. Outre les **lymphocytes T CD8⁺**, *Borrelia* est également capable d'activer les **lymphocytes T CD4⁺** [Knigge et coll., 1996]. Concernant la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ (**balance Th1/Th2**) induite par l'infection à *Borrelia*, la question de son impact sur l'évolution de la maladie reste controversée. Certains travaux indiquent que la synthèse d'IL-12¹³⁰ et la persistance d'une production cytokinique de type Th1 favoriseraient la progression de la maladie chez l'homme [Gross et coll., 1998; Widhe et coll., 2004] et les souris sensibles à l'infection par *Borrelia* [Matyniak et coll., 1995; Anguita et coll., 1996], alors qu'une réponse de type Th2 serait corrélée avec une évolution favorable de la maladie [Matyniak et coll., 1995; Gross et coll., 1998; Widhe et coll., 2004]. Cependant, d'autres études indiquent au contraire qu'une forte réponse Th1 pourrait avoir des effets bénéfiques et favoriser la résolution de l'infection à la fois chez l'animal (réduction de la cardite induite par *Borrelia* dans un modèle murin) [Bockenstedt et coll., 2001] et chez l'homme [Sjowall et coll., 2005], en particulier à la phase initiale cutanée de l'infection [Sjowall et coll., 2011]. Par ailleurs, la mise en évidence d'une synthèse locale d'IL-17 dans le liquide céphalo-rachidien [Henningsson et coll., 2011]¹³¹ ainsi que dans les surnageants de culture de

¹²⁹ Dans l'étude de Kaene-Myers et coll., 1995, la déplétion des LT CD4⁺ induisait une aggravation des manifestations articulaires, alors que la déplétion en LT CD8⁺ induisait au contraire une amélioration de la symptomatologie articulaire, suggérant un rôle protecteur des LT CD4⁺ et un effet facilitateur des LT CD8 dans l'infection à *Borrelia*.

¹³⁰ L'IL-12 représente un stimulus puissant qui oriente les cellules T vers une différenciation de type Th1.

¹³¹ Dans cette étude, une réponse locale de type Th1 prédominait, mais la synthèse concomitante d'IL-17 a été détectée dans le liquide céphalo-rachidien de 49 % des patients (65 sur 133) atteints de neuroborréliose.

lymphocytes T synoviaux [Codolo et coll., 2008]¹³² de patients respectivement atteints de neuroborréliose et d'arthrite de Lyme indique un rôle possible des **lymphocytes de type Th17** dans les manifestations disséminées de la borréliose de Lyme.

Borrelia induit l'activation des **cellules NKT**, qui représentent une sous-population très particulière de lymphocytes T¹³³ : les cellules NKT reconnaissent en effet de façon spécifique un antigène glycolipidique¹³⁴ de *Borrelia*, que les CPA leur présentent par l'intermédiaire de CD1d [Godfrey et coll., 2006; Kinjo et coll., 2006]. L'importance des cellules NKT dans la défense de l'hôte contre l'infection à *Borrelia* a été évaluée *in vivo* sur modèle murin. Dans le tissu hépatique, les cellules NKT participent, en collaboration avec les cellules de Kupffer (capables de phagocyter *Borrelia* [Sambri et coll., 1996]), à la clairance vasculaire des spirochètes : les cellules NKT limitent ainsi la dissémination systémique de *Borrelia* et son passage dans ses organes cibles [Lee et coll., 2010]. Les cellules NKT contribuent également à limiter la sévérité des manifestations articulaires [Tupin et coll., 2008] et cardiaques [Olson et coll., 2009] de la maladie. *Borrelia* induit aussi l'activation d'une autre sous-population spécifique de lymphocytes, les **lymphocytes T $\gamma\delta$** . L'équipe de Budd et coll. a montré que la stimulation de lymphocytes T $\gamma\delta$ synoviaux par *Borrelia* induit leur prolifération à la fois *in vitro* [Vincent et coll., 1996] et *in vivo*, via un mécanisme partiellement dépendant de TLR2 [Collins et coll., 2008; Shi et coll., 2011]. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ainsi stimulés induisent également la maturation des cellules dendritiques *in vitro* [Collins et coll., 2005], et participent *in vivo* à l'induction d'une réponse immunitaire adaptative protectrice contre

¹³² Dans cette étude, les lymphocytes T utilisés dans les tests *in vitro* ont été collectés chez 5 patients atteints d'arthrite de Lyme.

¹³³ Les cellules NKT se distinguent des cellules T classiques par le fait que le TCR (T cell receptor) ne reconnaît pas des antigènes peptidiques apprêtés par le CMH, mais des antigènes lipidiques ou glycolipidiques présentés par la molécule CD1d (molécule présentatrice d'antigène).

¹³⁴ La structure glycolipidique reconnue est un diglycéride (diacylglycérol).

l'infection à *Borrelia* [Shi et coll., 2011]¹³⁵. Les cellules NKT et les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont donc deux catégories spécifiques de lymphocytes T, capables de stimuler, en réponse à l'infection par *Borrelia*, les deux types de réponse immunitaire – innée et adaptative –, à l'embranchement desquelles elles se situent.

Enfin, la stimulation des **lymphocytes B** et la production subséquente d'**anticorps spécifiques** sont des données largement reprises dans la littérature (expérimentale, diagnostique et clinique) au sujet de la borréliose de Lyme. Mais si la réponse anticorps est capable d'induire la rémission des animaux infectés dans les modèles expérimentaux murins (sans toutefois parvenir à une élimination complète de la bactérie) [Barthold et coll., 2006], il n'en demeure pas moins que les manifestations cliniques chez l'homme (et en particulier celles de la phase tardive chronique de la maladie) surviennent en dépit d'une forte réponse humorale dirigée contre la bactérie [Kraiczky et coll., 2002] (voir chapitre « Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire humorale », page 103).

¹³⁵ Dans cette étude, des souris déficientes en LT $\gamma\delta$ présentaient une expansion lymphocytaire (B, T CD4⁺ et T CD8⁺) réduite, corroborée par une production faible d'anticorps anti-*Borrelia* et de cytokines pro-inflammatoires ; parallèlement, la charge bactérienne tissulaire et l'inflammation cardiaque observée étaient plus élevées que chez les souris témoin.

3 MÉCANISMES D'ÉCHAPPEMENT DE *BORRELIA* À LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

Mécanismes d'échappement à l'action du complément

La voie alternative du complément est une des grandes composantes de la réponse immunitaire innée à laquelle *Borrelia*, et de façon plus large les micro-organismes infectieux, doivent faire face dans l'environnement représenté par l'hôte vertébré, et ce dès les premières heures après leur inoculation.

Afin de se protéger de la lyse cellulaire médiée par la voie alternative du complément, *Borrelia* détourne à son profit le propre mécanisme de protection des cellules du soi contre le complément. *Borrelia* exprime en effet à sa surface plusieurs protéines qui peuvent lier le facteur H (fH), le facteur 1 de type H (fHL-1, *factor H-like 1*), ou encore d'autres protéines apparentées au facteur H (CFHRs, *complement factor H-related proteins*) : ces différentes protéines sont des inhibiteurs spécifiques de la convertase de la voie alternative du complément [Brissette et coll., 2008]. Les protéines de surface de *Borrelia* qui possèdent la plus grande affinité pour fH sont les protéines CRASP-1 et CRASP-2 [Kraiczky et coll., 2001], ainsi que trois membres de la famille des protéines Erp – ErpP (CRASP-3), ErpC (CRASP-4) et ErpA (CRASP-5) [Brissette et coll., 2008] ; CRASP-1 et CRASP-2 possèdent aussi une affinité pour fHL-1, alors que les protéines Erp en sont dépourvues [Kraiczky et coll., 2001; Brissette et coll., 2008] ; ErpP, ErpC et ErpA peuvent également lier plusieurs autres protéines apparentées au facteur H (CFHR-1, CFHR-2 et CFHR-5) [Haupt et coll., 2007; Siegel et coll., 2010]. D'autres protéines membranaires de *Borrelia* sont capables de lier le facteur H, comme OspE [Hellwage et coll., 2001] ou ErpX [Stevenson et coll., 2002], mais leur affinité pour cette protéine est plus faible [Brissette et coll., 2008]. L'adhésion de *Borrelia* à des protéines de l'hôte, spécialisées dans l'inhibition de la voie alternative du complément, constitue ainsi le mécanisme d'échappement principal de *Borrelia* à la lyse

médiée par le complément. De plus, fH étant lié aux cellules eucaryotes par différents récepteurs (comme les sélectines leucocytaires [Malhotra et coll., 1999] ou encore l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ des plaquettes [Vaziri-Sani et coll., 2005]), la liaison fH/*Borrelia* pourrait également favoriser l'adhésion de la bactérie aux cellules et tissus de l'hôte : un mécanisme similaire d'adhésion cellulaire a été décrit chez *Streptococcus pneumoniae* [Hammerschmidt et coll., 2007]. L'acquisition de protéines régulatrices de l'hôte, pour se prémunir de l'activité du complément, est un mécanisme utilisé par de nombreux pathogènes (y compris les bactéries du genre *Leptospira* – proches du genre *Borrelia* –, dont les protéines LenA¹³⁶ et LenB lient fH [Fraga et coll., 2011]).

Par ailleurs, *Borrelia* exprime également à sa surface une protéine apparentée à CD59 (ou protectine) [Pausa et coll., 2003]. CD59 est une protéine membranaire, exprimée par la plupart des cellules eucaryotes, qui participe à la protection des cellules du soi contre le complément : elle vient se loger dans le complexe membranaire d'attaque en cours d'assemblage et bloque sa formation [Male et coll., 2007]. Le mimétisme moléculaire avec un facteur de régulation clé de la voie d'attaque membranaire du complément représente ainsi un autre mécanisme d'échappement de *Borrelia* à la lyse médiée par le complément.

Enfin, *Borrelia* bénéficie indirectement et localement (au niveau du site de la piqûre de tique) des effets immunomodulateurs de certaines protéines de la salive de tique (voir chapitre « Contribution de la salive de tique aux mécanismes d'échappement de *Borrelia* », page 108), comme les protéines Isac¹³⁷ d'*I. scapularis* [Valenzuela et coll., 2000], leurs homologues Irac¹³⁸ chez *I. ricinus* [Schroeder et coll., 2007], et la protéine Salp20 [Tyson et coll., 2007], inhibant spécifiquement l'activité du complément (voir chapitre « Activité anti-inflammatoire de la salive et modulation de la réponse immunitaire innée », page 66) [Valenzuela et coll.,

¹³⁶ Len : *leptospiral endostatin-like protein*.

¹³⁷ Isac : *Ixodes scapularis salivary anticomplement protein*.

¹³⁸ Irac : *Ixodes ricinus salivary anticomplement protein*.

2000; Tyson et coll., 2007]. *Borrelia* bénéficie également de façon plus directe de l'effet de la protéine Salp15 qui inhibe le dépôt des constituants du complexe d'attaque membranaire à sa surface [Schuijt et coll., 2008].

Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire humorale

Lorsque la bactérie est injectée dans la peau d'un hôte vertébré, OspC est la lipoprotéine de surface la plus exprimée. OspC représente un facteur de virulence majeur pour *Borrelia*, mais il représente également un antigène puissant, à l'origine d'une réponse humorale spécifique [Fung et coll., 1994]. Celle-ci vient exercer une forte pression immunitaire sur la bactérie : OspC induit notamment la synthèse d'anticorps neutralisants [Rousselle et coll., 1998] dont l'action lytique est médiée par le complément et par l'opsonisation de la bactérie [Steere et coll., 2004]. Les spirochètes inoculés dans la peau sont (au moins localement et temporairement) protégés des effets bactéricides de ces anticorps, car la protéine OspC est initialement « masquée » par la protéine Salp15. L'association OspC/Salp15 a lieu dans les glandes salivaires de la tique avant l'injection des *Borrelia* dans la peau [Ramamoorthi et coll., 2005] (voir chapitre « Contribution de la salive de tique aux mécanismes d'échappement de *Borrelia* », page 108). Dans un second temps, la synthèse de cet antigène fortement immunogène est inhibée : cette inhibition, secondaire à la mise en place de la réponse anticorps chez l'hôte vertébré, représente un mécanisme important d'échappement de *Borrelia* à la réponse immunitaire humorale [Liang et coll., 2002a; Xu et coll., 2006]. Sur un modèle murin d'immunodépression (souris SCID), *Borrelia* exprime OspC tout au long de l'infection [Liang et coll., 2002a; Liang et coll., 2002b], alors que l'expression d'OspC est inhibée chez la souris immunocompétente. De plus, l'expression constitutive « forcée » de la protéine OspC empêche la bactérie d'établir une infection chronique chez des souris immunocompétentes [Xu et coll., 2006].

Les modifications antigéniques de surface, induites par la pression immunitaire exercée sur la bactérie, sont considérables [Liang et coll., 2002b]. À l'inhibition de la synthèse d'OspC, s'ajoute en particulier la surexpression d'une autre lipoprotéine de surface – la protéine VlsE [Liang et coll., 2004b]. Outre la modification de son niveau d'expression, la protéine VlsE présente également de façon très précoce des **variations antigéniques** majeures. Le gène *vls* qui code la protéine VlsE est situé sur un plasmide linéaire (le plasmide lp28) ; *vls* est constitué d'un site d'expression (*vlsE*) et de 15 cassettes silencieuses (non transcrites) situées en amont de celui-ci [Zhang et coll., 1997]. Des phénomènes aléatoires de recombinaison génétique entre le site d'expression et les différentes cassettes surviennent dès les premiers jours qui suivent l'infection de l'hôte vertébré et conduisent à l'expression d'un grand nombre de variants VlsE [Zhang et coll., 1997]. Cette mosaïque antigénique permet à la bactérie d'échapper à la destruction par les anticorps anti-VlsE. Il s'agit d'un mécanisme majeur d'échappement à la réponse immunitaire humorale de l'hôte, diamétralement opposé à celui observé pour OspC. La perte du plasmide lp28 (qui porte le gène *vls* et ses cassettes de recombinaison) n'abolit pas la capacité de *Borrelia* à infecter un hôte vertébré, mais elle empêche la bactérie de persister chez des souris immunocompétentes, alors qu'elle n'a aucune conséquence sur sa persistance chez des souris immunodéprimées [Labandeira-Rey et coll., 2003; Lawrenz et coll., 2004]. Ces études indiquent que la protéine VlsE n'intervient pas dans la dissémination du pathogène vers ses organes cibles, mais que ses variations antigéniques constituent un élément essentiel pour la persistance de la bactérie dans les tissus au sein desquels la bactérie aura pu disséminer. Ce mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire humorale par variation antigénique d'une protéine de surface fortement exprimée et immunogène est retrouvé de façon analogue chez d'autres bactéries :

c'est le cas notamment pour la protéine TprK¹³⁹ de *Treponema pallidum* ou encore de la protéine majeure de surface Msp2¹⁴⁰ d'*Anaplasma marginale* (bactérie pathogène transmise également par les tiques) [Palmer et coll., 2009].

Mécanismes « physiques » d'échappement à la réponse immunitaire

Parmi les tissus et organes que *Borrelia* peut coloniser lors de sa dissémination hématogène, le système nerveux central et l'œil sont deux exemples particuliers de sites dont la faible activité immunologique locale et la faible accessibilité aux réponses immunitaires systémiques en font des organes « privilégiés » sur le plan immunologique [Male et coll., 2007]. La « séquestration » de *Borrelia* dans de tels sites représente pour la bactérie un mécanisme purement « physique » d'échappement à la réponse immunitaire [Embers et coll., 2004]. De façon tout à fait similaire, la matrice extracellulaire et les cellules de la peau (mais aussi des autres organes) dans lesquelles *Borrelia* est susceptible de pénétrer pourraient constituer un véritable refuge, à l'abri des défenses immunitaires de l'hôte.

Les adhésines de *Borrelia*, dont le rôle dans les interactions entre la bactérie et la matrice extracellulaire a été discuté plus haut, pourraient participer à ce type de mécanismes d'échappement, avec par exemple :

— la liaison à la décorine (résultant en un recouvrement de *Borrelia* par des antigènes du soi) et la capacité de la décorine à inhiber l'action du complément [Krumdieck et coll., 1992] et du TGF- β [Yamaguchi et coll., 1990], offrant une protection locale à *Borrelia* [Liang et coll., 2004a] ;

— la sécrétion de Bgp dans les espaces extracellulaires pouvant constituer un véritable « leurre antigénique » [Cluss et coll., 2004].

¹³⁹ Tpr : *Treponema pallidum repeat*. La protéine TprK est une protéine de la membrane externe de *T. pallidum*, elle induit une réponse humorale et cellulaire et représente une cible des anticorps opsonisants.

¹⁴⁰ Msp : *major surface protein*. La protéine Msp2 est une protéine membranaire de *Anaplasma marginale*.

Borrelia pourrait ainsi trouver dans la matrice extracellulaire et ses interactions avec les molécules qui la compose, un microenvironnement protégé de la réponse immunitaire de l'hôte, propice à la persistance de la bactérie dans les tissus cibles infectés et favorisant le développement des manifestations tardives chroniques de la borréliose de Lyme [Liang et coll., 2004a; Cabello et coll., 2007].

La phagocytose de *Borrelia* par les cellules de la lignée mono/macrophagique [Montgomery et coll., 1993, 1994; Sambri et coll., 1996], ou par d'autres cellules immunitaires spécialisées comme les polynucléaires neutrophiles [Szczepanski et coll., 1988; Suhonen et coll., 1998], représente un axe important des défenses immunitaires mises en place pour lutter contre l'infection. La conséquence de cette phagocytose est bien entendu la destruction de la bactérie et la réduction de l'inoculum bactérien ; mais la phagocytose de *Borrelia*, par la production de cytokines pro-inflammatoires qu'elle induit, contribue également de façon plus globale à l'activation de la réponse immunitaire générée contre la bactérie [Moore et coll., 2007; Cruz et coll., 2008]. Cependant, même dans ces cellules phagocytaires professionnelles, la survie intracellulaire d'une faible proportion des *Borrelia* phagocytées a été observée [Montgomery et coll., 1993]¹⁴¹. De plus, l'internalisation et la survie intracellulaire de *Borrelia* dans plusieurs types cellulaires non phagocytaires d'origine humaine ont été démontrées *in vitro* : ces données concernent les cellules endothéliales [Ma et coll., 1991; Wu et coll., 2011], les lymphocytes T et B [Dorward et coll., 1997], les cellules neuronales et gliales [Livengood et coll., 2006], et les fibroblastes cutanés [Klempner et coll., 1993; Wu et coll., 2011] ainsi que les synoviocytes [Girschick et coll., 1996]¹⁴². Dans ces deux derniers types cellulaires, une survie intracellulaire d'une durée respective de quatre [Wu et coll., 2011] et huit semaines [Girschick et coll., 1996] a été observée. Par ailleurs, une

¹⁴¹ Mais dans cette étude, la durée de cette survie n'a été évaluée que jusqu'à 24 heures après l'infection cellulaire.

¹⁴² Les synoviocytes sont des cellules fibroblastiques spécialisées des membranes synoviales.

localisation intracellulaire de *Borrelia* dans des synoviocytes isolés d'un patient atteint d'une arthrite de Lyme a également été démontrée *in vivo* [Chary-Valckenaere et coll., 1998]. De façon similaire à la protection relative offerte par les cellules endothéliales [Brouqui et coll., 1996] et les fibroblastes cutanés [Georgilis et coll., 1992] [Wu et coll., 2011] contre l'effet borrelicide d'antibiotiques à faible pénétration intracellulaire, ces cellules (par la localisation et la possibilité d'une survie intracellulaire prolongée qu'elles procurent à *Borrelia*) pourraient également constituer pour la bactérie un sanctuaire à l'abri des défenses immunitaires de l'hôte.

La possibilité de transformation kystique des *Borrelia* (et de réversion des formes kystiques en formes mobiles) constitue potentiellement encore un autre mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. La crédibilité de cette possibilité repose essentiellement sur des observations *in vitro* ou chez l'animal [Brorson et coll., 1997, 1998; Alban et coll., 2000; Gruntar et coll., 2001; Miklossy et coll., 2008].

Enfin, si les différents mécanismes « physiques » potentiels d'échappement de *Borrelia* à la réponse immunitaire (et à l'action des traitements antibiotiques) évoqués ci-dessus pourraient représenter une hypothèse alternative séduisante pour expliquer la survenue de certaines manifestations tardives chroniques de la maladie, leur persistance, voire les échecs cliniques de traitements antibiotiques chez certains patients¹⁴³, cette hypothèse contribue malheureusement aussi à alimenter l'argumentaire de certains groupes de patients (et de praticiens) défendant de façon inconditionnelle l'existence d'un « syndrome post-Lyme » et les liens entre la symptomatologie fonctionnelle qui y est rattachée et une infection persistante « occulte » potentielle à *Borrelia* (pour une revue critique du syndrome post-Lyme et de l'attitude clinique raisonnable à adopter, voire respectivement [Feder et coll., 2007] et [Puechal et coll., 2009]). Notons par ailleurs qu'aucune étude scientifique crédible n'a jusqu'à

¹⁴³ Les « vrais » échecs cliniques d'une antibiothérapie bien conduite dans la borréliose de Lyme sont rares.

présent pu démontrer formellement que l'existence des formes kystiques et/ou intracellulaires de *Borrelia* observées *in vitro* puisse avoir une conséquence clinique réelle sur l'évolution naturelle de la maladie chez l'homme ou son évolution après traitement antibiotique.

Contribution de la salive de tique aux mécanismes d'échappement de *Borrelia*

La salive de tique et ses composants exercent, à des degrés divers, des effets immunomodulateurs portant à la fois sur la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte : ces effets ont une importance capitale pour les pathogènes transmis par les tiques, car ils favorisent l'établissement de l'infection chez l'hôte vertébré [Wikel, 1999]. Si la modulation des réponses immunitaires induite par la salive de tique, rapportée dans un grand nombre d'études (voir chapitre « Activité anti-inflammatoire de la salive et modulation de la réponse immunitaire innée », page 66), semble intuitivement profitable aux *Borrelia* transmises, l'impact réel de la salive de tique sur la transmission, l'initiation de l'infection par *Borrelia*, ou encore sa dissémination, n'a été analysé que par un nombre plus restreint d'études. Les effets de la salive de tique sur l'immunité de l'hôte semblent le plus souvent se cumuler avec les mécanismes d'échappement développés par *Borrelia* pour se prémunir de celle-ci.

Plusieurs études réalisées sur modèle murin ont démontré que la salive de tique accentue la virulence de *Borrelia* : elle augmente la bactériémie et induit une apparition précoce de *B. afzelii* dans le tissu vésical [Pechova et coll., 2002] ; elle favorise également la multiplication cutanée locale (au site d'injection) et la dissémination par voie hématogène de *B. burgdorferi* ss [Zeidner et coll., 2002; Machackova et coll., 2006] et de *B. lusitaniae* [Zeidner et coll., 2002] ; elle est enfin capable de restaurer la virulence d'une souche de *B. burgdorferi* ss faiblement pathogène [Adusumilli et coll., 2010]. Les résultats de notre propre équipe montrent que la présence de la salive de tique (inoculée dans la peau de souris de façon préalable à l'injection des spirochètes) inhibe fortement la réponse inflammatoire locale induite par *Borrelia* [Kern et coll., 2011]. Si les résultats de ces quelques études

indiquent de façon concordante que la salive de tique augmente l'infectivité de *Borrelia*, il est cependant important de noter que cette capacité de la salive de tique est dépendante de la nature du couple *Borrelia*/tique : certaines espèces de tique ont un effet bénéfique plus marqué pour certaines espèces de *Borrelia* [Zeidner et coll., 2002] (ces données témoignent par ailleurs des capacités importantes d'adaptation du pathogène à son vecteur). Il est également très important de noter que les modifications de la réponse immunitaire (mise en place de la réponse immunitaire adaptative « anti-tique ») induite par des piqûres de tiques successives peut conduire à une résistance acquise aux piqûres de tique et aux pathogènes qu'elles transmettent. L'équipe de Piesman et coll. a montré que des souris préalablement infestées par des larves naïves d'*I. scapularis* présentent une résistance acquise à la transmission de *Borrelia* par une nouvelle piqûre de tique [Wikel et coll., 1997], Nazario et coll. ont obtenu des résultats similaires chez le cobaye [Nazario et coll., 1998], et une étude clinique rétrospective a également montré que des personnes préalablement exposées à des piqûres de tique répétées et présentant une réponse inflammatoire locale marquée aux piqûres de tique ont un risque réduit de contracter la borréliose de Lyme [Burke et coll., 2005].

Les effets de plusieurs protéines sur l'activité du complément (comme les protéines Isac, Irac, IxAC ou encore Salp20) sont maintenant bien connus, et les données concernant leur impact sur l'infection par *Borrelia* sont disponibles pour quelques-unes d'entre elles. Par exemple, l'inhibition de la synthèse de la protéine **Isac** (par ARN interférence) entraîne une diminution de la charge bactérienne dans la salive de tique, mais cette diminution est insuffisante pour bloquer la transmission de *Borrelia*, ce qui semble indiquer une faible contribution de la protéine Isac dans l'établissement de l'infection cutanée initiale [Soares et coll., 2005]. La protéine **Salp20** semble protéger par ailleurs de façon efficace *B. garinii* des effets bactéricides du complément *in vitro* [Tyson et coll., 2007].

De plus, la salive de tique module les fonctions de plusieurs composantes cellulaires de l'immunité. Il est par exemple établi que la salive d'*I. scapularis* inhibe la capacité des polynucléaires neutrophiles à adhérer *in vitro* aux *Borrelia* [Montgomery et coll., 2004] et à phagocyter la bactérie [Ribeiro et coll., 1990]. Il a été également montré que l'immunisation de souris par les protéines **ISL-929/1373** réduit la charge bactérienne observée dans la peau et les articulations¹⁴⁴, ce qui indique un rôle facilitateur de ces deux protéines (capables d'inhiber la fonction des polynucléaires neutrophiles) dans l'infection initiale et la dissémination de *Borrelia* [Guo et coll., 2009]. En outre, la protéine **Bip**, dont l'activité immunosuppressive sur les lymphocytes B a été mise en évidence, inhibe très fortement la prolifération lymphocytaire B induite *in vitro* par les protéines OspA et OspC : ces données indiquent un rôle potentiel de la protéine Bip dans la protection initiale de *Borrelia* contre la réponse immunitaire de l'hôte au niveau du site de la piqûre de tique [Hannier et coll., 2004]. Enfin, des travaux récents (réalisés *in vivo* sur modèle murin) ont montré que la **sialostatine L2** (dont la sécrétion salivaire est fortement induite par le repas sanguin et dont la contribution à la réussite du repas sanguin est essentielle) favorise la multiplication locale de *Borrelia* au site d'injection cutanée¹⁴⁵, indiquant un rôle facilitateur de la sialostatine L2 dans l'initiation de l'infection [Kotsyfakis et coll., 2010].

Concernant maintenant le cas particulier de la protéine **Salp15**, celle-ci est tellement liée à la « stratégie » utilisée par *Borrelia* pour se prémunir du système immunitaire de l'hôte, qu'on pourrait considérer que ses effets sont plus synergiques qu'additifs avec les mécanismes d'échappement développés par la bactérie. La synthèse de Salp15 est induite par le gorgement, et cette synthèse est encore un peu plus induite chez la tique infectée par *Borrelia* que chez la tique non infectée [Ramamoorthi et coll., 2005]. Nous avons déjà évoqué

¹⁴⁴ Dans cette étude, la réduction de la charge bactérienne chez les souris immunisées a été observée dans la peau 7, 14 et 21 jours après l'infection, et à 21 jours dans l'articulation.

¹⁴⁵ Dans cette étude, la charge bactérienne a été observée dans la peau 4 jours après l'injection de *Borrelia*.

plus haut les travaux de Ramamoorthi et coll., qui ont montré l'existence d'une interaction forte et spécifique entre Salp15 et OspC : l'interaction étroite entre *Borrelia* et Salp15 dans les glandes salivaires d'*I. scapularis* permet de protéger directement la bactérie contre l'effet bactéricide des anticorps neutralisants de l'hôte et d'augmenter l'infectivité des *Borrelia* injectées dans la peau [Ramamoorthi et coll., 2005]. Des résultats similaires ont été obtenus avec un analogue de Salp15 chez la tique *I. ricinus* (Salp15 Iric-1) [Hovius et coll., 2007; Hovius et coll., 2008b]. L'interaction entre *Borrelia* et Salp15 permet aussi d'inhiber le dépôt des composés de la voie terminale du complément – C5b, C6, C7, C8 et C9 – (qui constituent le complexe d'attaque membranaire) à la surface de la bactérie, la protégeant ainsi de la lyse médiée par le complément [Schuijt et coll., 2008]. *Borrelia* profite enfin de façon indirecte des effets immunosuppresseurs pléiotropes de Salp15 induits localement au niveau du site de la piqûre de tique, et notamment de l'inhibition des lymphocytes CD4⁺ (interaction de Salp15 avec le co-récepteur CD4) [Anguita et coll., 2002; Garg et coll., 2006; Juncadella et coll., 2007], et des cellules dendritiques (interaction de Salp15 avec le récepteur DC-SIGN) [Hovius et coll., 2008a].

Enfin, si les effets immunomodulateurs locaux induits par la salive de tique facilitent bien la transmission de *Borrelia*, il en va de même pour d'autres pathogènes transmis par les tiques [Nuttall et coll., 2004], comme le virus TBE¹⁴⁶ responsable de l'encéphalite à tique [Fialova et coll., 2010] ou *Francisella tularensis* responsable de la tularémie [Krocova et coll., 2003]. Les effets immunomodulateurs de la salive d'autres arthropodes (moustiques, mouches) favorisent également la transmission de pathogènes [Titus et coll., 2006], comme les arbovirus (virus de la dengue, virus West-Nile, virus du Chikungunya) [Schneider et coll., 2008; Thangamani et coll., 2010], ou les leishmanies [Andrade et coll., 2007].

¹⁴⁶ TBE virus : *tick-borne encephalitis virus*.

PRÉSENTATION DU PROJET

1 CONTEXTE GÉNÉRAL

La peau représente une interface majeure pour les pathogènes transmis par les tiques ainsi que par d'autres arthropodes [Frischknecht, 2007]. Elle est une cible privilégiée de l'infection par *B. burgdorferi* si – agent de la borréliose de Lyme –, et ce à toutes les phases possibles de l'évolution de la maladie. Le pathogène est inoculé dans la peau avec la salive de tique, puis s'y multiplie avant de disséminer (ou non) par voie hématogène. La peau est donc à la fois le premier site de l'infection, le point de départ des manifestations disséminées, mais également le siège de manifestations tardives chroniques de la maladie. De plus, l'interface cutanée ne constitue pas qu'une cible de l'infection à *Borrelia* : les interactions que ses éléments structuraux, ses cellules résidentes et ses défenses immunitaires entretiennent avec la bactérie font potentiellement aussi du tissu cutané un acteur à part entière du développement de l'infection et de l'issue qu'elle prend chez un individu donné. Dans la triade – hôte, pathogène, vecteur – de la borréliose de Lyme, la salive de tique a probablement un rôle essentiel dans la transmission vectorielle car elle augmente la pathogénicité de *Borrelia* et possède un effet immunosuppresseur sur l'immunité adaptative et sur l'immunité innée de l'hôte. À ce titre, la borréliose de Lyme constitue un excellent modèle pour l'étude de l'immunité cutanée.

2 PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

Une des thématiques principales de notre équipe de recherche est l'étude de l'immunité innée cutanée – et plus généralement de l'interface cutanée – dans la transmission des *Borrelia* responsables de la maladie de Lyme. Dans cette thématique, une attention particulière est portée à l'impact de la salive de tique sur l'inflammation cutanée et le développement précoce de la maladie, puisque c'est bien par l'intermédiaire de celle-ci que *Borrelia* est inoculée de façon naturelle dans la peau de l'hôte (humain ou animal). Au laboratoire, deux approches parallèles ont été développées : l'une sur un modèle *in vitro* de cultures cellulaires humaines primaires, et l'autre sur un modèle *in vivo* murin. Le travail réalisé sur le modèle *in vitro* fait l'objet des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse ; ils viennent compléter et approfondir les résultats précédemment obtenus sur ce modèle, ainsi que les résultats récents obtenus sur le modèle *in vivo* murin (voir les travaux de thèse correspondants [Marchal, 2009; Kern, 2011]). Le travail de thèse présenté ici porte plus précisément sur l'étude *in vitro* de la réponse qu'induit *Borrelia* sur les deux principales cellules résidentes de la peau, que sont respectivement les kératinocytes dans l'épiderme et les fibroblastes dans le derme.

Dans une première étude, nous avons travaillé sur des cultures de kératinocytes humains primaires. Nous avons analysé la réponse inflammatoire induite par *Borrelia*, en portant plus particulièrement notre attention sur les peptides antimicrobiens sécrétés par les kératinocytes en réponse à l'infection par la bactérie. Nous avons cherché à déterminer quelle lipoprotéine de surface était impliquée dans la stimulation des kératinocytes, et à préciser l'impact de la salive de tique (et en particulier de la protéine « phare » de la salive de tique Salp15) dans ce système expérimental.

Dans la seconde étude, nous avons travaillé sur des cultures de fibroblastes dermiques humains primaires. Nous avons analysé et comparé les réponses transcriptionnelles des

fibroblastes induites par des souches bactériennes représentatives de différentes étapes du cycle infectieux de *Borrelia*. Nous avons aussi cherché à déterminer si les réponses transcriptionnelles observées étaient liées à la même protéine de surface que celle induisant la stimulation des kératinocytes, et si la salive de tique y produisait les mêmes effets.

Les kératinocytes, puis les fibroblastes sont parmi les premières cellules que *Borrelia* rencontre chez l'homme ; de plus l'environnement cutané local au moment de la transmission est lui-même considérablement modifié par la présence initiale de la salive de tique à l'endroit du point de piqûre et par l'action mécanique des pièces piqueuses (hypostome et chélicères) qui dilacèrent localement la peau. Par conséquent, les résultats obtenus grâce à l'approche expérimentale utilisée dans notre modèle *in vitro* (en présence ou en absence de salive de tique ou de sa protéine Salp15) apportent des connaissances nouvelles sur le rôle des kératinocytes et des fibroblastes dans la physiopathologie de la borréliose de Lyme.

ARTICLE 1

Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease

Claire Marchal, Frédéric Schramm, Aurélie Kern, Benjamin Luft, Xiaohua Yang, Tim Schuijt,

Joppe Hovius, Benoît Jaulhac, Nathalie Boulanger

INFECTION and IMMUNITY, Février 2011

Le rôle de l'immunité innée de la peau lors de la transmission de *Borrelia* avait déjà fait l'objet d'un premier travail de recherche dans notre laboratoire. Ce travail montrait d'une part que la stimulation *in vitro* de kératinocytes humains primaires par *Borrelia* induit la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (IL-8 et hBD-2), et d'autre part que cette synthèse est inhibée par la présence d'extraits salivaires de tique [Marchal et coll., 2009].

Dans le travail présenté ci-après, nous avons cherché à déterminer si deux des principales lipoprotéines de surface de *Borrelia* – OspA et OspC – sont impliquées dans la stimulation des kératinocytes, et si la protéine de salive de tique Salp15 est responsable des effets inhibiteurs qu'induit de façon globale la salive de tique sur la réponse pro-inflammatoire des kératinocytes. Les principales techniques que nous avons utilisées dans cette étude pour mesurer la réponse des kératinocytes sont la détermination semi-quantitative par PCR des transcrits générés, et la détermination quantitative par ELISA des protéines synthétisées.

Dans cette étude, nous montrons que l'induction de la réponse pro-inflammatoire des kératinocytes par *Borrelia* est – comme nous le supposions – bien liée aux lipoprotéines de surface OspA mais aussi et surtout OspC (majoritaire au moment de la transmission). Par ailleurs, le panel des gènes pro-inflammatoires étudiés a été étendu et nous montrons que l'expression de plusieurs chimiokines (IL-8 et MCP-1) et peptides antimicrobiens (hBD-2,

hBD-3, LL-37, psoriasine et RNase7), induite par *Borrelia* ou sa lipoprotéine de surface OspC, est inhibée par la protéine Salp15.

Nous émettons l'hypothèse que l'inhibition qu'exerce la salive de tique sur l'expression des chimiokines et des peptides antimicrobiens (dont la fonction « alarmine » a été évoquée plus haut) générée par les kératinocytes en réponse à l'infection par *Borrelia*, constitue un véritable **effet « antialarmine » de la salive de tique**, propice à la multiplication cutanée initiale de *Borrelia*, puis à sa dissémination ultérieure par voie hématogène.

Antialarmin Effect of Tick Saliva during the Transmission of Lyme Disease[∇]

Claire Marchal,¹ Frederic Schramm,¹ Aurélie Kern,¹ Benjamin J. Luft,² Xiaohua Yang,² Tim Schuijt,³ Joppe Hovius,³ Benoît Jaulhac,^{1†*} and Nathalie Boulanger^{1‡}

EA 4438, Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France¹; Stony Brook University, Division of Infectious Diseases, Stony Brook, New York 11794-8153²; and Department of Internal Medicine, Center for Experimental and Molecular Medicine (CEMM), Center for Infection and Immunity (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam 1105 AZ, Netherlands³

Received 30 April 2010/Returned for modification 4 June 2010/Accepted 22 November 2010

Tick saliva has potent immunomodulatory properties. In arthropod-borne diseases, this effect is largely used by microorganisms to increase their pathogenicity and to evade host immune responses. We show that in Lyme borreliosis, tick salivary gland extract and a tick saliva protein, Salp15, inhibit *in vitro* keratinocyte inflammation induced by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto or by the major outer surface lipoprotein of *Borrelia*, OspC. Chemokines (interleukin-8 [IL-8] and monocyte chemoattractant protein 1 [MCP-1]) and several antimicrobial peptides (defensins, cathelicidin, psoriasin, and RNase 7) were downregulated. Interestingly, antimicrobial peptides (AMPs) transiently inhibited bacterial motility but did not kill the organisms when tested *in vitro*. We conclude that tick saliva affects the chemotactic properties of chemokines and AMPs on immune cells and has an antialarmin effect on human primary keratinocytes. Alarmins are mediators that mobilize and activate antigen-presenting cells. Inhibition of cutaneous innate immunity and of the migration of immune cells to the site of the tick bite ensures a favorable environment for *Borrelia*. The bacterium can then multiply locally and, subsequently, disseminate to the target organs, including joints, heart, and the central nervous system.

The cutaneous interface is a key locus in arthropod-borne diseases (14). To analyze the role of resident cells of the skin in the development of such diseases and to study the potential effect of tick saliva on the inflammatory response of human keratinocytes (KCs), we investigated Lyme borreliosis, a zoonosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmitted by *Ixodes* ticks. Lyme borreliosis occurs throughout the Northern hemisphere and differs in clinical features according to the geographic distribution of the different species of *Borrelia* that cause Lyme disease. In the United States, for example, Lyme disease is caused by *B. burgdorferi* sensu stricto and transmitted by *Ixodes scapularis*, and its main clinical sign is arthritis. In Europe, the disease is transmitted by *Ixodes ricinus*, with three major *Borrelia* species being responsible for different clinical symptoms: *B. burgdorferi* sensu stricto (arthritic signs), *B. afzelii* (dermatological signs), and *B. garinii* (neurological signs) (46).

Among arthropod vehicles for pathogens, the saliva from insects and ticks increases the pathogenicity of transmitted microorganisms. This has been well documented for sandflies infected with the flagellate parasite *Leishmania* and for ticks infected with *Borrelia* spp. (1, 49, 50). In Lyme disease models, injection of *Borrelia* together with salivary gland extract (SGE) increased the dissemination and number of bacteria in mice (37, 55), underscoring the importance of tick saliva in the transmission of the bacteria (51). As a blood-sucking arthropod, the tick stays on its host for a period of 3 to 10 days and

therefore must modulate vertebrate host immune responses to avoid rejection (13). Ticks act directly on the host's adaptive immunity by downregulating T-cell proliferation (17).

In recent years, studies have been directed toward analyzing the means by which ticks act on innate immunity. A variety of proteins have been identified in tick saliva that inactivate the complement-mediated immune response or modify the oxidative burst of macrophages (8). A pluripotent protein, Salp15, present in both *I. scapularis* and *I. ricinus* during engorgement (24), has been identified as a protective protein for *B. burgdorferi*. Salp15 inhibits T-cell proliferation (2) and dendritic cell activation (25) and protects *Borrelia* from complement- and antibody-mediated killing by the host (26, 38).

Before the blood meal, bacteria primarily produce OspA, which functions as a ligand for the tick gut receptor TROSPA (35). Once ticks start feeding on the vertebrate host, spirochetes present in the gut migrate to the salivary glands. During this migration, *Borrelia* cells are subject to major antigenic modifications: OspA is downregulated, whereas OspC is upregulated (31). Two to 3 days after tick attachment, spirochetes present in the salivary glands are injected into the vertebrate host. OspC is essential for *Borrelia* transmission from the tick to the host and for the multiplication and dissemination of *Borrelia* in the vertebrate host (19). These *Borrelia* lipoproteins encompass specific patterns called "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs), which have the capability to stimulate antigen-presenting cells (APCs) via Toll-like receptors (TLRs). The receptor TLR2 forms a heterodimer with TLR1 to recognize triacylated lipopeptides corresponding to *B. burgdorferi* sensu lato lipoproteins (20, 22, 43). This interaction leads to the induction of different inflammatory chemokines and cytokines. Antimicrobial peptides (AMPs) are also an im-

* Corresponding author. Mailing address: EA 4438, Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. Phone: 33 3 90 24 37 80. Fax: 33 3 88 25 11 13. E-mail: benoit.jaulhac@medecine.u-strasbg.fr.

† B.J. and N.B. contributed equally to the paper.

∇ Published ahead of print on 6 December 2010.

portant part of a vertebrate's innate immunity (6) and play a role in the control of several skin infections (33, 41).

We have previously shown that the interaction of *B. burgdorferi* sensu stricto with human primary KCs induces the secretion of interleukin-8 (IL-8) and human β -defensin 2 (hBD-2). It is noteworthy that IL-8 secretion was repressed by crude *I. ricinus* salivary gland extracts (SGE) (29). In the present study, we analyzed more precisely whether the major surface lipoprotein of *Borrelia*, OspC, might be responsible for KC inflammation. We investigated additional molecules that may be induced during KC inflammation and their possible repression by tick SGE and Salp15 protein. The two major AMPs of the skin, hBD-2 and LL-37, were tested *in vitro* on *B. burgdorferi* and shown to have a transient effect on the bacteria. We conclude from these experiments that tick saliva can inhibit AMPs considered as "alarmin molecules" and chemokines (34, 54) secreted by KCs in the skin, thus inhibiting cellular signaling and trafficking and facilitating *Borrelia* transmission, multiplication, and dissemination in the vertebrate host.

MATERIALS AND METHODS

Spirochetes. *B. burgdorferi* strains N40, B31, and 297 were cultured in BSK-H medium (Sigma) at 33°C 4 days before the assay. Prior to *in vitro* infection of the cells, bacteria were washed twice by centrifugation for 30 min at $5,000 \times g$ at 20°C. Bacteria were used between passages 5 and 8. The virulence of the *Borrelia* strain was evaluated by transmission to the mice and to the ticks. *B. burgdorferi* strain 297 and the OspC-deficient mutant have been described previously (36).

***Borrelia* proteins and other inducers.** The surface proteins, lipidated OspA and OspC (L-OspA and L-OspC), were cloned and purified from *B. burgdorferi* sensu stricto B31 as previously described (4). They were purified and eluted in 20 mM Tris-Cl (pH 7.5)–0.3% Triton X-100. These proteins were diluted and used at a concentration of 100 ng/ml. The truncated unlipidated OspA (amino acids [aa] 17 to 273) and unlipidated OspC (aa 19 to 210) of *B. burgdorferi* sensu stricto B31 were used at a concentration of 100 ng/ml. The triacylated lipopeptide Pam₃CSK₄ (Pam₃Cys-EMC Microcollections, Deutschland GmbH) was used at 10 μ g/ml. MALP2 (macrophage-activating lipopeptide from *Mycoplasma fermentans*) was used as an agonist of Toll-like receptor 2 (TLR2) (Axxora, Deutschland GmbH) at a concentration of 200 ng/ml, as described by Schaubert et al. (40). The anti-human TLR2 blocking antibody was used at 1.5 μ g/ml (eBioscience, Ltd., United Kingdom) and incubated for 30 min at room temperature on KCs. OspC was then added, and the sample was further incubated for 6 h.

Tick salivary glands and Salp15. *I. ricinus* originally came from a tick colony in Neuchâtel, Switzerland, and was maintained in Strasbourg, France. For tick salivary gland extract (SGE) isolation, adult ticks were allowed to feed on mice for 3 days. Collected ticks were first washed in ethanol and then in phosphate-buffered saline (PBS), and salivary glands (SGs) were dissected in PBS under a light microscope. The SGE was frozen and thawed three times and centrifuged for 10 min at $10,000 \times g$. The supernatant was kept frozen at -80°C until use. After protein determination (Bio-Rad), an equivalent of one tick SG (around 20 μ g/ml) was used to study its effect on the modulation of inflammation. Salp15 from *I. ricinus*, cloned and purified from cultured *Drosophila melanogaster* S2 cells as described by Hovius et al. (25), was used at a concentration of 30 μ g/ml. In the inhibitory assays, Salp15 was preincubated with *Borrelia* or lipidated OspC for 30 min before the interaction with KCs. All recombinant proteins were tested by the *Limulus* assay to check for the presence of endotoxins and were found to contain <0.3 endotoxin unit for each concentration of recombinant protein tested.

Cell culture of keratinocytes and stimulation. Human epidermal KCs (Promocell, Germany) were maintained in KGM2 (Promocell) medium with a calcium concentration of 0.15 mM. To stimulate the cells, KCs were seeded at 7.5×10^4 per well in a 24-well plate. At confluence, the calcium concentration was increased to 1.5 mM to induce KC differentiation. Cells were stimulated with different concentrations of *B. burgdorferi* (multiplicity of infection [MOI] of 100:1 or 10:1). KCs were used at passages 3 to 5. For the assays with tick SGE or with Salp15, *B. burgdorferi* was preincubated for 30 min with the tick compounds at room temperature, and the preparation was then transferred on cells and further incubated for 6 or 24 h. To measure the induction of LL-37, KCs were preincubated for 24 h with 25 nM vitamin D₃ (Cayman Chemical, MI) prior to the

addition of *B. burgdorferi* or the lipoproteins. Before collection of uninfected or infected cells in Trizol, the viability of cells was checked under an inverted microscope and with Trypan blue staining. The presence of *Borrelia* had no effect on KC viability.

ELISA. To measure IL-8 and hBD-2 secreted by KCs, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed on supernatants of nonactivated and activated cells. Protocols were based on sandwich techniques, as described by the manufacturers: R&D (France) for IL-8 and Preprotech Ec (London, United Kingdom) for hBD-2.

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR. Supernatants were removed and KCs were directly suspended in Trizol (Invitrogen) for extraction of total RNA according to the manufacturer's protocol. After treatment with DNase (Ambion), 2 μ g of total RNA was reverse transcribed with the Superscript II first-strand synthesis system (Invitrogen). Quantitative reverse transcription (qRT)-PCR was done on a LightCycler system 2.0 (Roche, Meylan, France). The primers used are described in Table 1. For quantification of transcript abundance in cells, target gene expression was normalized to the β -actin gene and compared with that of untreated cells.

Antimicrobial assay. hBD-2 (Innovagen, Sweden) and LL-37 were selected as the two most representative AMPs of the skin. LL-37 was synthesized by solid-phase 9-fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc) chemistry. The assay was performed according to a modified technique described by Lusitani et al. (28). Briefly, *in vitro* culture of *B. burgdorferi* sensu stricto N40 was propagated in BSK medium to logarithmic phase and was washed by centrifugation with Hanks' balanced salt solution for 10 min at $3,000 \times g$ at 25°C. The spirochetes were counted under dark-field microscopy and resuspended at the concentration of 5×10^6 *Borrelia* cells/ml. Bacteria were distributed in a microtiter plate at a concentration of 2.5×10^5 /well. AMPs were resuspended in sterile distilled water, and 10 μ l of serial dilutions was distributed in each well (range, 100 μ M to 0.2 μ M). The sample was incubated for 3 and 24 h at 33°C in a microtiter plate. *Borrelia* cells with AMPs or amoxicillin were then transferred in 5-ml tubes with 3 ml of BSK medium for an additional week. For each time point of the kinetics experiments, 10 μ l of bacterial suspension was observed under dark-field microscopy for assessment of *Borrelia* motility and number. Amoxicillin (Sigma) was used as a positive control with serial dilutions from 25 μ g/ml to 0.05 μ g/ml.

Statistics. Each experiment involving cell stimulation with bacteria was carried out at least three times in independent trials. The results are presented as means \pm standard deviations (SDs) and were analyzed by Student's *t* test. Differences in values are considered significant at $P < 0.05$. For ELISAs, the data are the means \pm SDs of triplicate values and are representative of three independent experiments ($P < 0.001$, $P < 0.01$, and $P < 0.05$). For qRT-PCR, the values are normalized to the negative control (medium alone) and shown as the fold number of the control's value. The means \pm SDs of three experiments' values were compared between stimulated and unstimulated cells ($P < 0.001$, $P < 0.01$, and $P < 0.05$).

RESULTS

Inhibition of keratinocyte inflammation induced by lipidated outer surface proteins from tick salivary gland extract.

We showed previously that *B. burgdorferi* sensu stricto N40 induced a strong inflammatory response when coincubated with human primary KCs. This response was inhibited by SGE of *I. ricinus* (29). We then studied whether OspC (47, 48), the major surface antigen of *Borrelia* of importance for transmission to the vertebrate host, could be responsible for this inflammation. Because the lipidated Osp antigens we tested were from a different bacterial strain, *B. burgdorferi* sensu stricto B31, we first tested whether the N40 and B31 strains behave similarly in our *in vitro* assay. These studies showed that both *Borrelia* strains induced the chemokine IL-8 and the AMP hBD-2 with the same intensity at all bacterial concentrations tested (Fig. 1A and B).

We then tested whether *Borrelia* lipoproteins were responsible for the KC inflammation induced by whole bacteria. When inoculated by ticks, the outer coats of *Borrelia* cells are primarily covered by OspC, while OspA is repressed. We performed this study at two separate time points as these specific

TABLE 1. Primers used for the quantitative RT-PCR

| Primer type | Sequence | Source or reference |
|--------------|---|------------------------|
| Actin | | |
| Forward | 5' CGT CAC CAA CTG GGA CGA CA 3' | Designed in this study |
| Reverse | 5' GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA 3' | |
| Cathelicidin | | |
| Forward | 5' CTA GAG GGA GGC AGA CA 3' | 15 |
| Reverse | 5' GCG GTA GAG GTT AGC AT 3' | |
| hBD-2 | | |
| Forward | 5' ATC TCC TCT TCT CGT TCC TC 3' | 42 |
| Reverse | 5' ACC TTC TAG GGC AAA AGA CT 3' | |
| hBD-3 | | |
| Forward | 5' CTT CTG TTT GCT TTG CTC TTC C 3' | 9 |
| Reverse | 5' CCT CTG ACT CTG CAA TAA TA 3' | |
| Psoriasis | | |
| Forward | 5' AGA CGT GAT GAC AAG ATT GAC 3' | 18 |
| Reverse | 5' TGT CCT TTT TCT CAA AGA CGT C 3' | |
| RNase 7 | | |
| Forward | 5' GGA GTC ACA GCA CGA AGA CCA 3' | 21 |
| Reverse | 5' CAT GGC TGA GTT GCA TGC TTG 3' | |
| IL-8 | | |
| Forward | 5' TCT GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA GTT 3' | Designed in this study |
| Reverse | 5' AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC CTT 3' | |
| MCP-1 | | |
| Forward | 5' CGC CTC CAG CAT GAA AGT CT 3' | 56 |
| Reverse | 5' GGA ATG AAG GTG GCT GCT ATG 3' | |

proinflammatory genes are induced at different times during inflammation. Thus, peak secretion of IL-8 occurs at 24 h, while hBD-2 is secreted at greater amounts from 6 to 24 h of incubation (Fig. 1C and D). These studies showed that lipidated OspC (L-OspC) induced a greater inflammatory response than lipidated OspA (L-OspA). In contrast, unlipidated OspA and OspC exhibited reduced inflammatory responses compared with lipidated OspA and OspC, clearly indicating that the lipid moiety also plays an important role in inflammation. In fact, the lipid moiety alone, Pam₃Cys, was shown to induce inflammation. This KC inflammatory response induced by lipidated OspA and OspC is strongly inhibited by tick SGE when KCs are coincubated with lipidated OspC or OspA. The hBD-2 secretion induced by lipidated OspA and OspC is inhibited 60 to 80% by tick SGE at 24 h. IL-8 secretion stimulated by lipidated OspA and OspC is almost 100% inhibited by tick SGE (Fig. 1E and F).

Salp15 inhibition of chemokine and AMP expression by human primary keratinocytes coincubated with whole *Borrelia* cells. OspC binds to Salp15, thereby facilitating immune evasion by *Borrelia* spp. (38). To analyze its involvement in skin inflammation, we coincubated Salp15 with whole *B. burgdorferi* sensu stricto N40 cells and measured the inhibition of gene expression for proinflammatory chemokines. We found that Salp15 inhibited not only the mRNA expression of two chemokines, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and IL-8 (Fig. 2A and B), but also the expression of the AMPs (hBD-2, hBD-3, RNase 7, and psoriasis) (Fig. 2C to F). Measurements were made at 6 h, as AMPs generally exert their

peak activity during the early stages of inflammation (29). The inflammation induced by *B. burgdorferi* was strongly impaired by the presence of Salp15 no matter which inflammatory gene we assessed at the two *Borrelia* concentrations tested—100 *Borrelia* cells (100B) per cell and 10 *Borrelia* cells (10B) per cell. The presence of Salp15 similarly decreased concentrations of the two proteins tested, IL-8 and hBD-2 (Fig. 2G and H).

Salp15 inhibition of chemokine and AMP expression by human primary KCs coincubated with OspC. The fact that lipidated OspC-induced inflammation is inhibited by crude SGE prompted us to determine whether the tick saliva protein Salp15 could be responsible for the inhibition of KC inflammation normally induced by OspC. In fact, we found that chemokines (MCP-1 and IL-8) and AMPs (hBD-2, hBD-3, RNase 7, and psoriasis) were strongly inhibited by Salp15 of *I. ricinus* at the mRNA level (Fig. 3A to F) and also at the protein level for the two proteins tested, IL-8 and hBD-2 (Fig. 3G and H). Unlipidated OspC stimulation, as well as stimulation by the lipid moiety alone, was inhibited by Salp15, showing that both the lipid and protein components of OspC are important for the interaction with Salp15.

Effect of vitamin D₃ on the induction of LL-37 during the interaction of *Borrelia*-KCs and effect of tick SGE or Salp15 on this induction. We have previously shown that the interaction of KCs with *B. burgdorferi* induces hBD-2, although we could not detect mRNA expression of LL-37, whose regulation seems to be more complex than that of the other AMPs (40). We then tested whether the addition of vitamin D₃ to our assays affects the secretion of LL-37 or other AMPs, such as

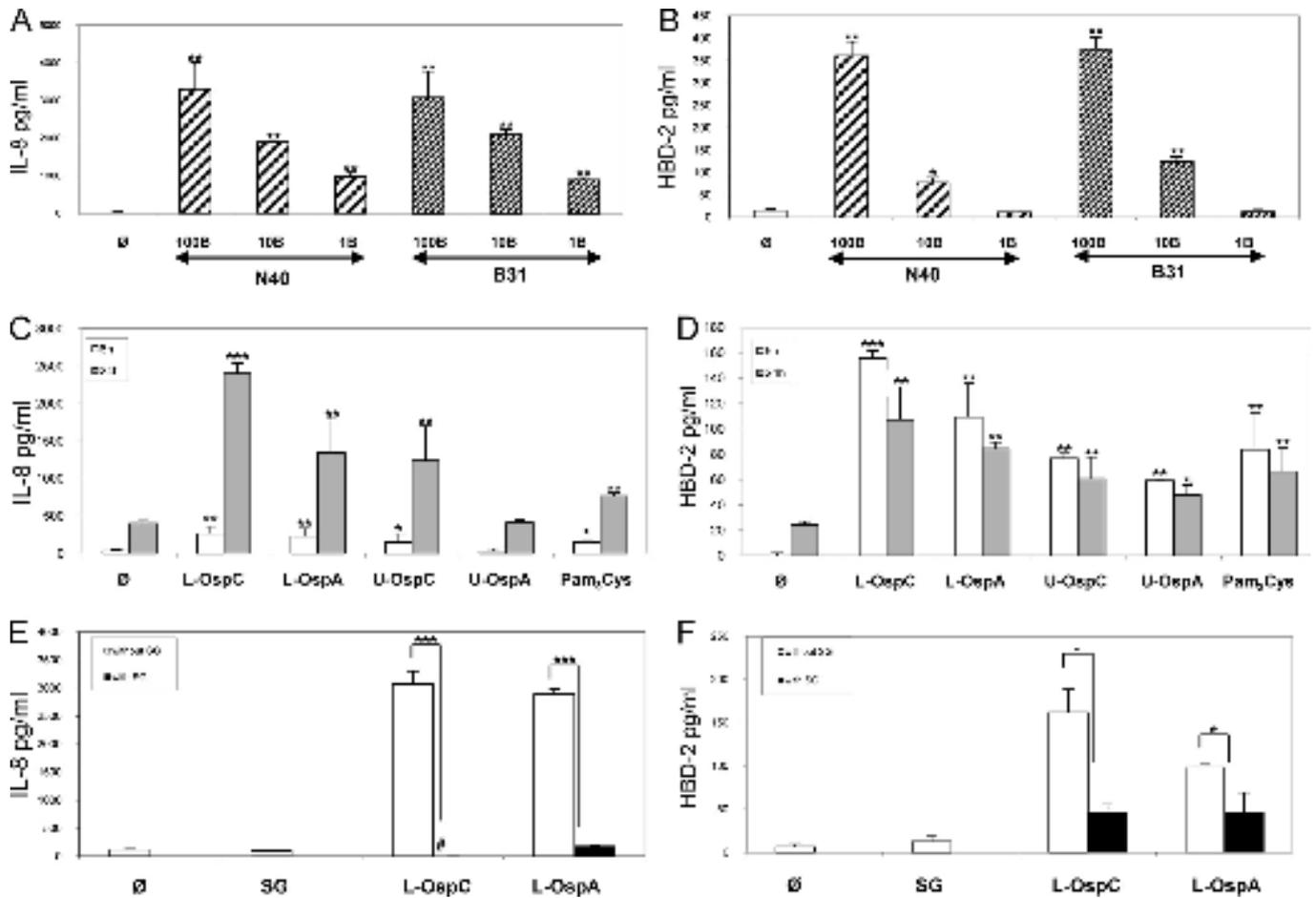


FIG. 1. Interaction of two *B. burgdorferi* sensu stricto strains, N40 and B31, and of Osp antigens with human primary keratinocytes (KCs). The secretion of two proteins, the chemokine IL-8, and the AMP hBD-2, was measured by ELISA. (A and B) Comparison of the inflammatory responses of KCs induced by *B. burgdorferi* strains N40 and B31 for 24 h. Results from titration of *Borrelia* are shown as follows: 100 *Borrelia* cells/cell (100B), MOI of 100:1; 10B, MOI of 10:1; and 1B, MOI of 1:1. (C and D) Inflammatory response of KCs stimulated with lipitated (L-) OspC or OspA or unlipitated (U-) OspC or OspA for 6 and 24 h at a concentration of 100 ng/ml and Pam₃Cys at a concentration of 10 μ g/ml. (E and F) Inhibition by *I. ricinus* crude salivary gland extract (SG; 20 μ g/ml) of the inflammation induced by the lipitated OspC or OspA, measured at 24 h. #, complete inhibition; ϕ , unstimulated cells; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; and *, $P < 0.05$.

IL-8. We found that in the presence of vitamin D₃, secretion of LL-37 was induced with different numbers of *Borrelia* cells cocultured with KCs (Fig. 4A). It is clear that vitamin D₃ specifically regulated LL-37 induction, but not IL-8 secretion (Fig. 4B). We also found that LL-37 induction was strongly inhibited by tick SGE or Salp15 (Fig. 4C), which is similar to our results for the other inflammatory genes.

In vitro effect of hBD-2 and cathelicidin on the motility of *B. burgdorferi* N40. AMPs have potent antimicrobial activity on a large panel of microorganisms (bacteria, fungi, viruses, and parasites). We tested the antiborrelial activities of the two AMPs most frequently found in several skin inflammations, human cathelicidin (LL-37) and human defensin (hBD-2) (6), through a kinetic study. We examined cultures after 3 h, 24 h, and 7 days under a dark-field microscope to observe the motility, number, and viability of *Borrelia* cells when cultured in the presence or absence of AMPs or an antibiotic. The effect of the two AMPs was compared to the effect of amoxicillin, the positive control, which completely killed *Borrelia* after 7 days, starting at a low concentration of 1.56 μ g/ml. Defensin had a

very slight effect at 24 h, with 80% of *Borrelia* cells motile. Interestingly, LL-37 severely altered spirochetes, with only 10% of *Borrelia* cells motile after 3 h and 24 h, and induced bacterial clumps at the highest AMP concentrations tested (Fig. 5). The effects of both AMPs disappeared after 7 days, when 100% *Borrelia* motility was observed.

Effect of SGE and Salp15 on the interaction between TLR2 and OspC. OspC, as a lipoprotein, interacts with TLR2 (13). To further analyze the interaction of OspC with Salp15, we used another TLR2 agonist, MALP2. MALP2 induced the chemokine mRNAs (MCP-1 and IL-8) and the AMP (hBD-2, hBD-3, psoriasin, and RNase 7) mRNAs, as well as IL-8 and hBD-2 proteins (Fig. 6). KC inflammation induced by MALP2 was not as strong as the inflammation induced by OspC. Both tick SGE and Salp15 strongly inhibited the KC inflammation induced by OspC but did not inhibit chemokine or AMP production induced by MALP2-TLR2 interaction, further suggesting that the observed inhibitory effects of KC inflammation are due to interactions of OspC with SGE or OspC with Salp15.

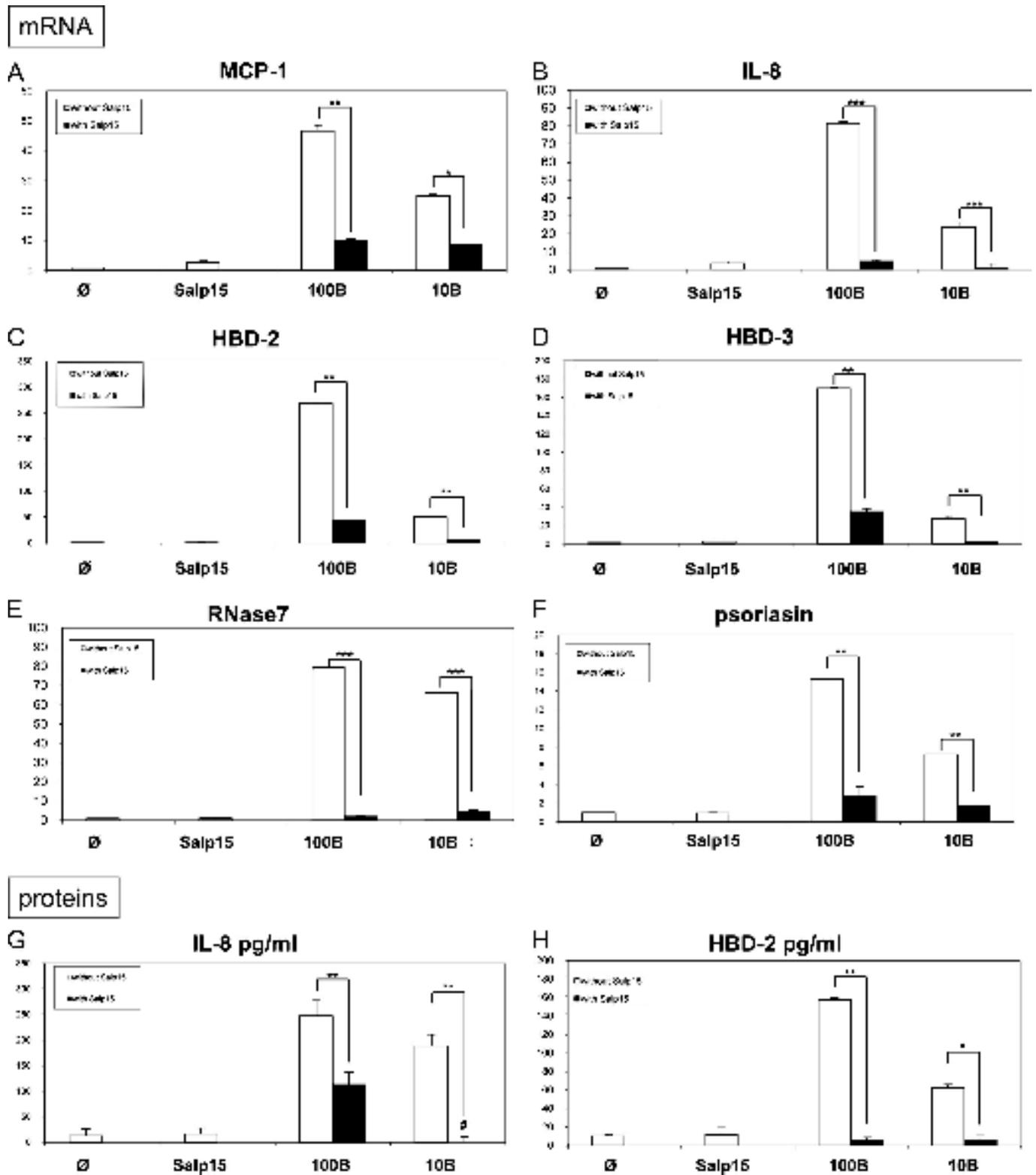


FIG. 2. Inhibition by *I. ricinus* Salp15 protein of KC inflammation induced by *B. burgdorferi* sensu stricto N40 strain at 6 h. Shown are the results from measurement by quantitative RT-PCR of the inhibition of mRNA of chemokines MCP-1 (A) and IL-8 (B) and AMPs hBD-2 (C), hBD-3 (D), RNase 7 (E), and psoriasin (F) by Salp15 (30 μ g/ml). Panels G and H show measurement by ELISA of the secretion of two selected inflammatory molecules, IL-8 (G) and hBD-2 (H). 100B, 100 *Borrelia* cells per cell; 10B, 10 *Borrelia* cells per cell. #, complete inhibition; ϕ , unstimulated cells; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; and *, $P < 0.05$.

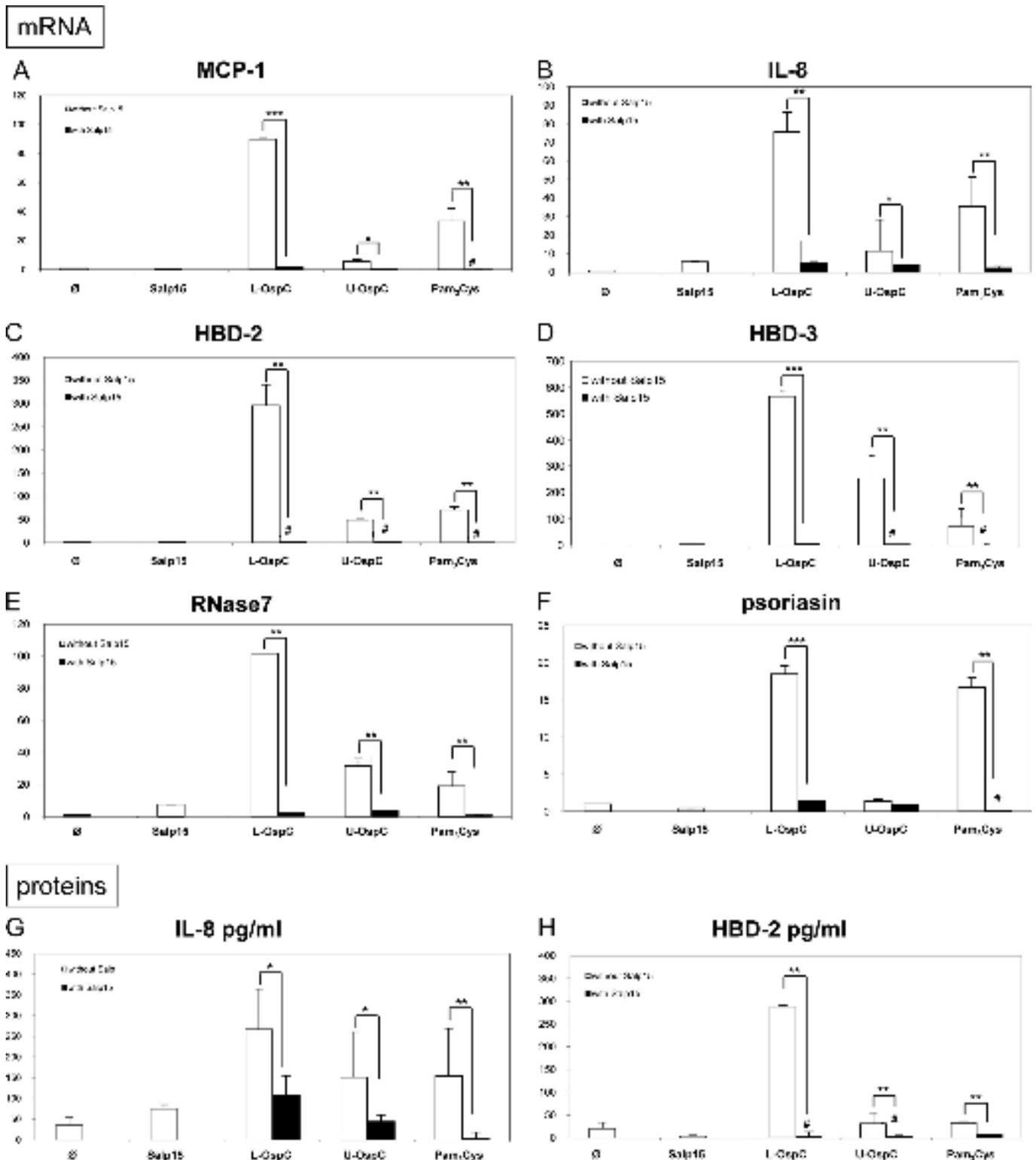


FIG. 3. Inhibition by Salp15 of *I. ricinus* of KC inflammation induced by *Borrelia* lipoproteins at 6 h. Shown are the results from measurement by quantitative RT-PCR of the inhibition of mRNAs of chemokines MCP-1 (A) and IL-8 (B) and AMPs hBD-2 (C), hBD-3 (D), RNase7 (E), and psoriasis (F) by Salp15 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Panels G and H show measurement by ELISA of the secretion of two selected inflammatory molecules, IL-8 (G) and hBD-2 (H). Lipidated (L-) and unlipidated (U-) OspC proteins were tested at 100 ng/ml, Pam₃Cys at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and Salp15 at 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. #, complete inhibition; φ, unstimulated cells; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; and *, $P < 0.05$.

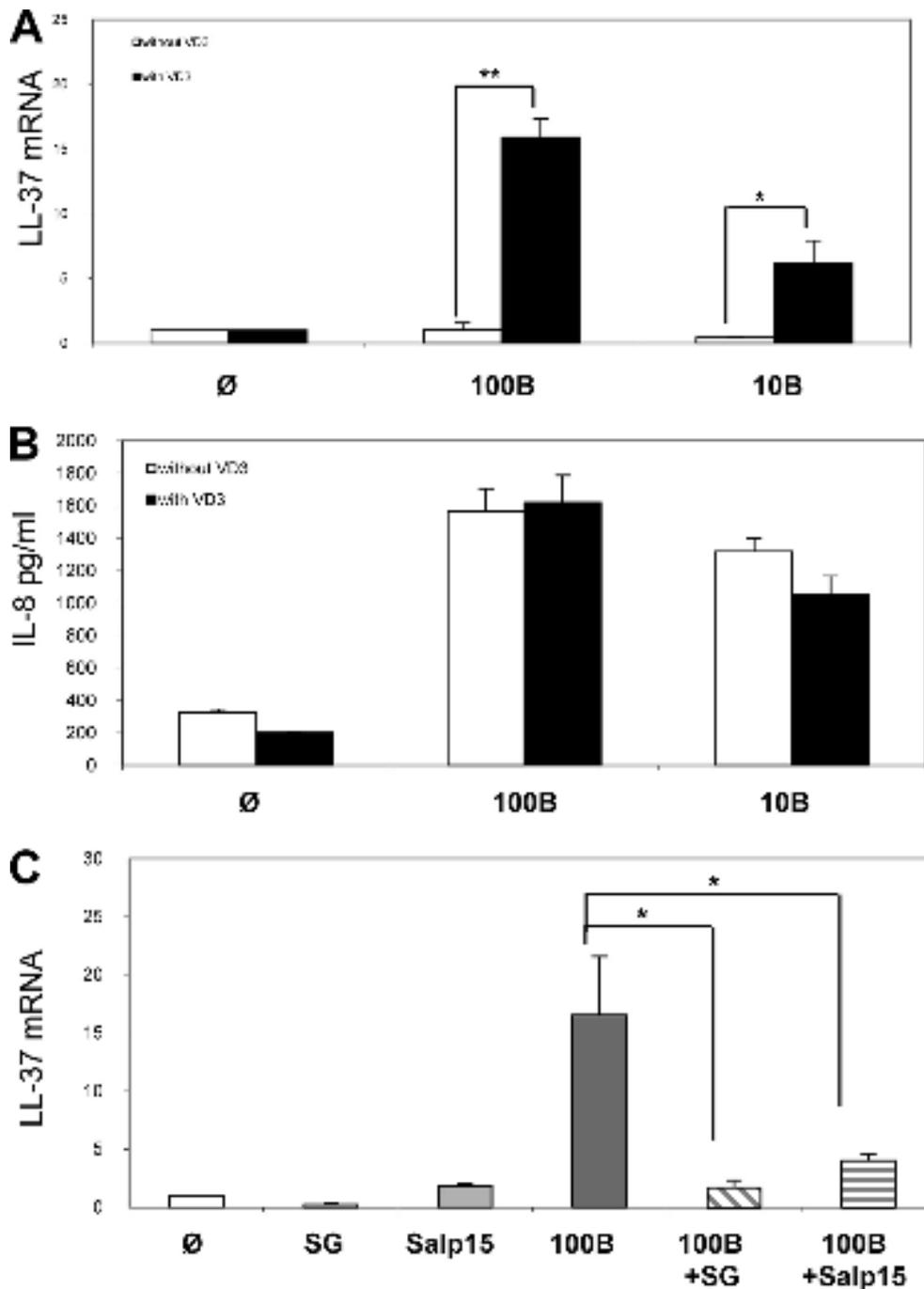


FIG. 4. Effect of vitamin D₃ on induction of LL-37 secreted by KCs. Human primary KCs were preincubated with vitamin D₃ (VD3) for 24 h. Cells were then stimulated for 24 h with *B. burgdorferi* N40 at two concentrations: 100 *Borrelia* cells per cell (100B) and 10 *Borrelia* cells per cell (10B). The induction of LL-37 was measured by qRT-PCR (A), and the induction of IL-8 was measured by ELISA (B). The inhibition of LL-37 induction by KCs with crude extract salivary gland (SG) or with Salp15 was measured (C). ∅, unstimulated cells; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; and *, $P < 0.05$.

Role of OspC in *Borrelia* KC inflammation. In order to measure the importance of OspC in KC inflammation, we tested a knockout *Borrelia* strain (297 ko) without the OspC protein, comparing the potential of its OspC (297 cp) and that of the wild-type strain *B. burgdorferi* sensu stricto 297 (36) to induce IL-8 secretion. The 297 ko strain stimulated IL-8 secretion at 65% of the level stimulated by wild-type strain 297

bacteria, while the complemented strain 297 cp stimulated secretion at 91% of the wild-type level (Fig. 7A). The reduction of inflammation by OspC protein suggests that OspC is an important surface antigen for *Borrelia* KC inflammation. The results also suggest that some other surface antigens are involved in KC inflammation. Interestingly, in the presence of SGE and Salp15, the secretion of IL-8 caused by the OspC

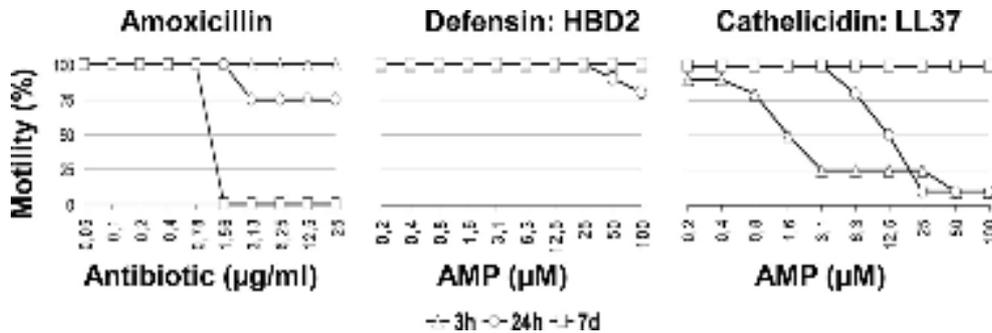


FIG. 5. *In vitro* effect of hBD-2 and LL-37 on *B. burgdorferi* sensu stricto motility. Measurement of the activity of hBD-2 (defensin) and LL-37 (human cathelicidin) on the motility of *B. burgdorferi* N40 strain. *Borrelia* cells were cultured together with the tested molecule in microtiter plates for 3 and 24 h and then transferred in 3-ml tubes for an additional 7 days. Amoxicillin was used as a positive control. Motility of bacteria was measured by observation of *Borrelia* under dark-field microscopy at a 200-fold magnification.

mutant still decreased. This suggests that OspC is not the only molecule of *Borrelia* to interact with tick proteins and that Salp15 and SGE may have additional receptors, either on the bacteria or on the host cell, to control host inflammation.

We also compared the inhibitory effects of Salp15 and anti-TLR2 antibody on the interaction of OspC with TLR2. Salp15 has a potent inhibitory effect on OspC, with 62% of IL-8 secretion inhibited, while the blocking antibody inhibited only 21% of IL-8 secretion. A titration of the antibody up to 10 µg/ml and a longer incubation (24 h) did not increase further the inhibitory level in our model (data not shown).

DISCUSSION

KCs are the resident skin cells of the epidermis, acting as a physical barrier and as an immune barrier by detecting pathogens and by producing several AMPs, chemokines, and cytokines (6). They express functional Toll-like receptors (TLRs), except TLR7 and TLR8, which recognize a broad spectrum of PAMPs, leading to the activation of the NF-κB pathway. KCs are the main producers of cytokines and chemokines in the skin. Some of these are potent chemoattractants for monocytes, neutrophils, dendritic cells (DCs), T cells, and NK cells (27). Their ability to discriminate among stimuli by generating different patterns of antimicrobial molecules makes KCs important immune cells of skin's innate immunity (30, 44). The function of Langerhans cells is highly influenced by surrounding KCs (3), as the Langerhans cells become activated by inflammatory cytokines derived from KCs. We have previously shown that the interaction of *B. burgdorferi* sensu stricto with human primary KCs induced a strong inflammatory response that is inhibited by crude SGE of *I. ricinus*. This pointed out the major role of KCs in an arthropod-borne disease such as Lyme borreliosis.

The inhibition of KC inflammation by tick saliva was previously shown to affect the secretion of IL-8 and hBD-2 (29). We extended the panel of inflammatory molecules studied because the skin expresses several different chemokines and AMPs, of which chemokines have been shown to play an important role in the inflammation induced in Lyme disease (20). Different chemokine-binding proteins have been identified in tick saliva (11, 32) that are neutralized by the saliva, thus avoiding the recruitment of specific immune cells that would kill the inoc-

ulated pathogens. In addition to the inhibition of chemokines, we have demonstrated that the AMPs hBD-2, hBD-3, cathelicidin, psoriasin, and RNase 7 are also inhibited by tick saliva. We selected RNase7 and psoriasin because they are produced by KCs and have potent antimicrobial activity, especially on Gram-positive bacteria (RNase 7) and on *Escherichia coli* (psoriasin) (39). hBD-2 and hBD-3 are induced differently (45) and also exhibit different antimicrobial activities: hBD-2 has its greatest activity against Gram-negative bacteria, while hBD-3 exhibits a much larger spectrum of antibacterial activity.

In earlier studies, we did not observe the secretion of LL-37 in our model of interaction between KCs and *Borrelia* (29). That lack of secretion was surprising as LL-37 is involved in numerous cutaneous inflammations (6, 40). Because vitamin D₃ enables KCs to recognize pathogens through TLR2, leading to cathelicidin production (40), we preincubated *Borrelia* with vitamin D₃ and observed the induction of LL-37. We then measured the effects of hBD-2 and LL-37, the two most-described AMPs in skin inflammations, on *Borrelia*. In our *in vitro* studies, we found that LL-37 has significant antimicrobial activity (90% decrease in *Borrelia* motility) against *B. burgdorferi* sensu stricto during the first 24 h, which suggests LL-37 is very fast and effective at inhibition of *Borrelia*. In contrast to LL-37, we found that hBD-2 had almost no antimicrobial activity against *B. burgdorferi* sensu stricto. Studies by other investigators have shown that hBD-2 also has no activity against *Treponema denticola* (7) and that *B. burgdorferi* is resistant to high levels of LL-37 (39). In our assay, LL-37 transiently affected *Borrelia* motility, with numerous clumps of bacteria observed in the first hours of incubation, but this effect did not last after a week of incubation.

AMPs are multifunctional molecules that play a central role in several cutaneous inflammations. They neutralize toxins released by bacteria, have potent chemotactic activity, and have angiogenic properties (6, 41). Their overexpression avoids infections in psoriasis, and their absence explains certain infections in atopic dermatitis (33). Our data revealed a potent anti-inflammatory effect of tick saliva on AMPs and chemokines present in the skin. This observation in an *in vitro* model merits further investigation in an *in vivo* mouse model.

Another key element in the transmission of *Borrelia* to the vertebrate host is OspC, the major surface antigen of *Borrelia*. Studies with OspC mutant spirochetes have shown that this

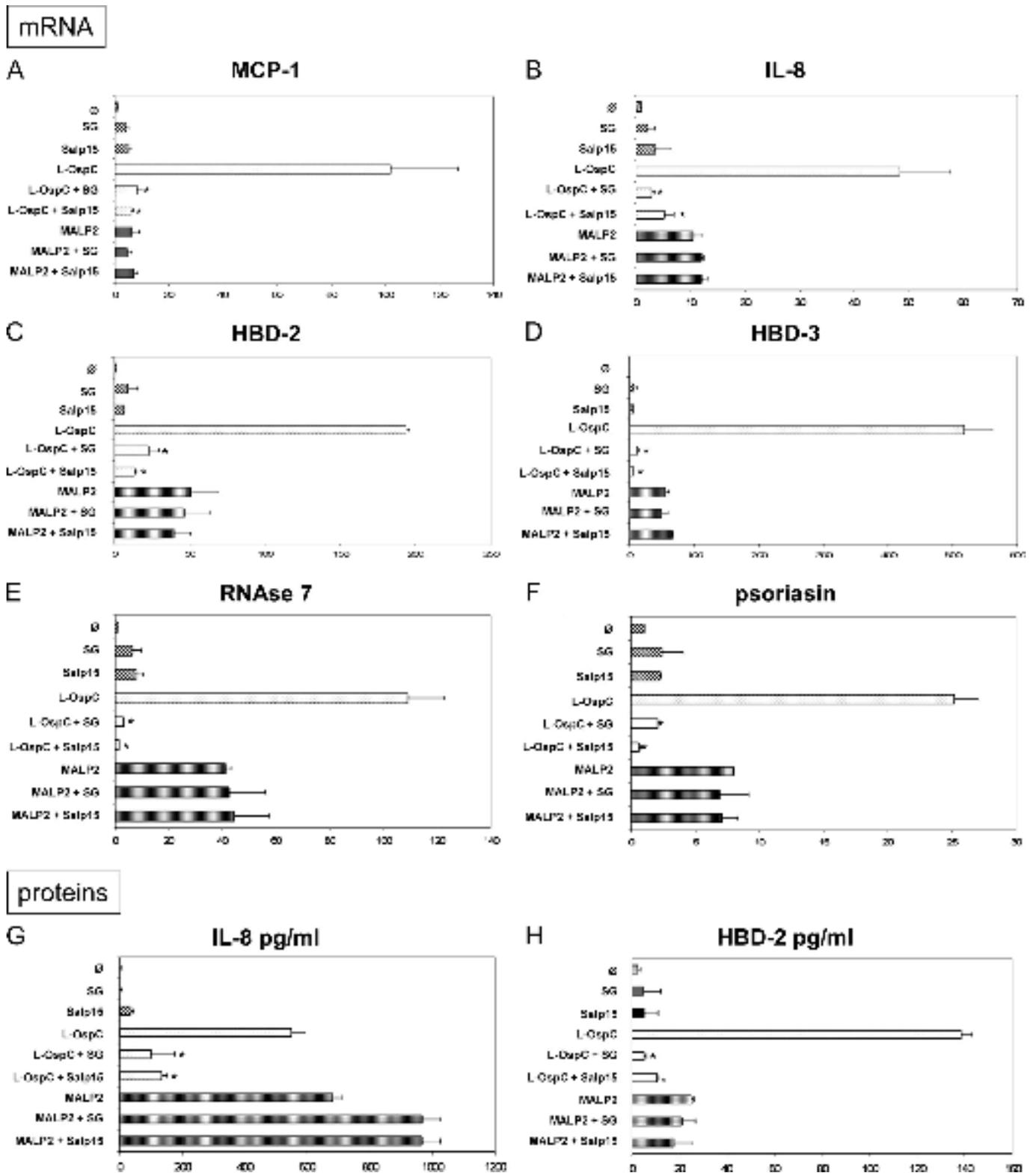


FIG. 6. Analysis of OspC-Salp15 interaction during KC inflammation. The two TLR-2 agonists, lipitated OspC (L-OspC; 100 ng/ml) and MALP2 (200 ng/ml), were first incubated with salivary gland extract (SG; 20 μ g/ml) or Salp15 (30 μ g/ml) for 30 min at room temperature. The preparations were then transferred onto human primary KCs and incubated for 6 h. ϕ , unstimulated cells; *, statistically significant versus L-OspC; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; and *, $P < 0.05$.

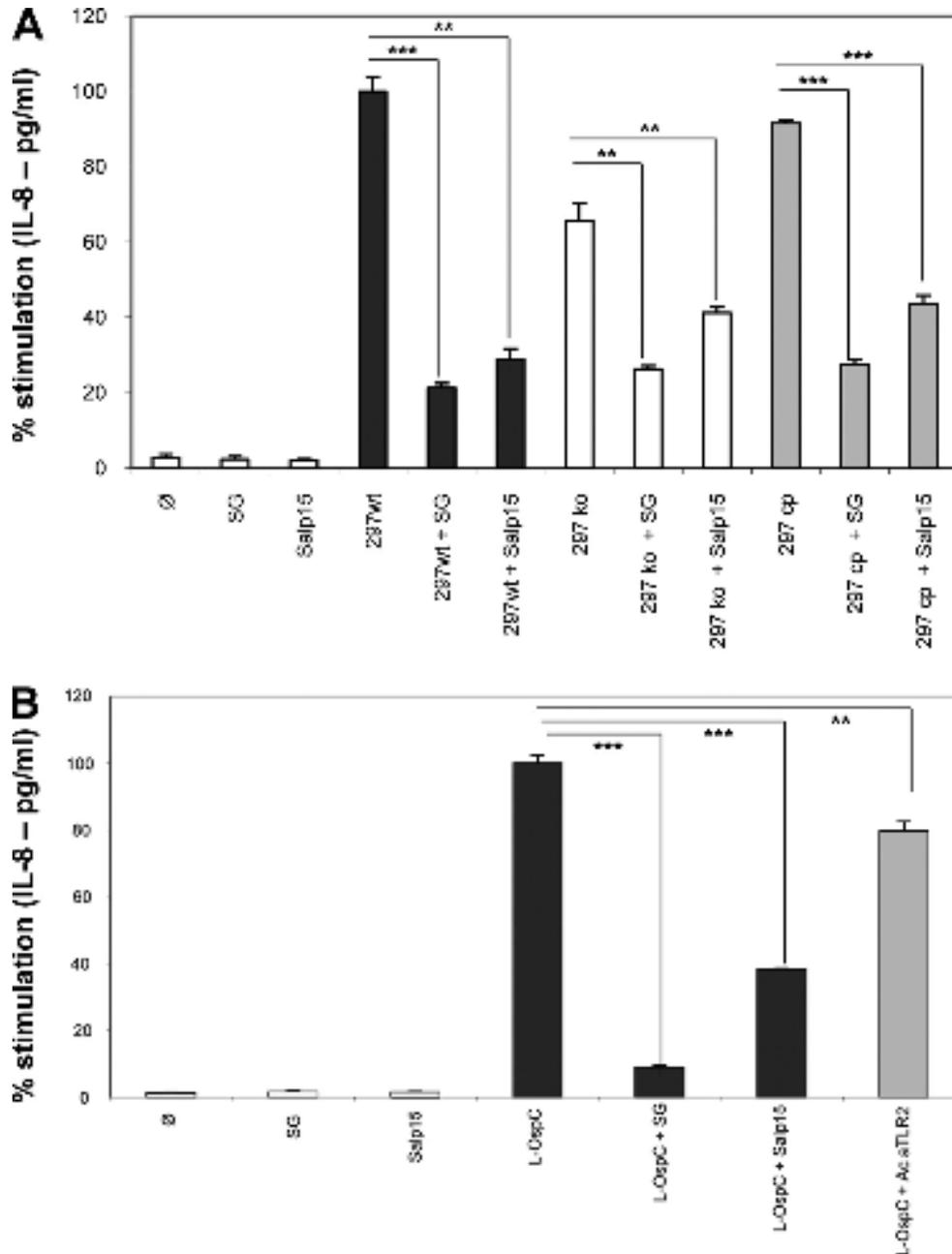


FIG. 7. Roles of OspC and Salp15 in KC inflammation. (A) The inflammation (IL-8 secretion in pg/ml) induced by the OspC-deficient mutant (297 ko) was compared to the inflammation induced by the native strain (297 wt) and complemented strain (297 cp). The *Borrelia* cell/cell ratio was 100:1, and the incubation was for 24 h. SG (20 μ g/ml) or Salp15 (30 μ g/ml) was preincubated with *Borrelia* for 30 min at room temperature and then transferred onto KCs. (B) The inhibitory effect of Salp15 on OspC-induced KC inflammation was compared to the blocking effect of an antibody against TLR2. SG and Salp15 were preincubated with L-OspC for 30 min and then transferred onto KCs and further incubated for 6 h. The antibody against TLR2 (Ac aTLR2; 1.5 μ g/ml) was incubated for 30 min on KCs, and then the lipidated OspC (L-OspC; 100 ng/ml) was added for 6 h. The level of inhibition was compared to the inhibitory effect of SG (20 μ g/ml) or Salp15 (30 μ g/ml). ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; and *, $P < 0.05$.

lipoprotein is essential to spirochetal evasion of the host's innate immunity (19, 31, 47). OspC prevents early elimination and promotes dissemination (48). In this study, we showed that OspC is a key element in the induction of KC inflammation and that its lipid moiety, Pam₃Cys, is as essential as the protein component in this inflammation. As the tick has been shown to downregulate host immunity, thus facilitating transmission of

B. burgdorferi, we tested whether crude SGE and Salp15 can inhibit the inflammatory response of KCs. Our studies demonstrated that SGE inhibited both inflammations: that induced by whole *Borrelia* cells (29) and that induced by OspC. In tick saliva, Salp15 is a protein specifically induced by *Borrelia* when it enters the tick during the infective blood meal (36). It is a pluripotent protein: it affects T-cell proliferation by binding to

the CD4 coreceptor, inhibits dendritic cell activation by binding to the C-type lectin DC-SIGN, and binds to OspC, protecting *Borrelia* from antibody-mediated killing (2, 25, 36). In this study, we observed that Salp15 also inhibits KC inflammation.

The OspC lipoprotein is a ligand for TLR2 (43). Initially, the recognition of *Borrelia* by TLR2 was thought to be mainly due to OspA (22). We have shown that OspC is an important part of the skin inflammation through its interaction with the resident cells of the epidermis, the KCs. The interaction of OspC with tick SGE or with Salp15 is crucial, since the coinubation with another TLR2 agonist, MALP2 (40), did not modify KC inflammation. The interaction of OspC with its receptor is complex, since it interacts as a homodimer with its ligand, and recently a ligand binding domain has been described as being essential for OspC for its adaptation to the mammalian environment (12). However, as shown in this study, OspC is not the only molecule involved in the inflammation process since the OspC-deficient mutant was still able to produce an immune response. OspC is the most abundant protein expressed on the surface of *Borrelia* during early infection, but this does not exclude that other proteins such as VlsE (variable surface antigen), bbk32 (fibronectin binding protein), or DbpA (decorin binding protein) play a compensatory role in skin inflammation in the absence of OspC (52).

The tick blood meal lasts for several days, and infected ticks do not inoculate *Borrelia* at the beginning of the blood meal. In the infection model for *I. scapularis* with *B. burgdorferi*, the tick inoculates *Borrelia* into the host skin (23) at approximately day 3, while in the model for *I. ricinus* with *B. afzelii*, the transmission occurs earlier (10). During feeding, the tick first dilacerates the epidermis, producing an injury. This injury triggers an inflammatory response with an important secretion of chemokines and AMPs. However, the inhibitory effects of tick saliva may be able to shut down all the danger signals present in the skin before *Borrelia* injection occurs. In the vertebrate host, *Borrelia* cells multiply locally before disseminating via the blood to the rest of the body. The inhibitory effect of tick saliva on chemokines and AMPs helps to explain the absence of cellular infiltrate at the site of a tick bite (5, 50).

We propose that tick saliva has a property not previously described: it exhibits an antialarmin effect. Alarmins are secreted by epithelial cells such as KCs and are triggered by endogenous signals or by PAMPs, called “danger-associated molecular patterns” (DAMPs). They recruit and activate antigen-presenting cells, especially dendritic cells, and boost innate and adaptive immune responses (53). In Lyme borreliosis, alarmins induced first by the injury and then by the bacterial inoculation are likely controlled by tick saliva. This property makes the tick saliva a sophisticated regulator of *Borrelia* infection by acting as a powerful antialarmin and antichemokine factor in the skin (16, 34). Tick saliva is therefore an essential actor in the pathogenesis of skin inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Betschart, University of Neuchâtel, for help with maintaining the tick colony, M. H. Metz-Boutigue for LL-37 synthesis, X. Yang for providing the OspC-deficient *Borrelia* strain, A. Boeuf for technical support, and the REID (Réseau des Interactions Durables) network on ticks for stimulating discussions. We thank Yang Li for editing help.

Claire Marchal was supported by grant 07/908/225 from the Conseil Régional d'Alsace. Aurélie Kern was supported by grant 2009.60.053 from the Conseil Régional d'Alsace and Direction Générale de l'Armement. Part of the research project was supported by the Pasteur Institute, PTR 309 (Programme Transversal de Recherche, Paris, France).

REFERENCES

- Adusumilli, S., C. J. Booth, J. Anguita, and E. Fikrig. 2010. Passage through *Ixodes scapularis* ticks enhances the virulence of a weakly pathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **78**:138–144.
- Anguita, J., et al. 2002. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* **16**:849–859.
- Asahina, A., and K. Tamaki. 2006. Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary? *J. Dermatol. Sci.* **44**:1–9.
- Batsford, S., J. Dunn, and M. Mihatsch. 2004. Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* vary in their ability to induce experimental joint injury. *Arthritis Rheum.* **50**:2360–2369.
- Beaufays, J., et al. 2008. Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS One* **3**:e3987.
- Braff, M. H., and R. L. Gallo. 2006. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**:91–110.
- Brisette, C. A., and S. A. Lukehart. 2007. Mechanisms of decreased susceptibility to beta-defensins by *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* **75**:2307–2315.
- Brossard, M., and S. K. Wikel. 2004. Tick immunobiology. *Parasitology* **129**(Suppl.):S161–S176.
- Chong, K. T., et al. 2006. High level expression of human epithelial beta-defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Virology* **3**:75.
- Crippa, M., O. Rais, and L. Gern. 2002. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2**:3–9.
- Déruez, M., et al. 2008. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* **205**:2019–2031.
- Earnhart, C. G., et al. 2010. Identification of residues within ligand-binding domain 1 (LBD1) of the *Borrelia burgdorferi* OspC protein required for function in the mammalian environment. *Mol. Microbiol.* **76**:393–408.
- Fikrig, E., and S. Narasimhan. 2006. *Borrelia burgdorferi*—traveling incognito? *Microbes Infect.* **8**:1390–1399.
- Frischknecht, F. 2007. The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell. Microbiol.* **9**:1630–1640.
- Frohman, M., et al. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* **272**:15258–15263.
- Gallo, R. L. 2008. Sounding the alarm: multiple functions of host defense peptides. *J. Invest. Dermatol.* **128**:5–6.
- Garg, R., et al. 2006. Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J. Immunol.* **177**:6579–6583.
- Gläser, R., et al. 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* **6**:57–64.
- Grimm, D., et al. 2004. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:3142–3147.
- Guerrou-de-Arellano, M., and B. T. Huber. 2005. Chemokines and Toll-like receptors in Lyme disease pathogenesis. *Trends Mol. Med.* **11**:114–120.
- Harder, J., and J. M. Schröder. 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* **277**:46779–46784.
- Hirschfeld, M., et al. 1999. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**:2382–2386.
- Hojgaard, A., R. J. Eisen, and J. Piesman. 2008. Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.s. during the key third day of feeding by nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **45**:732–736.
- Hovius, J. W., et al. 2008. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog.* **4**:e31.
- Hovius, J. W., et al. 2007. Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**:296–303.
- Hovius, J. W., et al. 2008. Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J. Infect. Dis.* **198**:1189–1197.
- Lebre, M. C., et al. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* **127**:331–341.
- Lusitani, D., S. E. Malawista, and R. R. Montgomery. 2002. *Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components. *J. Infect. Dis.* **185**:797–804.
- Marchal, C. M., et al. 2009. Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the in vitro interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*. *J. Invest. Dermatol.* **129**:2515–2517.

30. Nestle, F. O., P. Di Meglio, J. Z. Qin, and B. J. Nickoloff. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:679–691.
31. Ohnishi, J., J. Piesman, and A. M. de Silva. 2001. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:670–675.
32. Oliveira, C. J., et al. 2008. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int. J. Parasitol.* **38**:705–716.
33. Ong, P. Y., et al. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* **347**:1151–1160.
34. Oppenheim, J. J., P. Tewary, G. de la Rosa, and D. Yang. 2007. Alarmins initiate host defense. *Adv. Exp. Med. Biol.* **601**:185–194.
35. Pal, U., et al. 2004. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* **119**:457–468.
36. Pal, U., et al. 2004. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest.* **113**:220–230.
37. Pechová, J., G. Stěpánová, L. Kovár, and J. Kopecký. 2002. Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitol.* **49**:153–159.
38. Ramamoorthi, N., et al. 2005. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* **436**:573–577.
39. Sarkar, A., et al. 2009. *Borrelia burgdorferi* resistance to a major skin antimicrobial peptide is independent of outer surface lipoprotein content. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:4490–4494.
40. Schaubert, J., et al. 2007. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* **117**:803–811.
41. Schröder, J. M., and J. Harder. 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:469–486.
42. Seo, S. J., S. W. Ahn, C. K. Hong, and B. I. Ro. 2001. Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. *J. Dermatol. Sci.* **27**:183–191.
43. Singh, S. K., and H. J. Girschick. 2006. Toll-like receptors in *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:705–717.
44. Sorensen, O. E., et al. 2003. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* **170**:5583–5589.
45. Sorensen, O. E., et al. 2005. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J. Immunol.* **174**:4870–4879.
46. Steere, A. C., J. Coburn, and L. Glickstein. 2004. The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* **113**:1093–1101.
47. Tilly, K., A. Bestor, M. W. Jewett, and P. Rosa. 2007. Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. *Infect. Immun.* **75**:1517–1519.
48. Tilly, K., et al. 2006. *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect. Immun.* **74**:3554–3564.
49. Titus, R. G., J. V. Bishop, and J. S. Mejia. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.* **28**:131–141.
50. Wikel, S. K. 1999. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int. J. Parasitol.* **29**:851–859.
51. Xu, Q., S. V. Seemanapalli, K. E. Reif, C. R. Brown, and F. T. Liang. 2007. Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. *J. Immunol.* **178**:5109–5115.
52. Xu, Q., K. McShan, and F. T. Liang. 2008. Essential protective role attributed to the surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* against innate defences. *Mol. Microbiol.* **69**:15–29.
53. Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak, and J. J. Oppenheim. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**:291–296.
54. Yang, D., G. de la Rosa, P. Tewary, and J. J. Oppenheim. 2009. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* **30**:531–537.
55. Zeidner, N. S., B. S. Schneider, M. S. Nuncio, L. Gern, and J. Piesman. 2002. Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J. Parasitol.* **88**:1276–1278.
56. Zhao, Z., B. McCloud, R. Fleming, and M. S. Klempner. 2007. *Borrelia burgdorferi*-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**:528–533.

Editor: R. P. Morrison

ARTICLE 2

Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different strains of *B. burgdorferi* ss

Frédéric Schramm, Aurélie Kern, Cathy Barthel, Sophie Nadaud, Nicolas Meyer,

Benoît Jaulhac, Nathalie Boulanger

PloS ONE, Juin 2012

L'étude de l'interaction entre *Borrelia* et les fibroblastes de la peau avait déjà fait l'objet d'un premier travail de recherche dans notre laboratoire. Ce travail montrait que la stimulation *in vitro* de fibroblastes cutanés humains primaires par *Borrelia* induit la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (IL-8, LL-37 et hBD-2) [Marchal et coll., 2009].

De manière à étendre notre champ d'investigation, nous avons choisi dans le travail présenté ci-dessous d'effectuer un *screening* initial large des réponses transcriptionnelles qu'induit *Borrelia* dans les fibroblastes au moyen de puces à ADN. En comparant les profils transcriptionnels induits par différentes souches bactériennes d'une même espèce, mais représentatives d'étapes bien distinctes du cycle infectieux de *Borrelia*, nous avons cherché à mettre en évidence un potentiel « effet souche » qui pourrait influencer le déterminisme évolutif du processus infectieux, dont la variabilité individuelle dans la borréliose de Lyme est observée couramment en pratique clinique. Nous avons aussi cherché à déterminer si la réponse pro-inflammatoire générée par les fibroblastes après stimulation par *Borrelia* était liée à la même protéine de surface (OspC) que celle induisant la stimulation des kératinocytes. Nous avons enfin analysé l'effet de la salive de tique sur notre modèle.

Dans cette étude, nous montrons que la stimulation des fibroblastes par *Borrelia* induit l'activation d'un large panel de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire ainsi que dans

la synthèse et le remodelage de la matrice extracellulaire. Les trois souches de *B. burgdorferi* ss que nous avons testées dans notre modèle – respectivement isolées d’une tique et de lésions cutanées d’érythème migrant et d’ACA – induisent au sein des fibroblastes cutanés humains une réponse transcriptionnelle très similaire : aucune voie d’activation spécifique à l’une de ces souches n’a pu être mise en évidence. Par ailleurs, nous montrons que l’induction de la réponse pro-inflammatoire des fibroblastes par *Borrelia* n’est pas liée à la lipoprotéine de surface OspC. Nous montrons également que la salive de tique exerce *in vitro* un effet toxique direct sur les cultures de fibroblastes, que cet effet est dose-dépendant et de nature protéique mais non lié à la protéine Salp15.

Nous émettons l’hypothèse que l’effet cytotoxique de la salive de tique sur les fibroblastes de la peau (cellules clés du processus de cicatrisation) participe au maintien de la blessure cutanée, favorisant ainsi la poursuite du repas sanguin et l’inoculation des *Borrelia* dans la peau. Néanmoins, la présence de la salive de tique et son effet dans la peau sont limités à la fois dans l’espace (au point de piqûre de tique) et dans le temps (durée du repas sanguin). Ainsi, la réponse transcriptionnelle pro-inflammatoire des fibroblastes que nous avons observée *in vitro* en présence de *Borrelia* (mais en l’absence de salive de tique) est probablement un bon reflet de la réponse *in vivo* des fibroblastes à l’infection par *Borrelia* dans la peau, sur le site même des lésions cutanées inflammatoires de la phase précoce (érythème migrant) ou tardive (ACA) de la maladie.

Microarray Analyses of Inflammation Response of Human Dermal Fibroblasts to Different Strains of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto

Frédéric Schramm¹, Aurélie Kern¹, Cathy Barthel¹, Sophie Nadaud², Nicolas Meyer³, Benoît Jaulhac¹, Nathalie Boulanger^{1*}

1 EA 4438, Physiopathologie et Médecine Translotionnelle, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, 2 INSERM UMR-S 956, UPMC Université Paris 06, Paris, France, 3 Laboratoire de Biostatistique et Informatique Médicale, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Abstract

In Lyme borreliosis, the skin is the key site of bacterial inoculation by the infected tick, and of cutaneous manifestations, erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. We explored the role of fibroblasts, the resident cells of the dermis, in the development of the disease. Using microarray experiments, we compared the inflammation of fibroblasts induced by three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto isolated from different environments and stages of Lyme disease: N40 (tick), Pbre (erythema migrans) and 1408 (acrodermatitis chronica atrophicans). The three strains exhibited a similar profile of inflammation with strong induction of chemokines (CXCL1 and IL-8) and IL-6 cytokine mainly involved in the chemoattraction of immune cells. Molecules such as TNF- α and NF- κ B factors, metalloproteinases (MMP-1, -3 and -12) and superoxide dismutase (SOD2), also described in inflammatory and cellular events, were up-regulated. In addition, we showed that tick salivary gland extracts induce a cytotoxic effect on fibroblasts and that OspC, essential in the transmission of *Borrelia* to the vertebrate host, was not responsible for the secretion of inflammatory molecules by fibroblasts. Tick saliva components could facilitate the early transmission of the disease to the site of injury creating a feeding pit. Later in the development of the disease, *Borrelia* would intensively multiply in the skin and further disseminate to distant organs.

Citation: Schramm F, Kern A, Barthel C, Nadaud S, Meyer N, et al. (2012) Microarray Analyses of Inflammation Response of Human Dermal Fibroblasts to Different Strains of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto. PLoS ONE 7(6): e40046. doi:10.1371/journal.pone.0040046

Editor: Roman Ganta, Kansas State University, United States of America

Received November 29, 2011; Accepted May 31, 2012; Published June 29, 2012

Copyright: © 2012 Schramm et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Aurélie Kern was supported by grant 2009.60.053 from the Conseil Régional d'Alsace and Direction Générale de l'Armement. Part of the research project was supported by the Pasteur Institute, PTR 309 (Programme Transversal de Recherche, Paris, France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* Email: nboulanger@unistra.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Lyme borreliosis (LB) caused by spirochetes of the *B. burgdorferi* s group is the most common vector-borne disease in the Northern Hemisphere. These bacteria are transmitted by the tick *Ixodes* spp. [1]. LB is a multisystemic infection that starts generally with an erythema migrans (EM) lesion at the site of the tick bite. Untreated, the infection can progress and disseminate, with inflammatory complications commonly affecting distant skin sites, joints, heart, and nervous system [2]. LB differs in clinical features based upon its geographic distribution and in relation to its pathogenic potential and/or tissue tropism [3].

The skin represents a key interface in LB since it is the target of the spirochetes at the early stage of the disease, the EM and at later stages of the disease, the borrelial lymphocytoma and a typical manifestation of late European LB, the acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) [4,5]. The skin constitutes a complex physical barrier [6]. The external multilayered part, the epidermis, mainly composed of keratinocytes (KCs) and Langerhans cells, is tightly connected to the dermis, in which fibroblasts are the main resident cells [7]. Dermal fibroblasts not only play an active role in synthesizing and remodeling the extracellular matrix (ECM), but

also communicate with other cell types such as dermal dendritic cells, mast cells, macrophages and KCs. They also participate in tissue homeostasis, leukocyte recruitment and inflammation regulation [8]. Due to their broad and highly specialized roles in conditioning the cellular and cytokine/chemokine environment, resident sentinel fibroblasts function as part of the immune system [9].

To date, most studies of the cutaneous phase of LB have focused on the interaction of *Borrelia* with dendritic cells [10,11], mast cells [12], and KCs [13,14]. A few studies have investigated fibroblast responses to this disease. A recent study indicated that the interaction of *B. burgdorferi* with dermal fibroblasts induced the proinflammatory chemokine IL-8, along with the antimicrobial peptides defensin and cathelicidin [15]. *Borrelia* has also been shown to internalize and survive within fibroblasts [16]. Although KCs are the first cells to be injured by the tick mouthparts, biting pieces penetrate deeply into the skin [17]. Spirochetes are inoculated into the dermis, interacting with additional immune cells (dermal dendritic cells, mast cells...) and the fibroblasts. We found it therefore particularly relevant to assess how *Borrelia* infection impacts dermal fibroblasts.

In this study we investigated the role of dermal fibroblasts in skin inflammation in response to *Borrelia*. Since the inflammation could be related to the specific environments from which the strains were isolated, we tested one strain isolated from a tick and two strains isolated from different stages of the disease, potentially providing a link between spirochetal-related factors and LB outcome. Toward this end, we used specific skin cDNA microarrays to compare the global transcriptional response elicited in human dermal fibroblasts by three different strains of *B. burgdorferi* ss, isolated from an infected tick (N40) and from patients affected by EM (Pbre) or ACA (1408). Then, we investigated more precisely whether one of the major lipoproteins of *Borrelia*, OspC, which is necessary for the transmission of *Borrelia* to the vertebrate host [18,19], could be responsible for the induction of inflammatory molecules secreted by fibroblasts. Finally, we tested the effect of tick salivary gland extracts (SGE) on *Borrelia*-induced fibroblast response.

Results

Fibroblasts Stimulated by *B. burgdorferi* ss N40, Pbre and 1408 Strains Secrete Inflammatory Genes

B. burgdorferi ss N40 has been shown to induce a proinflammatory response when coincubated with human primary fibroblasts. In this response, IL-8 was induced in a dose-dependent manner [15]. To check whether *B. burgdorferi* ss N40, Pbre and 1408 behave similarly when co-incubated in vitro with fibroblasts, we measured IL-8 synthesis. The chemokine was secreted in a dose- and time-dependent manner, with peak secretion at 24 hours after cell stimulation (Figure 1). We then chose a 24 hours time-course for fibroblast stimulation and a multiplicity of infection (MOI) of 100:1 for all the experiments to get the best signal.

Global Fibroblast Transcriptional Responses to *B. burgdorferi* ss N40, Pbre and 1408

Two independent microarray experiments were performed for each of the three *Borrelia* strains (N40, Pbre, 1408). Statistical analysis was then performed using the 6 experiments together by comparing treated vs untreated samples. Out of 1,302 genes present on the DNA chip, 241 genes (18.5%) were differentially regulated with a fold change above 1.7 and a false discovery rate below 5% (Figure 2A). Of these 241 genes, 103 were up-regulated, 138 were down-regulated and 75 were found to be regulated by more than 1.7-fold by each of the three *Borrelia* strains (47 up- and 28 down-regulated). The majority were regulated after *Borrelia* stimulation between 1.7 and 5-fold compared to unstimulated cells for all the three strains tested (Figure 2B). This underlines that *Borrelia* has a major effect on fibroblast gene expression. The transcriptional responses induced by strain N40, Pbre and 1408 have been compared: at this point, we did not identify relevant specific strain-related transcriptional pathway. In contrast, a notable observation was that the three *B. burgdorferi* ss strains isolated from various environments of the *Borrelia* life cycle elicited very similar transcriptional profiles in primary human dermal fibroblasts, with a core of 47 genes up-regulated in response to stimulation by all three strains.

Up-regulated Transcriptional Responses are Largely Representative of Proinflammatory Pathways, Extracellular Matrix Synthesis and Remodeling Signals

The core of 47 up-regulated genes in response to stimulation by all three strains (Table 1), included proinflammatory genes and genes involved in ECM remodeling and synthesis. High levels of chemokines (CXCL1 and IL-8) and cytokines (IL-3, IL-6, IL-9,

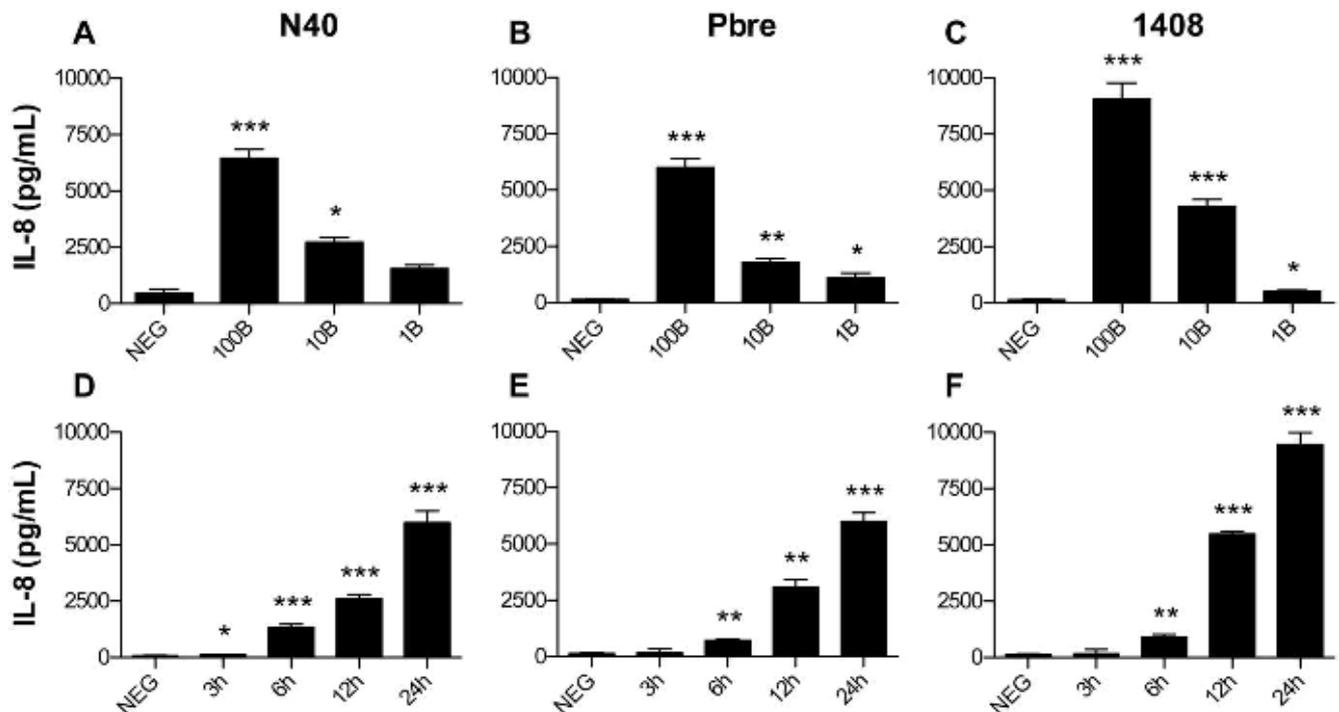


Figure 1. Measure of IL-8 secretion by fibroblasts co-incubated with different strains of *B. burgdorferi* ss. (A-C) IL-8 secretion of fibroblasts stimulated by different concentrations of *Borrelia* N40, Pbre, 1408 at MOI of 100:1 (100B), 10:1 (10B), and 1:1 (1B) at 24 hours. (D-F) Kinetic studies of IL-8 secretions in the three strains. NEG: unstimulated fibroblasts. (A-F) Each bar shows the mean \pm SDs of triplicate values and is representative of three independent experiments. ***P, 0.001; **P, 0.01; and *P, 0.05 compared between stimulated and unstimulated cells. doi:10.1371/journal.pone.0040046.g001

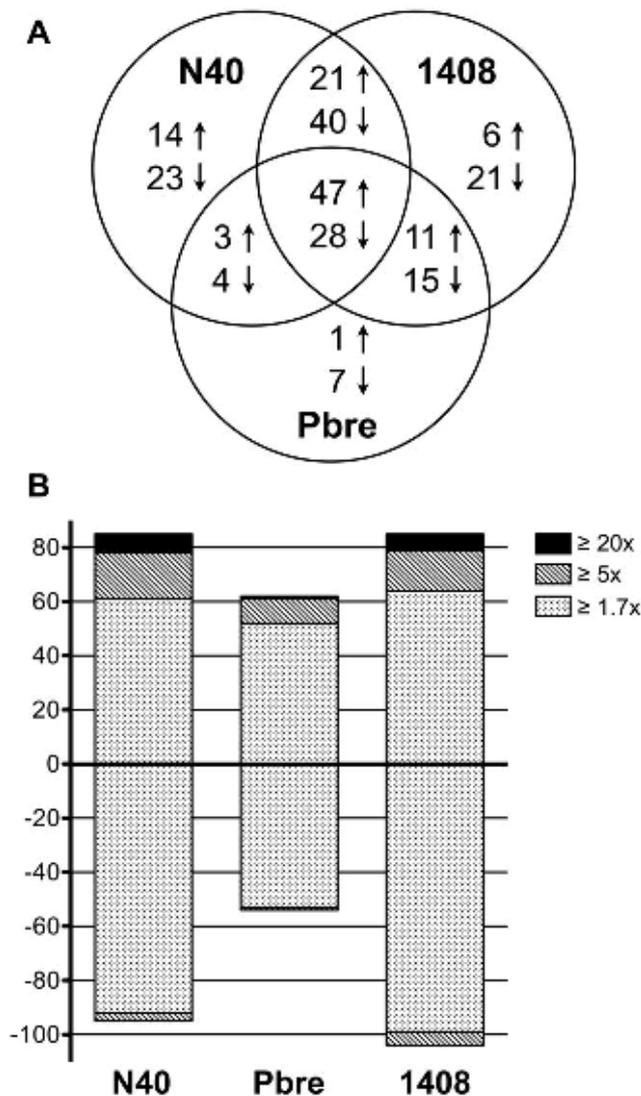


Figure 2. Gene expression profiles obtained from dermal fibroblasts stimulated with different strains of *B. burgdorferi* ss. (A) Venn diagram of genes significantly up-regulated (q) or down-regulated (Q) after fibroblast stimulation with *Borrelia*, and compared with unstimulated fibroblasts. (B) Number of genes differentially expressed during fibroblast stimulation with *Borrelia*. The bars reflect the number of up-regulated genes (+) and down-regulated genes (-) for each strain. The light dotted areas correspond to gene expression changes of 1.7–5.0-fold, the grey hatched areas correspond to changes of 5.0–20.0-fold and black areas to changes of ≥ 20.0-fold. doi:10.1371/journal.pone.0040046.g002

IL-12B, IL-13, IL-15) were induced, along with gene encoding pentraxin 3 (PTX3), a fluid-phase pattern-recognition molecule involved in the acute-phase response and innate immunity [20]. Up-regulated genes were also largely representative of intracellular signaling/regulating pathways that sustain inflammatory responses such as NF-κB transcription factors (NF-κB1, NF-κB2, Rel, RelB, IκB-α), interferon-related genes (the IFN-responsive factor IRF1, transducers of the JAK/STAT signaling cascade STAT1, STAT2 and the interferon-inducible genes OAS2 and IFIH1), and other transcription factors that could play a role in the inflammatory process (the NF-κB-induced HIF1A and JUN, component of the AP-1 transcription factor). Among genes involved in ECM remodeling, all *Borrelia* strains induced up-regulation of three

matrix metalloproteinases (MMP-1, -3 and -12). Several other genes associated with cell–matrix interaction (ITGA1, the α_vβ₁ integrin) or structural components of the ECM including microfibrils (MFAP3), collagen fibrils (COL8A1), and laminins (LAMA1) were also up-regulated by all three *Borrelia* strains. Cell activation cycle genes encoding growth factors (the KCs growth factor FGF7) and cell apoptosis-related genes encoding TNF ligand superfamily members (TNFSF10 and the B-cell activating factor TNFSF13B) and two of their receptors (TNFRSF6, TNFRSF10B), were up-regulated as well. Several other genes related to metabolism such as SOD2 were up-regulated by all three *Borrelia* strains. Among the three strains, the strain isolated from EM induced weaker inflammation than the two other strains. A large number of genes associated with intracellular metabolic functions, DNA damage repair and cell cycle control were down-regulated by one or more *Borrelia* strains (Table S1).

Validation of Selected Genes Among those Found to be Differentially Regulated by Microarray Analysis

The mRNA expression of selected genes (IL-8, IL-6, CXCL1, SOD2, MMP-12) was analysed in kinetic experiments, at 3, 6, 12 and 24 hours after *Borrelia* stimulation. A similar trend in transcriptional induction was observed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (QRT-PCR) and microarray. We confirmed strong up-regulation of the genes encoding IL-8, IL-6, CXCL1, and SOD2 for all the three *Borrelia* strains (Figure 3). We were not able to confirm the up-regulation of MMP-12 mRNA observed in the microarray by QRT-PCR for the strain 1408. The effects of *Borrelia* stimulation on these gene expressions were time-dependent, with maximal responses observed 24 hours after fibroblast stimulation. All QRT-PCR data normalized to the b-actin were further confirmed by normalizing them to the expression of the RNA polymerase II, another housekeeping gene known to be stable under various stimulatory conditions [21]. Results obtained after b-actin and RNAPol2 normalization were very similar to each other (data not shown).

Effect of OspC and SGE on Fibroblast Inflammation

OspC is a surface lipoprotein, essential for *Borrelia* transmission to the vertebrate host. In addition to its role on KCs inflammation [14], we tested whether OspC could also be responsible for fibroblast inflammation induced by *Borrelia*. Using an OspC-deficient *Borrelia* mutant, comparable levels of IL-8 synthesis were noted 24 hours after stimulation with wild-type spirochetes, OspC-deficient *B. burgdorferi*, or OspC-deficient *B. burgdorferi* complemented with OspC (Figure 4A). These data indicate that OspC is not responsible for *Borrelia*-induced proinflammatory responses in skin fibroblasts; other surface-exposed proteins of *Borrelia* could induce that activity. To further test the contribution of *Borrelia* lipoproteins to fibroblast inflammatory response, lipoprotein signaling was blocked by anti-TLR2 antibody before *Borrelia* stimulation. The blocking effect of anti-TLR2 antibody, already tested in the interaction OspC–keratinocytes [14], only slightly (136.2%) and not significantly inhibited IL-8 secretion (Figure 4B), indicating that *Borrelia*-induced fibroblast stimulation is TLR2-independent. Tick saliva affects different cells in the skin [22] but its effect on fibroblast inflammation was never investigated in detail. Co-incubation of fibroblasts with *Borrelia* and *I. ricinus* SGE (20 ng/ml) showed a dramatic decrease of IL-8 synthesis (Figure 4C). Microscopic observation of the fibroblast cultures revealed a cytotoxic effect of SGE confirmed by cell staining with Trypan blue (data not shown). A significant morphologic change

Table 1. Up-regulated genes in fibroblasts stimulated with *B. burgdorferi* in comparison to unstimulated fibroblasts.

| Gene number | Annotation | N40 (tick) ¹ | Pbre (EM) ¹ | 1408 (ACA) ¹ | Description/Function |
|------------------------------------|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---|
| Inflammation | | | | | |
| Chemokines | | | | | |
| NM_001511 | CXCL1 | 176.12 | 101.03 | 200.92 | GRO α , chemoattractant for neutrophils |
| NM_000584 | IL-8 | 66.40 | 12.89 | 50.32 | Chemoattractant for neutrophils |
| Cytokines | | | | | |
| NM_000588 | IL-3 | 1.96 | 1.89 | 1.90 | Cytokine, regulate granulocytes and monocytes-macrophages activation and proliferation |
| NM_000600 | IL-6 | 39.90 | 6.07 | 13.38 | Cytokine of the acute phase response |
| NM_000590 | IL-9 | 1.73 | 2.00 | 1.89 | Cytokine, regulates T-lymphocytes activation and proliferation |
| NM_002187 | IL-12B | 3.41 | 1.83 | 2.13 | Cytokine, regulates T-lymphocytes and NK cells activation and proliferation |
| NM_002188 | IL-13 | 2.47 | 2.68 | 2.44 | Cytokine, regulates inflammatory and immune responses |
| NM_000585 | IL-15 | 4.31 | 5.50 | 5.13 | Cytokine, regulates T-lymphocytes and NK cells activation and proliferation |
| Innate immunity effector | | | | | |
| NM_002852 | PTX3 | 9.01 | 3.68 | 13.45 | Pentraxin-3 : component of the humoral arm of innate immunity |
| NF- κ B pathway | | | | | |
| NM_003998 | NFKB1 | 3.89 | 1.98 | 2.62 | NF- κ B p105 subunit |
| NM_002502 | NFKB2 | 6.62 | 2.19 | 2.83 | NF- κ B p100 subunit |
| NM_002908 | REL | 4.51 | 2.34 | 3.42 | C-Rel proto-oncogene protein, member of the NF- κ B transcription factors |
| NM_006509 | RELB | 3.43 | 1.78 | 2.49 | Member of the NF- κ B transcription factors |
| NM_020529 | IKBA | 8.26 | 3.47 | 5.76 | Inhibit the NF- κ B transcription factor |
| IFN-related pathway | | | | | |
| NM_016817 | OAS2 | 9.43 | 6.53 | 15.54 | Oligoadenylate synthetase-2 : IFN-induced, innate immune response to viral infection |
| NM_022168 | IFIH1 | 11.66 | 6.53 | 15.54 | IFN-induced, alteration of RNA secondary structure |
| NM_002198 | IRF1 | 6.01 | 2.65 | 6.73 | Interferon regulatory factor-1 : transcription factor |
| NM_007315 | STAT1 | 7.93 | 6.74 | 11.24 | Signal transducer of activation-1, up-regulate genes in response to IFN type I, II or III |
| NM_005419 | STAT2 | 4.83 | 2.29 | 3.68 | Signal transducer of activation-2 : up-regulate genes in response to IFN type I |
| NM_003745 | SOCS1 | 2.18 | 1.75 | 2.60 | Suppressor of cytokine signaling-1 : negative feedback loop of the JAK/STAT pathway |
| NM_014011 | SOCS5 | 2.05 | 1.79 | 1.91 | Suppressor of cytokine signaling-5 : negative feedback loop of the JAK/STAT pathway |
| Other transcription factors | | | | | |
| NM_002228 | JUN | 2.45 | 2.00 | 3.02 | Transcription factor AP-1 |
| NM_001530 | HIF1A | 4.96 | 2.11 | 2.58 | Hypoxia-inducible factor 1-a : NF- κ B induced, role in myeloid cell-mediated inflammation |
| Extracellular matrix | | | | | |
| Metalloproteinases | | | | | |
| NM_002421 | MMP-1 | 19.86 | 4.65 | 6.68 | Matrix metalloproteinase-1 : interstitial collagenase |
| NM_002422 | MMP-3 | 9.46 | 2.49 | 4.37 | Matrix metalloproteinase-3 : stromelysin |
| NM_002426 | MMP-12 | 14.15 | 2.74 | 5.90 | Matrix metalloproteinase-12 : macrophage metalloelastase |
| Components of extracellular matrix | | | | | |
| NM_001850 | COL8A1 | 3.10 | 2.06 | 4.58 | Collagen alpha-1(VIII) chain |
| NM_005559 | LAMA1 | 2.61 | 1.75 | 2.24 | Laminin subunit a-1 |
| NM_005927 | MFAP3 | 2.29 | 1.91 | 1.72 | Microfibril-associated glycoprotein-3, component of the elastin-associated microfibrils |
| Cell-matrix interactions | | | | | |
| NM_181501 | ITGA1 | 4.51 | 2.15 | 2.39 | Integrin α_1 |
| Cellular cycle | | | | | |
| TNF pathways and apoptosis | | | | | |
| NM_000043 | TNFRSF6 | 2.37 | 2.04 | 2.41 | Fas receptor, death receptor involved in apoptosis |
| NM_003810 | TNFSF10 | 11.66 | 4.58 | 11.25 | TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand |

Table 1. Cont.

| Gene number | Annotation | N40 (tick) ¹ | Pbre (EM) ¹ | 1408 (ACA) ¹ | Description/Function |
|-------------|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--|
| NM_003842 | TNFRSF10B | 1.86 | 1.82 | 2.38 | TRAIL receptor 2, death receptor involved in apoptosis |
| NM_006573 | TNFSF13B | 19.81 | 8.79 | 25.16 | BAFF, B-cell activating factor |
| NM_003183 | ADAM17 | 1.91 | 1.75 | 1.83 | Cleaves the membrane-bound precursor of TNF-alpha to its mature soluble form |
| NM_003879 | CFLAR | 4.95 | 3.44 | 3.30 | Caspase-8 and FADD-like apoptosis regulator |
| | | | | | Apoptosis inhibition |
| NM_001165 | BIRC3 | 4.51 | 4.30 | 6.03 | Inhibitor of apoptosis protein-1 |
| | | | | | Growth factor |
| NM_002009 | FGF7 | 7.36 | 2.71 | 2.26 | Fibroblast growth factor-7 : stimulates keratinocyte growth |
| | | | | | Cellular metabolisms and miscellaneous |
| NM_000636 | SOD2 | 33.07 | 11.84 | 28.67 | Superoxide dismutase |
| NM_006169 | NNMT | 6.85 | 3.39 | 5.15 | Nicotinamide N-methyltransferase |
| NM_002485 | NBN | 3.83 | 3.41 | 2.15 | Nibrin, repair of double strand breaks |
| NM_001539 | DNAJA1 | 3.15 | 2.22 | 3.25 | Heat-shock 40 kDa protein 4 |
| NM_000165 | GJA1 | 1.99 | 1.91 | 1.88 | Connexin-43, component of gap junctions |
| NM_000345 | SNCA | 2.46 | 2.47 | 2.07 | Alpha-synuclein, involved in membrane composition and turnover |
| NM_000104 | CYP1B1 | 3.41 | 2.60 | 2.42 | Belongs to the cytochrome P450 superfamily of enzymes |
| NM_006317 | BASP1 | 1.91 | 1.71 | 1.82 | Membrane bound protein, unknown function |
| - | LOC387763 | 22.02 | 6.07 | 14.31 | Unknown function |

¹For each strain, values shown correspond to the mean ratio of the duplicate measurement determined between normalized gene intensity values obtained after 24 hours of fibroblast stimulation with *B. burgdorferi* (MOI 100:1) compared with gene intensity values from unstimulated cells.

doi:10.1371/journal.pone.0040046.t001

of fibroblasts was already observed at 6 hours (Figure 4D, panels II and V) leading to a mortality rate . 90% 24 hours after stimulation (Figure 4D, panels III and VI). Using serial dilutions of SGE, the ability of fibroblasts to synthesize IL-8 was almost completely restored when SGE dilution reached a dilution of 1:20 (Figure 4C), and the cytotoxic effect was reversed at the same dilution (data not shown). The decrease of *Borrelia*-induced IL-8 synthesis in presence of SGE should obviously be considered as inability of IL-8 synthesis related to SGE-induced cell death (Figures 4C and 4D). As Salp15 is a tick protein affecting various immunological processes [23], we tested whether the observed cytotoxic effect was due to this protein. Salp15 alone had no toxic effect on fibroblast cultures and did not inhibit IL-8 synthesis when coinoculated with *Borrelia*. Heat-denaturation of SGE largely restored the ability of fibroblasts to synthesize IL-8 (Figure 4C) and completely abolished SGE cytotoxic effect (data not shown), indicating that SGE cytotoxic activity is linked to a proteinaceous compound present in tick saliva.

Discussion

The skin is a major organ in the development of LB since it constitutes the inoculation site for *Borrelia* and tick saliva, and for the early and late manifestations, EM and ACA respectively [4,5]. During and after the long-lasting blood meal of the ixodid tick, spirochetes multiply locally and interact with skin cells – dendritic cells, mast cells, fibroblasts and KCs – before migrating and reaching other tissues responsible for systemic clinical symptoms. Ticks first dilacerate the epidermis containing the KCs, then the dermis where saliva affects immune cells and the resident cells of the dermis [17]. Therefore, the immune response of the skin is essential to control the development of the disease [24]. Fibroblasts play a key role in this cutaneous immunity by cooperating with other immune cells. Fibroblasts also affect the maturation of

dendritic cells [9]. Considering the tight relationships between fibroblasts, other skin cells and *Borrelia*, it was of particular interest to study the interaction fibroblasts–*Borrelia*.

We previously showed that the co-incubation fibroblasts–*Borrelia* induces antimicrobial peptides and IL-8 synthesis. Different *Borrelia*-host cell ratios were studied 100, 10 and 1 *Borrelia* for one cell. Because the MOI 100:1 gave the strongest inflammatory response, we selected this range to study the global inflammatory response [15]. By using microarray analysis, we extended the panel of inflammatory molecules studied using different isolates of *B. burgdorferi* strains. Genes shown to be strongly up-regulated by microarray with all three strains were mostly related to proinflammatory signals – IL-6, IL-8 and CXCL1 – that were further validated by QRT-PCR analysis and also at the protein level for IL-8 by ELISA. These molecules allow immune cell recruitment and differentiation in damaged tissues [25]. Other studies reported *Borrelia*-induced cytokine and chemokine expression (including IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL9, CXCL10, CCL2, and CCL5) in primary human dermal fibroblasts [13,26]. Müllegger et al., by using QRT-PCR on skin biopsies, also found similar chemokine and cytokine induction in EM and ACA, with low but significant mRNA levels of CXCL1 and the dendritic cell chemoattractant CCL20, intermediate levels of the macrophage chemoattractant CCL2, and high levels of the T-cell-active chemokines CXCL9 and CXCL10 [27]. Skin manifestations of LB – EM and ACA – exhibit dermal infiltrate, composed predominantly of lymphocytes and histiocytes [28,29,30]. With regard to the potent proinflammatory response elicited by *Borrelia* in fibroblasts, dermal fibroblasts could therefore be considered as central mediators in immune cell recruitment to the skin site of *Borrelia* invasion. Their relevance in the immune response has been lately emphasized by their role on the maturation of dendritic cells [9].

MMPs are molecules important in tissue modeling. Induction of MMPs synthesis by resident skin cells facilitates *Borrelia* migration from

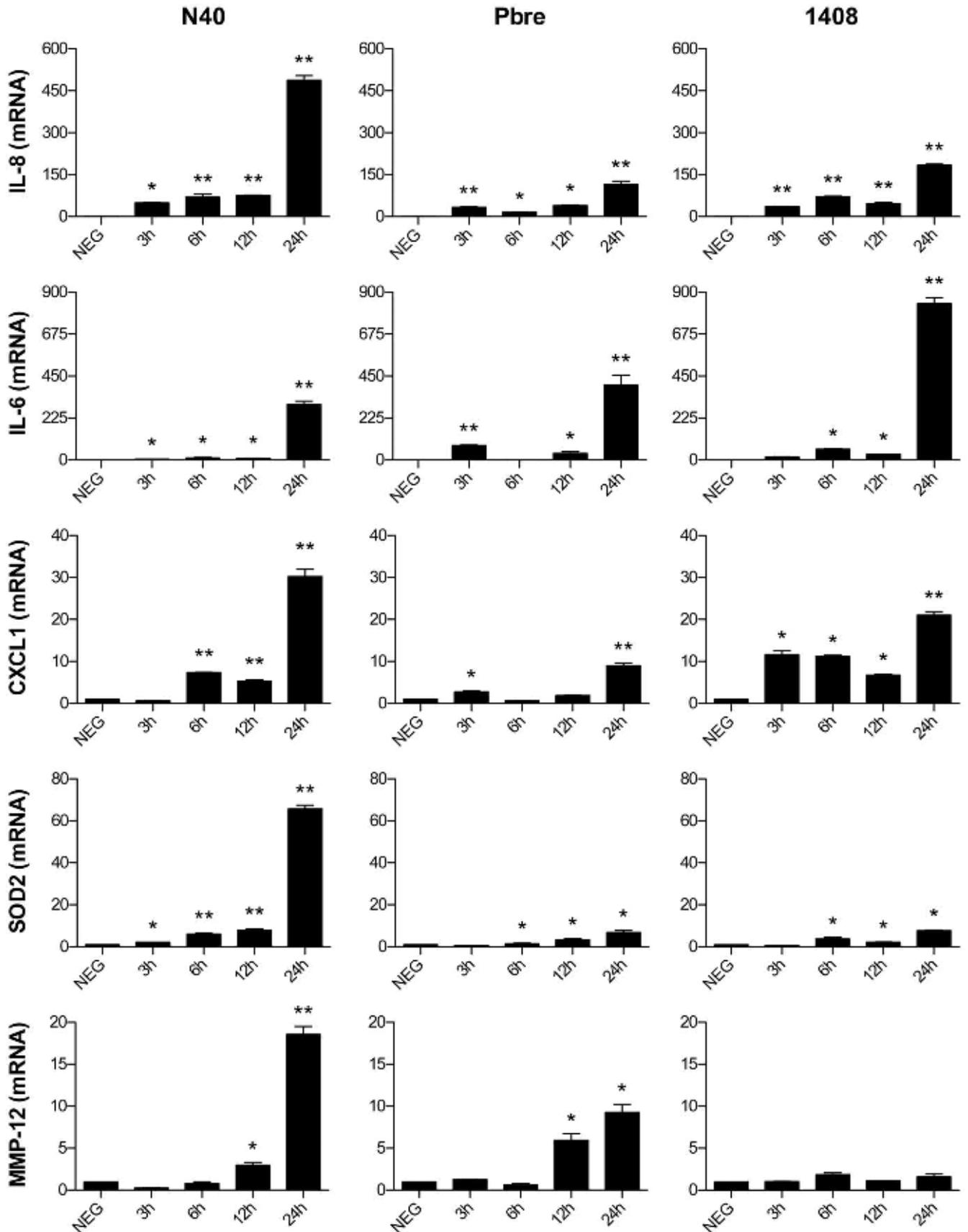
Interaction *Borrelia* - Skin Fibroblasts

Figure 3. QRT-PCR analysis of mRNA expression induced by *Borrelia* in kinetic experiments with fibroblasts. The mRNA levels of IL-8, IL-6, CXCL1, SOD2 and MMP-12 were normalized to the β -actin housekeeping gene level and expressed as relative changes in gene expression

compared with untreated cells (NEG). Each bar shows the mean \pm SDs of triplicate values and are representative of three independent experiments. **P, 0.01; and *P, 0.05 compared between stimulated and unstimulated cells.
doi:10.1371/journal.pone.0040046.g003

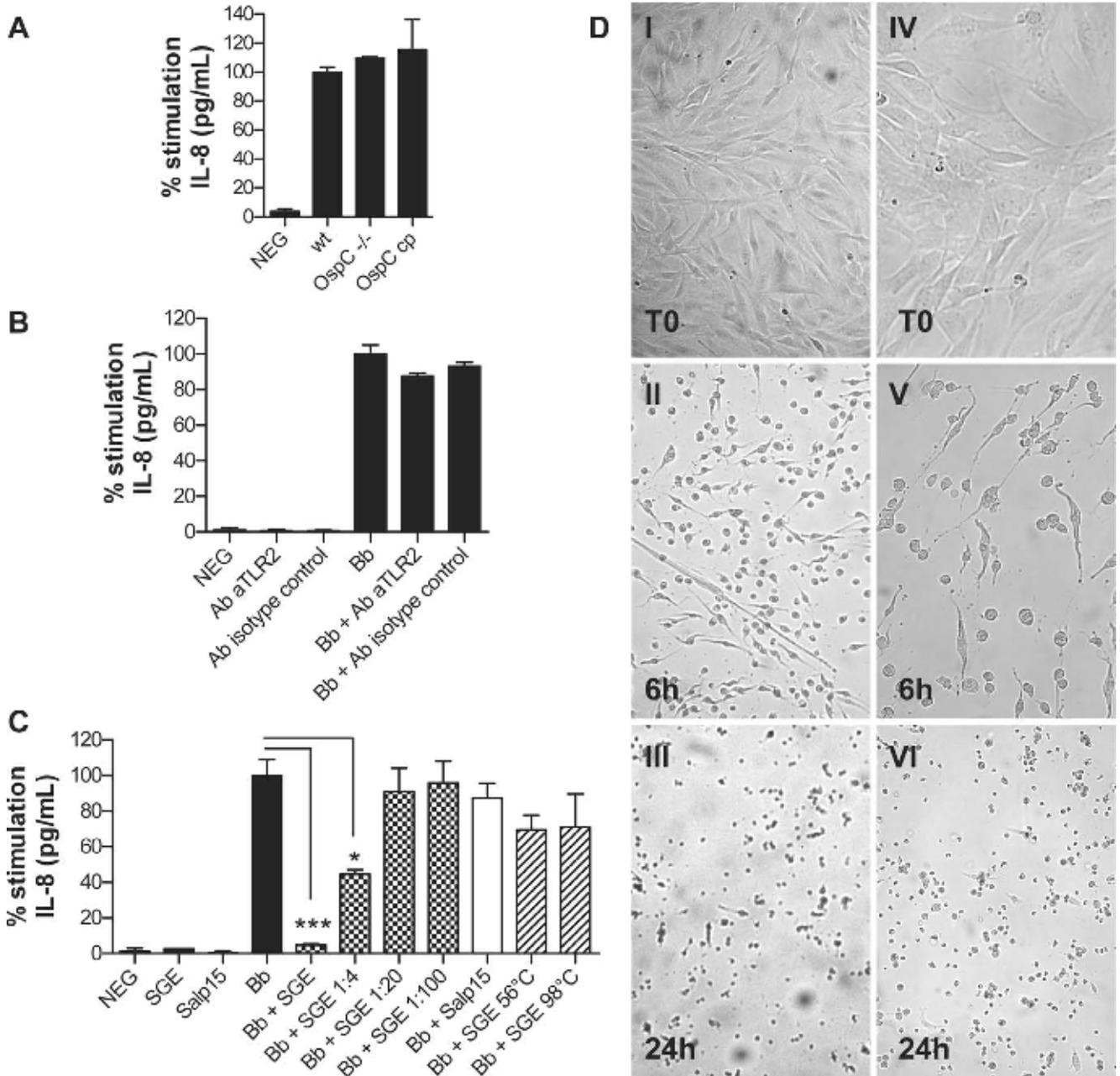


Figure 4. Role of OspC, *I. ricinus* salivary gland extracts (SGE) and Salp15 in *Borrelia*-induced fibroblast inflammation. (A) IL-8 synthesis induced by wild-type strain 297 (wt), OspC-deficient (OspC 2/2), and OspC-deficient strain 297 complemented with a plasmid carrying the ospC gene (OspC cp) in fibroblasts. (B) IL-8 synthesis in fibroblasts induced by *B. burgdorferi* ss N40 (Bb) in absence or in presence of human anti-TLR2 antibody (Ab α TLR2) or isotype control antibody (Ab isotype control). (C) IL-8 synthesis in fibroblasts coincubated with 20 ng/ml SGE alone, 30 mg/ml Salp15 alone, *B. burgdorferi* ss N40 (Bb) alone, with the combination of *Borrelia* and SGE at 20 mg/ml (Bb + SGE), 5 mg/ml (Bb + SGE 1:4), 1 mg/ml (Bb + SGE 1:20), and 0.2 mg/ml (Bb + SGE 1:100), with the combination of *Borrelia* and Salp15 (Bb + Salp15), or with the combination of *Borrelia* and 20 mg/ml SGE heat-denatured at 56°C for 1 hour (Bb + SGE 56°C), or at 98°C for 3 minutes (Bb + SGE 98°C). For (A), (B) and (C) fibroblasts were incubated with *Borrelia* at MOI of 100:1 for 24 hours. The negative control was unstimulated cells (NEG). Each bar shows the mean \pm SDs of triplicate values (expressed as % stimulation of IL-8 synthesis induced by *Borrelia* alone) and is representative of three independent experiments. ***P, 0.001; and *P, 0.05 compared with the corresponding stimulation induced by *Borrelia* alone. (D) Images of fibroblast cell cultures stimulated with SGE, showing SGE-induced cytotoxic effect at 6 and 24 hours (h). Images were taken at 100x (I, II and III) or at 200x magnification (IV, V and VI).
doi:10.1371/journal.pone.0040046.g004

the skin to other organs. In our microarray analyses, MMP-1, -3 and -12 were found to be up-regulated by *Borrelia*. MMP-1 and MMP-3 have previously been reported in patients with Lyme arthritis [31] and in *in vitro* models of Lyme arthritis using cartilage explants and chondrocytes [32,33]. MMP-12, involved in matrix elastin and other basement membrane component degradation [34], was up-regulated by *Borrelia* in skin fibroblasts. Interestingly, ACA represents a skin manifestation where elastic fibers are destroyed [29]. Moreover, *Borrelia* was previously found to induce MMP-12 in dendritic cells [35]. We observed a discrepancy between microarrays and QRT-PCR results for MMP-12. This lack of correlation was already described for the two techniques in similar studies, analyzing the interaction immune cells–*Borrelia* [36,37].

Borrelia also induced genes related to metabolism, including SOD2, an enzyme specifically involved in oxidative burst protection. *B. burgdorferi* is known to elicit oxidative burst in immune cells [38,39] and the role of *Borrelia*-induced reactive oxygen species in patients with EM has been postulated [40]. SOD activity has been shown to be one of the mechanisms by which fibroblasts protect against oxygen reactive intermediates generated by cytokines and bacterial cell components [41]. All three *Borrelia* strains tested led to a strong up-regulated expression of SOD2 that could function as a protective mechanism by which fibroblasts counteract potential oxidative bursts elicited by *Borrelia*. We also observed up-regulation of factors involved in the FN pathway, confirming the role of this inflammatory response to *Borrelia* [36,37].

In our study, the three strains isolated from various environments induced a very similar inflammatory profile in fibroblasts. So, no specific strain-related pathway has been identified that could link transcriptional responses elicited by clinical strains 1408 (isolated from ACA), Pbre (isolated from EM) or strain N40 (isolated from a tick). Host-related factors are important, as ACA is predominantly observed in elderly patients, particularly women, and affects primarily sun-exposed acral parts of the body [42]. Spirochetal factors are also likely to play a key role in dermatoborreliosis outcome, since *B. afzelii* is the most common genospecies associated with ACA whereas *B. burgdorferi* ss and other genospecies are rarely isolated from this late clinical feature of LB [43]. However, we compared the fibroblast response of three strains of *B. afzelii* in our *in vitro* culture system (one strain isolated from an EM lesion and two strains isolated from ACA lesions) to the *B. burgdorferi* ss strain 1408 (isolated from ACA). IL-8 release from fibroblasts co-incubated with these different strains of *B. burgdorferi sensu lato* did not differ significantly (data not shown).

A switch from OspA to OspC occurs during the migration of *Borrelia* from the midgut to the salivary glands of the tick [44]. OspC is important in the transmission to the vertebrate host [18,19], and this lipoprotein is also described as a sensing molecule allowing *Borrelia* to migrate through the skin tissue. By inducing VEGF (Vascular endothelial growth factor), OspC may affect the vascular permeability facilitating bacterial dissemination [45]. We then tried to determine whether OspC might be responsible for part of the fibroblast inflammation. When we tested an OspC-deficient mutant [46], the inflammatory response was not modified. Moreover, the blockade of lipoprotein signaling by anti-TLR2 antibody only slightly inhibited fibroblast stimulation by *Borrelia*. These results indicate that OspC is not a major surface protein involved in *Borrelia*-elicited proinflammatory responses of fibroblasts and that other surface-exposed *Borrelia* proteins, like the integrin-binding protein P66, could elicit that role by direct interaction with fibroblasts or by interaction with the ECM components they produce [47,48,49]. As *Borrelia* is able to invade fibroblasts by interacting with integrins [16], and that P66 was shown to affect both endothelial and epithelial cells transcrip-

tionnal responses [50], it could be interesting to further explore this type of interaction.

In addition to the anti-alarmin effect of SGE on KCs [14], we also demonstrate a lytic effect of SGE on dermal fibroblasts and that this cytotoxic effect was of proteinaceous nature and not related to Salp15. This tissue lysis induced by tick SGE could explain the feeding pit described in literature during the tick bite [51] and observed *in vivo* by intravital microscopy (Bockenstedt – personal communication). In a recent study, Hajnická et al. demonstrated that SGE of hard ticks displayed an inhibitory effect on cell proliferation in a mouse cell line, reduced cell adherence and induced morphologic changes in human cell lines [52]. The lytic action of *ixodes* SGE *in vitro* on human primary fibroblasts could be linked to this effect in the days immediately following the tick bite. Tick saliva counteracts skin wound repair by its inhibitory effects on hemostasis (coagulation, platelet aggregation, and vasoconstriction), inflammation and innate immunity, thus avoiding tick rejection and allowing maintenance of tick attachment to the host during blood feeding [53]. The effect of tick saliva on the skin occurs rapidly and is strictly limited to the tick bite. We hypothesized that after the tick detaches, the saliva effect decreases and *Borrelia* can multiply intensively locally as shown in different mouse models, especially at day 7 after syringe inoculation [45,54,55]. This intense *Borrelia* multiplication in the skin likely corresponds to a high ratio pathogens–host cell, at a certain point during the early transmission, not too far from the one we used *in vitro* in our assay. Once the clinical manifestations appear, a few weeks to few months after the tick bite, *Borrelia* interacts with fibroblasts at different time points, first in EM, then later in ACA, inducing an inflammatory response similar to those observed in the microarray assays.

Materials and Methods

Spirochete Strains

Three European strains of *B. burgdorferi* ss were selected: N40 isolated from a tick, and two strains (Pbre and 1408) isolated from skin biopsies of EM and ACA respectively. *B. burgdorferi* ss 297 and its OspC-deficient relative mutant have already been described [46]. All strains were used at passage 5 to 8, cultured in BSK-H medium (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) at 33°C and washed before the assays.

Tick Salivary Glands and Salp15

SGE of *I. ricinus* was prepared as described previously [14]. Absence of endotoxin was checked by the Limulus assay before use, and an equivalent of salivary glands of one tick (around 20 mg/ml) was used. For the assays with heat-denatured SGE, extracts were incubated at 56°C for 1 hour, or at 98°C for 3 minutes before use. Purified Salp15 from *I. ricinus* was used at a concentration of 30 mg/ml, as described previously [14].

Fibroblast Culture and Stimulation

Primary human dermal fibroblasts (NHDF, Promocell, Heidelberg, Germany) were maintained in FGM2 medium. To stimulate the cells, fibroblasts were used at passage 3 to 5 and seeded at 7.56×10^4 per well in a 12-well plate. At confluence and one day before *Borrelia* activation, FGM2 medium was replaced by FGM medium without fetal calf serum. If not otherwise stated, fibroblasts were stimulated with *B. burgdorferi* spirochetes at MOI of 100:1 for 24 hours. For the assays with tick SGE or with Salp15, spirochetes were preincubated for 30 minutes with the tick compounds at room temperature, and the preparation was then transferred onto fibroblast cells and further incubated for 24 hours. For the assays with TLR2-blocking antibody, the anti-human

TLR2 antibody and its isotype control antibody (eBioscience, Ltd., United Kingdom) were used at 5 mg/ml and incubated for 30 min at room temperature on fibroblasts. *Borrelia* (at MOI of 100:1) was then added, and the samples were further incubated for 24 hours. Before collecting stimulated or unstimulated fibroblasts in Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), the viability of cells was checked by Trypan blue staining.

ELISA

IL-8 secretion was measured in supernatants of unstimulated and *Borrelia*-stimulated cells by ELISA. The protocol was based on sandwich techniques, as described by the manufacturer (R&D systems, Lille, France).

RNA Extraction and Quantitative Real Time RT-PCR

After removal of the supernatant, fibroblasts were directly suspended in Trizol for RNA extraction according to the manufacturer's protocol. After treatment with DNase (Ambion, Courtabouef, France), 2 mg of total RNA was reverse-transcribed with the Superscript II first-strand synthesis system (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Semiquantitative reverse transcription PCR (QRT-PCR) was done on a LightCycler system 2.0 (Roche, Meylan, France) with specific primers (Table S2). Expression levels of all transcripts studied were normalized to housekeeping gene level and the relative changes in gene expression were compared with those of untreated cells using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Two housekeeping genes were tested: b-actin and the RNA polymerase II genes [21].

Microarray Analysis

The topic-defined PIQOR™ Skin cDNA Microarray (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) comprising 1,302 genes was used to generate gene expression profiles of Cy5-labeled unstimulated versus Cy3-labeled *Borrelia*-stimulated fibroblasts. All steps of the microarray process (including hybridization, scanning, and data analysis) were performed as described elsewhere in detail [56]. Data were based on independent duplicate measurements for each *Borrelia* strain (N40, Pbre, 1408) and inter-array normalization was performed by median normalization using BRB-ArrayTools developed by Dr. Richard Simon and the BRB-ArrayTools Development Team (<http://linusnci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). The normalized log-ratio values of the 6 experiments (2 experiments/strain) were analyzed with significance analysis of microarrays (SAM) [57], using the Multi-Experiment Viewer (MeV, v4.0.01) software tool [58]. Regulated genes (all strains together) were selected after one-class analysis (20,000 sample permutations) with a false discovery rate (FDR) threshold of 5% and a mean change in their expression level of at least 1.7-fold. For each particular strain, each gene found regulated in the global analysis was then considered regulated if the mean fold change of the duplicate experiments for this particular strain was above 1.7. The microarray data have been

deposited in the GEO repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the record number GSE31740. Microarray experiments were performed according to the MIAME guidelines [59].

Statistics

For ELISA and QRT-PCR, each experiment of cell stimulation with bacteria was carried out at least three times in independent experiments. Results are presented as means \pm 6 standard deviations (SDs) and were analyzed by Student's *t* test. Differences in values are considered significant at *p* < 0.05. For ELISAs, the data are the means \pm 6 SDs of triplicate values and are representative of three independent experiments. For QRT-PCR, the values are normalized to the negative control (medium alone) and shown as the fold number of the control's value. The means \pm 6 SDs of triplicate values were compared between stimulated and unstimulated cells and are representative of three independent experiments.

Supporting Information

Table S1 Down-regulated genes in fibroblasts stimulated with *B. burgdorferi* in comparison to unstimulated fibroblasts. ¹ For each strain, values shown correspond to the mean ratio of the duplicate measurement determined between normalized gene intensity values obtained after 24 hours of fibroblast stimulation with *B. burgdorferi* (MOI 100:1) compared with gene intensity values from unstimulated cells. Missing values are indicated with a hyphen (-). As values are expressed as ratios, a 0.58-fold downregulation correspond to a fold change of -1.7 . (PDF)

Table S2 Primers used for the quantitative RT-PCR. (PDF)

Acknowledgments

We thank Prof B. Betschart and Dr L. Gern, University of Neuchâtel, for their help in maintaining the tick colony, Prof B. Wilske, University of Munich and Prof E. Ruzic-Sabljic, University of Ljubljana for providing some of the *Borrelia* strains, Dr. J. Hovius for providing purified recombinant Salp15, C. Delena from the French National Reference Centre of *Borrelia* for culture of *Borrelia* strains, Dr. J. Godet, Université de Strasbourg, for his help in statistical analysis of ELISA and QRT-PCR results, Dr C. Ménard for technical assistance in the Limulustests, the REID "Tiques et maladies à tiques" and the GEBLY (Groupe d'Etude sur la Borréliose de Lyme) for their stimulating discussions. A. Kern was supported for her PhD by the Direction Générale de l'Armement and the Conseil Régional d'Alsace.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BJ NB. Performed the experiments: FS AK CB. Analyzed the data: FS AK SN NM. Contributed reagents/materials/analysis tools: FS SN NM. Wrote the paper: FS BJ NB.

References

- Piesman J, Gern L (2004) Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 129 Suppl: S191–220.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L (2004) The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest* 113: 1093–1101.
- van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, et al. (1993) Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 17: 708–717.
- Mülleger RR, Glatz M (2008) Skin manifestations of Lyme borreliosis: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 9: 355–368.
- Strle F, Stanek G (2009) Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. In: Lipsker D, Jaulhac B, editors *Curr Probl Dermatol*. Basel: Karger. 51–110.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17: 1063–1072.
- Sorrell JM, Caplan AI (2004) Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 117: 667–675.
- Sorrell JM, Caplan AI (2009) Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol* 276: 161–214.
- Saalbach A, Klein C, Sleeman J, Sack U, Kauer F, et al. (2007) Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells. *J Immunol* 178: 4966–4974.
- Figueira L, Nestle FO, Rittig M, Joller HI, Groscurth P (1996) Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 157: 2998–3005.

11. Suhonen J, Komi J, Soukka J, Lassila O, Viljanen MK (2003) Interaction between *Borrelia burgdorferi* and immature human dendritic cells. *Scand J Immunol* 58: 67–75.
12. Talkington J, Nickell SP (1999) *Borrelia burgdorferi* spirochetes induce mast cell activation and cytokine release. *Infect Immun* 67: 1107–1115.
13. Ebnat K, Brown KD, Siebenlist UK, Simon MM, Shaw S (1997) *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J Immunol* 158: 3285–3292.
14. Marchal C, Schramm F, Kern A, Luft BJ, Yang X, et al. (2011) Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. *Infect Immun* 79: 774–785.
15. Marchal CM, Luft BJ, Yang X, Sibilia J, Jaulhac B, et al. (2009) Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the in vitro interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*. *J Invest Dermatol* 129: 2515–2517.
16. Wu J, Weening EH, Faske JB, Hook M, Skare JT (2011) Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires b1 integrins and Src kinase activity. *Infect Immun* 79: 1338–1348.
17. Castelli E, Caputo V, Morello V, Tomasino RM (2008) Local reactions to tick bites. *Am J Dermatopathol* 30: 241–248.
18. Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, et al. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3142–3147.
19. Tilly K, Krum JG, Bestor A, Jewett MW, Grimm D, et al. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect Immun* 74: 3554–3564.
20. Deban L, Jaillon S, Garlanda C, Bottazzi B, Mantovani A (2011) Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res* 343: 237–249.
21. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, et al. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 856–862.
22. Hovius JW (2009) Spitting image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response. *J Invest Dermatol* 129: 2337–2339.
23. Hovius JW, Levi M, Fikrig E (2008) Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Med* 5: e43.
24. Fikrig E, Narasimhan S (2006) *Borrelia burgdorferi*—traveling incognito? *Microbes Infect* 8: 1390–1399.
25. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, et al. (2005) A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol* 26: 150–156.
26. Jones NC, Germain A, Riley KE, Bautista C, Taylor W, et al. (1994) *Borrelia burgdorferi* decreases hyaluronan synthesis but increases IL-6 production by fibroblasts. *Microb Pathog* 16: 261–267.
27. Müllegger RR, Means TK, Shin JJ, Lee M, Jones KL, et al. (2007) Chemokine signatures in the skin disorders of Lyme borreliosis in Europe: predominance of CXCL9 and CXCL10 in erythema migrans and acrodermatitis and CXCL13 in lymphocytoma. *Infect Immun* 75: 4621–4628.
28. de Koning J (1993) Histopathologic patterns of erythema migrans and borreliac lymphocytoma. *Clin Dermatol* 11: 377–383.
29. de Koning J, Tazelaar DJ, Hoogkamp-Korstanje JA, Elema JD (1995) Acrodermatitis chronica atrophicans: a light and electron microscopic study. *J Cutan Pathol* 22: 23–32.
30. Aberer E, Klade H, Hobisch G (1991) A clinical, histological, and immunohistochemical comparison of acrodermatitis chronica atrophicans and morphea. *Am J Dermatopathol* 13: 334–341.
31. Lin B, Kidder JM, Noring R, Steere AC, Klempner MS, et al. (2001) Differences in synovial fluid levels of matrix metalloproteinases suggest separate mechanisms of pathogenesis in Lyme arthritis before and after antibiotic treatment. *J Infect Dis* 184: 174–180.
32. Hu LT, Eskildsen MA, Masgala C, Steere AC, Arner EC, et al. (2001) Host metalloproteinases in Lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 1401–1410.
33. Behera AK, Thorpe CM, Kidder JM, Smith W, Hildebrand E, et al. (2004) *Borrelia burgdorferi*-induced expression of matrix metalloproteinases from human chondrocytes requires mitogen-activated protein kinase and Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription signaling pathways. *Infect Immun* 72: 2864–2871.
34. Gronski TJ Jr., Martin RL, Kobayashi DK, Walsh BC, Holman MC, et al. (1997) Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem* 272: 12189–12194.
35. Hartiala P, Hytonen J, Pelkonen J, Kimpka K, West A, et al. (2007) Transcriptional response of human dendritic cells to *Borrelia garinii*—defective CD38 and CCR7 expression detected. *J Leukoc Biol* 82: 33–43.
36. Salazar JC, Duhnam-Ems S, La Vake C, Cruz AR, Moore MW, et al. (2009) Activation of human monocytes by live *Borrelia burgdorferi* generates TLR2-dependent and -independent responses which include induction of IFN- γ . *PLoS Pathog* 5: e1000444.
37. Petzke MM, Brooks A, Krupna MA, Mordue D, Schwartz I (2009) Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *J Immunol* 183: 5279–5292.
38. Suhonen J, Hartiala K, Tuominen-Gustafsson H, Viljanen MK (2000) *Borrelia burgdorferi*-induced oxidative burst, calcium mobilization, and phagocytosis of human neutrophils are complement dependent. *J Infect Dis* 181: 195–202.
39. Cinco M, Murgia R, Perticarari S, Presani G (1994) Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and metabolic burst induced in phagocytic cells in whole blood by *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol Lett* 122: 187–193.
40. Pancewicz SA, Skrzydlewska E, Hermanowska-Szapkowicz T, Zajkowska JM, Kondrusik M (2001) Role of reactive oxygen species (ROS) in patients with erythema migrans, an early manifestation of Lyme borreliosis. *Med Sci Monit* 7: 1230–1235.
41. Skaleric U, Manthey CM, Mergenhagen SE, Gasparic B, Wahl SM (2000) Superoxide release and superoxide dismutase expression by human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 108: 130–135.
42. Smetanick MT, Zellis SL, Ermolovich T (2010) Acrodermatitis chronica atrophicans: a case report and review of the literature. *Cutis* 85: 247–252.
43. Picken RN, Strle F, Picken MM, Ruzic-Sabljic E, Marasin V, et al. (1998) Identification of three species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Invest Dermatol* 110: 211–214.
44. Schwan TG, Plesman J (2000) Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 38: 382–388.
45. Antonara S, Ristow L, McCarthy J, Coburn J (2010) Effect of *Borrelia burgdorferi* OspC at the site of inoculation in mouse skin. *Infect Immun* 78: 4723–4733.
46. Pal U, Yang X, Chen M, Bockenstedt LK, Anderson JF, et al. (2004) OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J Clin Invest* 113: 220–230.
47. Fikrig E, Feng W, Barthold SW, Telford SR, 3rd, Flavell RA (2000) Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbb32 expression and the inhibition of spirochete transmission. *J Immunol* 164: 5344–5351.
48. Liang FT, Brown EL, Wang T, Iozzo RV, Fikrig E (2004) Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *Am J Pathol* 165: 977–985.
49. Seshu J, Esteve-Gassent MD, Labandeira-Rey M, Kim JH, Trzeciakowski JP, et al. (2006) Inactivation of the fibronectin-binding adhesin gene bbb32 significantly attenuates the infectivity potential of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 59: 1591–1601.
50. LaFrance ME, Pierce JV, Antonara S, Coburn J (2011) The *Borrelia burgdorferi* integrin ligand P66 affects gene expression by human cells in culture. *Infect Immun* 79: 3249–3261.
51. Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT (2012) Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 10: 87–99.
52. Hajnicka V, Vancova-Sibraniova I, Slovak M, Kocakova P, Nuttall PA (2011) *Ixodes* tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *Int J Parasitol* 41: 213–223.
53. Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM (2009) The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 14: 2051–2088.
54. Barthold SW, Persing DH, Armstrong AL, Peoples RA (1991) Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am J Pathol* 139: 263–273.
55. Kern A, Collin E, Barthel C, Michel C, Jaulhac B, et al. (2011) Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of Lyme disease. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 1343–1350.
56. Diegmann J, Junker K, Gerstmayer B, Bošo A, Hindermann W, et al. (2005) Identification of CD70 as a diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Eur J Cancer* 41: 1794–1801.
57. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116–5121.
58. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, et al. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374–378.
59. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, et al. (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29: 365–371.

Table S1. Down-regulated genes in fibroblasts stimulated with *B. burgdorferi* in comparison to unstimulated fibroblasts

| Gene number | Annotation | N40 (tick) ¹ | Pbre (EM) ¹ | 1408 (ACA) ¹ | Description/Function |
|--------------|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---|
| | | | | | Cellular cycle |
| | | | | | DNA repair |
| NM_000107 | DDB2 | 0,44 | 0,76 | 0,47 | Component of the UV-damaged DNA-binding protein complex |
| NM_000400 | ERCC2 | 0,37 | 0,77 | 0,56 | Involved in nucleotide excision repair of DNA |
| NM_000122 | ERCC3 | 0,62 | 0,61 | 0,52 | Involved in nucleotide excision repair of DNA |
| NM_004629 | FANCG | 0,10 | 0,58 | 0,30 | Operate in a postreplication repair or a cell cycle checkpoint function |
| NM_001515 | GTF2H2 | 0,70 | 0,60 | 0,49 | Involved in nucleotide excision repair of DNA |
| NM_001516 | GTF2H3 | 0,53 | 0,54 | 0,59 | Involved in nucleotide excision repair of DNA |
| NM_002129 | HMGB2 | 0,37 | 0,65 | 0,39 | DNA double-strand breaks repair |
| NM_002945 | MAZ | 0,46 | 0,41 | 0,32 | May play a role in DNA repair |
| NM_002412 | MGMT | 0,48 | 0,66 | 0,56 | Repairs alkylated guanine in DNA |
| NM_005590 | MRE11A | 0,76 | 0,76 | 0,44 | Role in double-strand break repair |
| NM_000251 | MSH2 | 0,35 | 0,46 | 0,24 | Component of the post-replicative DNA mismatch repair system |
| NM_032853 | MUM-1 | 0,38 | 0,45 | 0,34 | Involved in the DNA damage response pathway |
| NM_001048171 | MUTYH | 0,26 | 0,62 | 0,28 | Involved in oxidative DNA damage repair |
| NM_002542 | OGG1 | 0,28 | 0,49 | 0,40 | DNA repair enzyme that incises DNA at 8-oxoG residues |
| NM_000534 | PMS1 | 0,61 | 0,73 | 0,48 | Probably involved in the repair of mismatches in DNA |
| NM_006502 | POLH | 0,33 | 0,76 | 0,40 | DNA polymerase specifically involved in DNA repair |
| NM_007195 | POLI | 0,72 | 0,78 | 0,46 | Error-prone DNA polymerase specifically involved in DNA repair |
| NM_006904 | PRKDC | 0,62 | 0,62 | 0,52 | Acts as a molecular sensor for DNA damage |
| NM_000380 | XPA | 0,47 | 0,82 | 0,38 | Involved in DNA excision repair |
| | | | | | Cell cycle control/Growth factors/Apoptosis |
| NM_001237 | CCNA2 | 0,40 | 0,68 | 0,46 | Cyclin-A2 |
| NM_001759 | CCND2 | 0,48 | 0,47 | 0,40 | G1/S-specific cyclin-D2 |
| NM_004354 | CCNG2 | 0,73 | 0,61 | 0,53 | Cyclin-G2 |
| NM_004935 | CDK5 | 0,69 | 0,69 | 0,57 | Cyclin-dependent kinase 5 |
| NM_001807 | CEL | 0,19 | 0,60 | 0,30 | Catalyzes fat and vitamin absorption |
| NM_001274 | CHEK1 | 0,52 | 0,55 | 0,30 | Cell cycle arrest in response to DNA damage |
| NM_004879 | EI24 | 0,44 | 0,65 | 0,57 | Etoposide-induced protein 2.4 homolog |
| NM_004095 | EIF4EBP1 | 0,46 | 0,69 | 0,63 | Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 |
| NM_001981 | EPS15 | 0,84 | 0,54 | 0,42 | Epidermal growth factor receptor substrate 15 |
| NM_004447 | EPS8 | 0,70 | 0,34 | 0,36 | Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 |
| NM_001005862 | ERBB2 | 0,41 | 0,62 | 0,52 | Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 |
| NM_002010 | FGF9 | 0,58 | 0,70 | 0,57 | Fibroblast growth factor 9 |
| NM_000557 | GDF5 | 0,44 | 0,48 | 0,55 | Growth/differentiation factor 5 |
| NM_000598 | IGFBP3 | 0,48 | 0,53 | 0,37 | Insulin-like growth factor-binding protein 3 |
| NM_005916 | MCM7 | 0,39 | 0,59 | 0,40 | DNA replication initiation and elongation |
| NM_001033053 | NLRP1 | 0,74 | 0,53 | 0,59 | Mediator of apoptosis |
| NM_002514 | NOV | 0,58 | 0,70 | 0,56 | Insulin-like growth factor-binding protein 9 |
| NM_002873 | RAD17 | 0,41 | 0,55 | 0,38 | Cell cycle checkpoint protein RAD17 |
| NM_181471 | RFC2 | 0,54 | 0,69 | 0,49 | Replication factor C subunit 2 |
| NM_003118 | SPARC | 0,88 | 0,49 | 0,55 | Regulate cell growth |
| NM_000660 | TGFB1 | 0,61 | 0,56 | 0,41 | Transforming growth factor β 1 |
| NM_012473 | TXN2 | 0,55 | 0,71 | 0,61 | Thioredoxin-2 |
| NM_181573 | RFC4 | 0,22 | - | 0,49 | Replication factor C subunit 4 |
| NM_181578 | RFC5 | 0,47 | - | 0,47 | Replication factor C subunit 5 |
| | | | | | Morphogenesis |
| NM_006735 | HOXA2 | 0,12 | 0,53 | 0,26 | Homeobox protein Hox-A2 |

| Gene number | Annotation | N40 (tick) ¹ | Pbre (EM) ¹ | 1408 (ACA) ¹ | Description/Function |
|--------------|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---|
| NM_002148 | HOXD10 | 0,51 | 0,59 | 0,61 | Homeobox protein Hox-D10 |
| NM_003240 | LEFTY2 | 0,24 | 0,45 | 0,46 | Required for left-right asymmetry determination of organ systems |
| | | | | | Various cellular metabolisms and functions |
| NM_005689 | ATP6B | 0,45 | 0,69 | 0,53 | Mitochondrial ATP-binding cassette sub-family B member 6 |
| NM_000667 | ADH1C | 0,42 | 0,74 | 0,20 | Alcohol dehydrogenase 1C |
| NM_000029 | AGT | 0,24 | 0,54 | 0,61 | Component of the renin-angiotensin system |
| NM_001002857 | ANXA2 | 0,54 | 0,77 | 0,56 | Annexin A2 |
| NM_000038 | APC | 0,69 | 0,45 | 0,36 | Tumor suppressor |
| NM_019893 | ASAH2 | 0,50 | 0,64 | 0,57 | Neutral ceramidase |
| NM_016115 | ASB3 | 0,65 | 0,67 | 0,44 | Mediates ubiquitination and proteasomal degradation of proteins |
| NM_004656 | BAP1 | 0,65 | 0,55 | 0,36 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1 |
| NM_001747 | CAPG | 0,52 | 0,72 | 0,59 | Reversibly blocks the barbed ends of actin filaments |
| NM_001752 | CAT | 0,55 | 0,86 | 0,53 | Catalase |
| NM_016174 | CERCAM | 0,72 | 0,57 | 0,57 | Glycosyltransferase 25 family member 3 |
| NM_001823 | CKB | 0,37 | 0,75 | 0,51 | Creatine kinase B-type |
| NM_001831 | CLU | 0,68 | 0,79 | 0,32 | Clusterin |
| NM_020441 | CORO1B | 0,58 | 0,52 | 0,54 | WD repeat-containing actin-binding proteins that regulate cell motility |
| NM_014325 | CORO1C | 0,74 | 0,77 | 0,53 | WD repeat-containing actin-binding proteins that regulate cell motility |
| NM_003389 | CORO2A | 0,52 | 0,79 | 0,77 | WD repeat-containing actin-binding proteins that regulate cell motility |
| NM_000755 | CRAT | 0,70 | 0,41 | 0,64 | Carnitine O-acetyltransferase |
| NM_001885 | CRYAB | 0,52 | 0,71 | 0,67 | Heat shock protein β 5 |
| NM_001964 | EGR1 | 0,52 | 0,54 | 0,52 | Early growth response protein 1 |
| NM_001979 | EPHX2 | 0,32 | 0,61 | 0,34 | Cytosolic epoxide hydrolase |
| NM_002685 | EXOSC10 | 0,63 | 0,45 | 0,58 | Exosome component 10 |
| NM_001444 | FABP5 | 0,41 | 0,89 | 0,59 | Epidermal-type fatty acid-binding protein |
| NM_004104 | FASN | 0,62 | 0,52 | 0,47 | Catalyzes the formation of long-chain fatty acids |
| NM_013451 | FER1L3 | 0,75 | 0,59 | 0,40 | Calcium/phospholipid-binding protein |
| NM_054033 | FKBP1B | 0,55 | 0,92 | 0,57 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1B |
| NM_012181 | FKBP38 | 0,75 | 0,52 | 0,38 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase |
| NM_000147 | FUCA1 | 0,24 | 0,18 | 0,19 | Alpha-L-fucosidase |
| NM_000402 | G6PD | 0,98 | 0,55 | 0,55 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase |
| NM_002079 | GOT1 | 0,64 | 0,56 | 0,54 | Cytoplasmic aspartate aminotransferase |
| NM_000561 | GSTM1 | 0,41 | 0,90 | 0,53 | Glutathione S-transferase Mu 1 |
| NM_004285 | H6PD | 0,68 | 0,50 | 0,42 | (GDH) Oxidizes glucose-6-phosphate and glucose |
| NM_032495 | HOPX | 0,44 | 0,31 | 0,34 | Homeodomain-only protein |
| NM_002154 | HSPA4 | 0,67 | 0,61 | 0,34 | Heat Shock Protein 70 kDa |
| NM_014278 | HSPA4L | 0,50 | 0,55 | 0,67 | Heat Shock Protein 70 kDa |
| NM_001541 | HSPB2 | 0,48 | 0,66 | 0,55 | Heat Shock Protein β 2 |
| NM_006308 | HSPB3 | 0,48 | 0,44 | 0,95 | Heat Shock Protein 17 kDa |
| NM_002383 | MAZ | 0,42 | 0,34 | 0,34 | Myc-associated zinc finger protein |
| NM_033316 | MFI2 | 0,26 | 0,36 | 0,17 | Involved in iron cellular uptake |
| NM_002413 | MGST2 | 0,25 | 0,49 | 0,40 | Microsomal glutathione S-transferase 2 |
| NM_004689 | MTA1 | 0,64 | 0,44 | 0,48 | Component of the nucleosome-remodeling complex |
| NM_005967 | NAB2 | 0,41 | 0,34 | 0,42 | Transcriptional repressor for zinc finger transcription factors |
| NM_002513 | NME3 | 0,56 | 0,81 | 0,60 | Nucleoside diphosphate kinase 3 |
| NM_002452 | NUDT1 | 0,53 | 0,91 | 0,56 | 7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase |
| NM_002539 | ODC1 | 0,34 | 0,86 | 0,43 | Ornithine decarboxylase |
| NM_002622 | PFDN1 | 0,75 | 0,35 | 0,60 | Prefoldin subunit 1 |
| NM_000954 | PGHD | 0,38 | 0,76 | 0,72 | Prostaglandin-H2 D-isomerase |
| NM_001012973 | PLAC9 | 0,55 | 0,80 | 0,62 | Placenta-specific protein 9 |
| NM_002691 | POLD1 | 0,56 | 0,79 | 0,69 | DNA polymerase delta catalytic subunit |

| Gene number | Annotation | N40 (tick) ¹ | Pbre (EM) ¹ | 1408 (ACA) ¹ | Description/Function |
|--------------|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--|
| NM_021173 | POLD4 | 0,56 | 0,60 | 0,60 | DNA polymerase delta subunit 4 |
| NM_006347 | PPIH | 0,48 | 0,76 | 0,61 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H |
| NM_014225 | PPP2R1A | 0,74 | 0,46 | 0,53 | Required for proper chromosome segregation |
| NM_002744 | PRKCZ | 0,47 | 0,39 | 0,36 | Protein kinase C zeta type |
| NM_006743 | RBM3 | 0,53 | 0,78 | 0,66 | Putative RNA-binding protein 3 |
| NM_005415 | SLC20A1 | 0,57 | 0,59 | 0,49 | Sodium-dependent phosphate transporter 1 |
| NM_003062 | SLIT3 | 0,51 | 0,60 | 0,50 | May act as molecular guidance cue in cellular migration |
| NM_005563 | STMN1 | 0,33 | 0,49 | 0,42 | Involved in the regulation of the microtubule filament system |
| NM_005420 | SULT1E1 | 0,48 | 0,80 | 0,47 | Estrogen sulfotransferase |
| NM_003186 | TAGLN | 0,47 | 0,57 | 0,55 | Involved in calcium interactions |
| NM_007111 | TFDP1 | 0,97 | 0,53 | 0,56 | Transcription factor Dp-1 |
| NM_003258 | TK1 | 0,47 | 0,49 | 0,48 | Thymidine kinase |
| NM_003286 | TOP1 | 0,65 | 0,54 | 0,64 | DNA topoisomerase 1 |
| NM_016292 | TRAP1 | 0,43 | 0,73 | 0,55 | Heat Shock Protein 75 kDa |
| NM_001071 | TYMS | 0,48 | 0,70 | 0,64 | Thymidylate synthase |
| NM_002658 | UPA | 0,44 | 0,94 | 0,55 | Urokinase-type plasminogen activator |
| NM_016206 | VGLL3 | 0,35 | 0,80 | 0,40 | Transcription cofactor vestigial-like protein 3 |
| NM_006112 | PPIE | 0,54 | 0,75 | 0,69 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E |
| NM_000945 | PPP3R1 | 0,55 | 0,79 | 0,62 | Calcineurin subunit B type 1 |
| NM_001032364 | GGT2 | 0,54 | 0,71 | 0,64 | Gamma-glutamyltranspeptidase 2 |
| NM_004542 | NDUFA3 | 0,57 | 0,71 | 0,67 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3 |
| NM_199173 | BGLAP | 0,56 | - | 0,60 | Gamma-carboxyglutamic acid-containing protein |
| NM_001873 | CPE | 0,78 | - | 0,47 | Carboxypeptidase E |
| NM_004368 | CNN2 | 0,55 | - | 0,72 | Calponin-2 |
| NM_022833 | FAM129B | 0,68 | - | 0,54 | Niban-like protein 1 |
| NM_000148 | FUT1 | 0,32 | - | 0,44 | Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 1 |
| NM_002284 | KRT86 | 0,55 | - | 0,59 | Keratin, type II cuticular Hb6 |
| NM_002363 | MAGEB1 | 0,38 | - | 0,49 | Melanoma-associated antigen B1 |
| NM_021724 | NR1D1 | 0,71 | - | 0,47 | Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 |
| | | | | | Extra-cellular matrix |
| NM_001999 | FBN2 | 0,64 | 1,43 | 0,51 | Structural component of elastic fibers |
| NM_003480 | MFAP5 | 0,86 | 0,60 | 0,37 | Component of the elastin-associated microfibrils |
| NM_022564 | MMP16 | - | 0,62 | 0,10 | Matrix metalloproteinase-16 |
| | | | | | Cell-matrix interactions |
| NM_002204 | ITGA3 | 0,33 | 0,28 | 0,47 | Integrin α 3 |
| NM_000885 | ITGA4 | 0,53 | 0,65 | 0,46 | Integrin α 4 |
| NM_000210 | ITGA6 | 0,51 | 0,71 | 0,55 | Integrin α 6 |
| NM_001937 | DPT | 0,65 | 0,59 | 0,53 | Dermatopontin |
| NM_000425 | L1CAM | 0,60 | 0,79 | 0,52 | Cell adhesion molecule |
| NM_003573 | LTBP4 | 0,56 | 0,44 | 0,43 | Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4 |
| | | | | | Cell architecture |
| NM_001615 | ACTG2 | 0,56 | 0,55 | 0,56 | Alpha-actin-3 |
| NM_014756 | CKAP5 | 0,68 | 0,52 | 0,58 | Cytoskeleton-associated protein 5 |
| NM_000428 | LTBP2 | 0,55 | 0,55 | 0,12 | Role in elastic-fiber architectural organization and/or assembly |
| NM_018718 | TSGA14 | 0,39 | 0,63 | 0,52 | Centrosomal protein of 41 kDa |
| NM_006009 | TUBA1B | 0,49 | 0,86 | 0,72 | Tubulin alpha-1B chain, component of microtubules |
| NM_178014 | TUBB | 0,93 | 0,52 | 0,65 | Tubulin beta-5 chain, component of microtubules |

¹Values shown correspond to a ratio determined between normalized gene intensity values obtained after 24 hours of fibroblast stimulation with *B. burgdorferi* (MOI 100:1) compared with gene intensity values from unstimulated cells. Missing values are indicated with a hyphen (-).

Table S2. Primers used for the quantitative RT-PCR

| Primer type | | Sequence | Source or reference |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Actin | Forward | 5'- CCA ACC GCG AGA AGA TGA CC -3' | Designed in this study |
| | Reverse | 5'- GAT CTT CAT GAG GTA GTC AGT -3' | |
| RNAPol2 | Forward | 5'- GCA CCA CGT CCA ATG ACA T -3' | Radonic, 2004 |
| | Reverse | 5'- GTG CGG CTG CTT CCA TAA -3' | |
| IL-8 | Forward | 5'- TCT GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA GTT -3' | Marchal, 2011 |
| | Reverse | 5'- AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC CTT -3' | |
| IL-6 | Forward | 5'- CCA GAA CAG ATT TGA GAG -3' | Designed in this study |
| | Reverse | 5'- CTA CAT TTG CCG AAG AGC -3' | |
| CXCL1 | Forward | F : 5'- GTC ACT GTT CAG CAT CTT TTC G -3' | Designed in this study |
| | Reverse | R : 5'- CTG CAT CCC CCA TAG TTA AGA A -3' | |
| MMP12 | Forward | F : 5'- TGG CAT TCA GTC CCT GTA TGG AGA -3' | Designed in this study |
| | Reverse | R : 5'- TCC CAC GGT AGT GAC AGC ATC AA -3' | |
| SOD2 | Forward | F : 5'- TCG TGG CTG TGG TGG CTT CG -3' | Designed in this study |
| | Reverse | R : 5'- CCT GCT GGT GCC GCA CAC T -3' | |

DISCUSSION

I DISCUSSION TECHNIQUE

1 *IN VITRO ET IN VIVO*

L'étude des aspects physiopathologiques de la borréliose de Lyme repose sur des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*. Les approches *in vivo* permettent une étude globale des interactions entre la bactérie et son hôte. Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour l'étude de la maladie : la souris, le rat¹⁴⁷ [Barthold et coll., 1988], le lapin (dont l'intérêt principal est de présenter, comme l'être humain, un érythème migrant) [Foley et coll., 1995], le chien [Straubinger et coll., 1997] ou encore le macaque rhésus, qui constitue également un bon modèle d'étude, en raison de l'évolution de la maladie en phase précoce localisée et précoce disséminée [Philipp et coll., 1993] et des manifestations neurologiques présentées par l'animal [Pachner et coll., 1995], mais dont les contraintes logistiques et éthiques associées en limitent considérablement l'utilisation à des fins de recherche. Le modèle *in vivo* de la borréliose de Lyme le plus couramment utilisé reste le modèle murin. Les souris de type C3H/He sont les plus sensibles à l'infection par *Borrelia* : les souris infectées présentent en particulier d'importantes atteintes articulaires et cardiaques [Barthold et coll., 1990]. Ce modèle permet notamment l'étude de la transmission et de la dissémination des bactéries, ainsi que l'étude ciblée des manifestations rhumatologiques et cardiaques de la maladie. Néanmoins, quel que soit le fond génétique utilisé, les souris ne développent ni érythème migrant, ni ACA, qui représentent pourtant chez l'homme deux des trois principales manifestations cutanées de la maladie.

¹⁴⁷ Le rat développe des arthrites.

Les approches *in vitro* permettent l'utilisation de matériel d'origine humaine, et l'étude spécifique des interactions entre *Borrelia* et un type cellulaire donné (ou l'association de plusieurs types cellulaires dans les modèles organotypiques). Les informations obtenues sont donc plus ciblées. Cependant, l'avantage conféré par la possibilité d'étudier les réponses cellulaires individuelles à la stimulation par le pathogène est à mettre en balance avec les biais liés à l'absence des autres acteurs cellulaires et des coopérations cellulaires établies dans le microenvironnement réel chez l'homme (mais les modèles organotypiques visant à mimer plus précisément le contexte tissulaire approchent cependant un peu plus la réalité que les modèles *in vitro* monocellulaires). Dans notre laboratoire, les deux approches expérimentales – *in vivo* sur modèle murin [Kern, 2011], et *in vitro* sur cultures de cellules humaines primaires – ont été développées en parallèle, et ce manuscrit présente les résultats du travail effectué *in vitro*.

2 CHOIX DES CELLULES ÉTUDIÉES : KÉRATINOCYTES ET FIBROBLASTES

Les kératinocytes sont les cellules résidentes principales de l'épiderme. Nous avons choisi d'étudier la réponse des kératinocytes à l'infection par *Borrelia*, car ce sont les premières cellules que rencontrent les pièces piqueuses de la tique et la salive qui véhicule *Borrelia* dans la peau. Par ailleurs, les kératinocytes sont de véritables cellules sentinelles de l'interface cutanée : les récepteurs TLRs qu'ils expriment permettent la reconnaissance de motifs spécifiquement exprimés à la surface des pathogènes (PAMPs), induisant la synthèse de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens, qui constituent autant de « signaux de dangers » capables d'activer les réponses immunitaires spécialisées [Nestle et coll., 2009]. Enfin, notre équipe avait montré sur un modèle de culture *in vitro* de kératinocytes humains primaires que *Borrelia* induit la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (IL-8 et hBD-2), et que cette synthèse est inhibée par la présence d'extraits salivaires de tique [Marchal et coll., 2009]. Ce système expérimental constitue donc un bon choix pour étudier de façon plus précise l'impact de la salive de tique sur la réponse immunitaire innée cutanée à l'infection par *Borrelia*.

Après le travail réalisé sur les cellules résidentes principales de l'épiderme, nous avons voulu étudier la participation des fibroblastes cutanés à la réponse inflammatoire observée lors des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme. La pertinence du choix des fibroblastes comme modèle d'étude repose sur les éléments suivants :

- lors d'une piqûre de tique, les pièces piqueuses pénètrent profondément dans la peau : la salive de tique et les *Borrelia* qui y transitent sont injectées jusqu'au contact direct du derme [Castelli et coll., 2008] ;
- outre leur rôle dans les mécanismes de synthèse et de remodelage de la matrice extracellulaire (voir chapitre « La matrice extracellulaire », page 21), les fibroblastes sont, à

l'image des kératinocytes, des cellules sentinelles qui participent aux défenses immunitaires de la peau [Smith et coll., 1997; Saalbach et coll., 2007] ;

— un premier travail réalisé par notre équipe avait montré sur un modèle de culture *in vitro* de fibroblastes humains primaires que *Borrelia* induit la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (IL-8, LL-37 et hBD-2) [Marchal et coll., 2009] ;

— des travaux récents montrent que *Borrelia* est capable de pénétrer et de survivre à l'intérieur des fibroblastes [Wu et coll., 2011] : les fibroblastes pourraient ainsi constituer pour *Borrelia* un « sanctuaire » à l'abri des défenses immunitaires.

3 CHOIX DES SPIROCHÈTES UTILISÉS ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DE CULTURE

Toutes les souches testées dans les deux études présentées plus haut (N40, B31, 297 pour l'étude sur les kératinocytes ; N40, Pbre, 1 408 et 297 pour l'étude sur les fibroblastes) appartiennent à l'espèce *B. burgdorferi* ss. Les souches N40 [Anderson et coll., 1990] et B31 [Burgdorfer et coll., 1982] isolées de tiques *I. scapularis*, très largement utilisées dans les travaux de recherche sur la borréliose de Lyme, ont été choisies comme souches de référence. La souche native 297 (isolée du liquide céphalorachidien d'un patient atteint de neuroborréliose [Steere et coll., 1983]) et les constructions mutées/complémentées pour la lipoprotéine OspC [Pal et coll., 2004b] (fournies par X. Yang¹⁴⁸) dont nous disposions au laboratoire ont été choisies pour l'étude du rôle d'OspC dans notre modèle expérimental. Les souches Pbre et 1 408, respectivement isolées de biopsies cutanées de lésions d'érythème migrant et d'acrodermatite chronique, ont été choisies pour leur caractère pathogène et leur origine clinique humaine ; leur virulence a été également reproduite sur modèle murin [De Martino, 2007].

Toutes les souches ont été cultivées dans les mêmes conditions ; seul le temps de culture (fonction du délai de croissance de chacune des souches) nécessaire à l'obtention d'un nombre suffisant de spirochètes variait d'une souche à l'autre. Nous avons essayé de limiter au maximum les biais relatifs à la perte de plasmides lors des repiquages successifs en cultures *in vitro*, et dont l'association avec une perte potentielle de virulence est bien connue [Stewart et coll., 2005]. Pour atteindre cet objectif, toutes les souches testées ont été utilisées à faible passage ($n \leq 8$), et l'intégralité des expériences concernant une souche donnée a été effectuée à partir de fractions d'un seul et unique lot de bactéries d'un même passage.

¹⁴⁸ Stony Brook University, Division of Infectious Diseases, Stony Brook, New York 11794-8153.

Bien que l'effet du milieu de culture des *Borrelia* (milieu BSK¹⁴⁹) sur les cellules utilisées semble négligeable par rapport à la stimulation cellulaire obtenue après inoculation des bactéries [Marchal, 2009], la réalisation d'une étape de lavage des spirochètes avant inoculation des cultures cellulaires permet d'éliminer tout risque potentiellement lié à une activation non spécifique des cellules testées par le milieu BSK.

¹⁴⁹ BSK : Barbour – Stoenner – Kelly.

4 PRÉPARATION DES EXTRAITS DE GLANDES SALIVAIRES DE TIQUE

Les extraits salivaires utilisés ont été préparés après dissection de glandes salivaires de tiques femelles adultes *I. ricinus* après gorgement sur animal (souris ou lapin), de manière à ce que la composition de la salive recueillie soit la plus proche possible de celle réellement sécrétée lors d'une piqûre de tique. La contamination bactérienne des extraits protéiques a été limitée au maximum par les précautions prises lors de la dissection des tiques (stérilisation des pinces à disséquer et des lames porte-objet ; bain d'éthanol puis de PBS¹⁵⁰ avant la dissection des glandes salivaires ; attention particulière portée pour éviter toute lésion du tube digestif de la tique). L'absence d'endotoxine dans les extraits protéiques (vérifiée par le test du lysat d'amœbocytes de limule) a constitué une condition préalable indispensable à leur utilisation dans tous nos tests *in vitro*, afin d'éviter toute stimulation cellulaire par du LPS de bactéries ayant potentiellement contaminé les préparations salivaires. Enfin, la concentration finale (20 µg/mL) d'extraits protéiques de glandes salivaires utilisée pour nos tests *in vitro* représente l'équivalent moyen (pour un puits contenant 1 mL de milieu) de la quantité de protéine obtenue à partir d'une tique.

¹⁵⁰ PBS : *phosphate buffered saline*.

5 ANALYSE DES *MICROARRAYS*

L'analyse du profil transcriptionnel des fibroblastes stimulés par *Borrelia* reposait dans notre étude sur la technique des *microarrays*. Nous avons choisi de travailler sur les puces PIQOR™ Skin cDNA Microarray, commercialisées par la société Miltenyi, car elles nous semblaient constituer un bon compromis entre le coût unitaire des puces, et le nombre et la nature des gènes étudiés¹⁵¹, par rapport aux puces permettant l'analyse du génome complet. Quelle que soit la technologie utilisée, l'analyse de données *microarrays* (identification des gènes significativement régulés) est rendue difficile par les biais inhérents à la **variabilité biologique** des échantillons testés, et la **variabilité technique** du processus analytique [Hatfield et coll., 2003]. Les différents paramètres dont l'impact sur la variabilité biologique pouvait être maîtrisé ont fait l'objet d'une attention particulière : ils concernent à la fois les spirochètes et les extraits salivaires testés (voir ci-dessus), ainsi que les cellules mises en culture (utilisation d'un seul et unique lot de cellules avec un nombre de passages limités avant mise en plaque, conditions expérimentales entre les essais similaires – milieux de culture, température et durée d'incubation, manipulations postincubation des surnageants et des cellules). La variabilité technique, dont les effets s'ajoutent à chaque étape du processus analytique (conservation des cellules avant extraction des acides nucléiques, extraction, amplification, marquage, hybridation et lecture) [Hatfield et coll., 2003], a été limitée par :

- l'utilisation d'un protocole analytique standardisé [Diegmann et coll., 2005];
- la présence en quatre exemplaires de chaque sonde sur les puces, limitant les biais liés à l'étape d'hybridation (normalisation intraplaque).

¹⁵¹ Les puces PIQOR™ Skin cDNA comprennent une sélection de 1 302 gènes, représentative des gènes habituellement exprimés dans la peau saine.

Enfin, pour que nos résultats soient analysables sur le plan statistique, deux réplicats biologiques ont été réalisés de façon indépendante pour les trois conditions expérimentales testées (comparaison du profil transcriptionnel des fibroblastes stimulés par trois souches différentes de *Borrelia* avec les fibroblastes témoins non stimulés). L'utilisation d'un nombre plus important de réplicats biologiques aurait pu permettre la mise en évidence d'un plus grand nombre de différences intersouches que celles que nous avons observées [Lee et coll., 2000] ; néanmoins, la normalisation interplaque¹⁵² [Simon et coll., 2007], puis l'analyse statistique globale des données *microarrays* [Tusher et coll., 2001] – mise en évidence des gènes différentiellement régulés, et comparaison intersouche des profils transcriptionnels induits – ont été réalisées en intégrant pour chaque gène les six valeurs disponibles (deux réplicats biologiques pour trois conditions expérimentales), augmentant ainsi la puissance globale de l'analyse statistique.

¹⁵² Normalisation par centrage de la médiane des *log ratios* (réalisée par le logiciel BRB-ArrayTools).

II DISCUSSION SCIENTIFIQUE

1 LA SALIVE DE TIQUE DANS LA TRANSMISSION DE *BORRELIA*

La transmission de *Borrelia* par la tique revêt une problématique bien différente de celle d'autres agents pathogènes, comme certains arbovirus – virus West-Nile, virus de la dengue, virus du chikungunya – [Schneider et coll., 2008], les plasmodiums responsables du paludisme [Cohuet et coll., 2010], ou encore les leishmanies [Andrade et coll., 2007], transmis par l'intermédiaire d'insectes hématophages dont le repas sanguin est de courte durée. Alors que dans le paludisme par exemple, les sporozoïtes sont déjà présents dans les glandes salivaires du moustique vecteur (une femelle du genre *Anopheles*), et sont transmis au moment même de la piqûre par le moustique [Ghosh et coll., 2009], la transmission de *Borrelia* ne survient – au plus tôt – que plusieurs heures après la piqûre de tique – dont le repas sanguin s'étale quant à lui sur plusieurs jours [Piesman et coll., 1987; Kahl et coll., 1998; Crippa et coll., 2002; Hojgaard et coll., 2008]. Pendant tout ce laps de temps, les défenses de la peau ont le temps de s'organiser et de produire leurs effets, et c'est probablement pourquoi les mécanismes antihémostatiques, antalgiques/anti-inflammatoires et immunomodulateurs élaborés par la tique pour faire obstacle à ces défenses sont aussi variés et complexes [Francischetti et coll., 2009]. Bien qu'il semble contre-intuitif qu'une bactérie aussi fragile que *Borrelia* puisse survivre et proliférer dans un environnement aussi hostile que celui représenté par la poche sanguine dans laquelle les pièces piqueuses de la tique sont insérées et où les défenses de l'hôte tentent de se mettre en place, les propriétés immunomodulatrices complexes de la salive de tique [Hovius, 2009; Marchal et coll., 2009] confèrent au contraire aux spirochètes transmis un réel avantage pour leur implantation cutanée locale initiale, leur multiplication, et leur future dissémination (voir « Contribution de

la salive de tique aux mécanismes d'échappement de *Borrelia* », page 108). Les études que nous avons réalisées sur les deux principales populations de cellules résidentes de la peau, que représentent respectivement les kératinocytes dans l'épiderme et les fibroblastes dans le derme, nous ont permis de mettre en évidence deux nouvelles fonctions de la salive de tique.

Effet antialarmine de la salive de tique

Alors que les premiers travaux de notre équipe montraient que la salive de tique inhibe la réponse inflammatoire des kératinocytes induite par *Borrelia* [Marchal et coll., 2009], nos nouveaux travaux, qui viennent compléter ces observations initiales, montrent aussi que la salive de tique et sa protéine Salp15 inhibent la synthèse par les kératinocytes de plusieurs chimiokines et de plusieurs peptides antimicrobiens [Marchal et coll., 2011]. Par ailleurs, nos résultats indiquent que les deux principaux d'entre eux – la défensine hBD-2 et la cathélicidine LL-37 – n'ont pas d'effet bactéricide sur *Borrelia*, mais inhibent simplement – et de façon transitoire uniquement – la mobilité des spirochètes. L'abolition de cet effet sur les spirochètes ne représente vraisemblablement pas pour *Borrelia* un avantage direct capital pour sa multiplication et son développement dans la peau. En revanche, l'inhibition par la salive de tique de la synthèse de chimiokines et de peptides antimicrobiens, conduisant *de facto* à l'abolition de leurs propriétés chimioattractantes (qui en font de véritables signaux de dangers capables d'activer le système immunitaire) et donc à l'inhibition d'un pan entier du système d'alerte de la réponse immunitaire innée cutanée [Oppenheim et coll., 2007], constitue probablement un avantage indirect majeur pour *Borrelia*. Nous émettons donc l'hypothèse que la salive de tique et la protéine Salp15 possèdent une activité « antialarmine » (non décrite jusqu'à présent), qui participe aux mécanismes d'échappement de *Borrelia* à la réponse immunitaire innée cutanée.

Effet lytique de la salive de tique sur les fibroblastes cutanés humains

Alors que, dans notre système expérimental, les effets de la salive de tique sur les kératinocytes inhibent la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires sans qu'aucune altération morphologique des cellules survienne, l'utilisation de concentrations identiques d'extraits salivaires sur les cultures de fibroblastes cutanés humains primaires conduit au contraire à une altération morphologique franche et rapide, aboutissant finalement à la lyse de ces cellules. Nous avons par ailleurs montré que cet effet lytique de la salive de tique sur les cultures de fibroblastes est dose-dépendant et de nature protéique, mais non lié à la protéine Salp15. Une toxicité cellulaire de la salive de tique a précédemment été observée par Hajnickà et coll., avec une méthode de préparation des extraits salivaires et des concentrations finales équivalentes à celles que nous avons utilisées : cette équipe montrait d'une part que la salive d'*I. ricinus* (ainsi que celle d'une autre tique dure *A. variegatum*) inhibe la prolifération d'une lignée de fibroblastes murins¹⁵³, et d'autre part que la salive d'*A. variegatum* testée sur la même lignée murine ainsi que sur une lignée de fibroblastes humains¹⁵⁴ induit l'altération morphologique puis la lyse de ces cellules [Hajnicka et coll., 2011], de façon similaire à ce que nous avons observé dans notre étude sur des fibroblastes cutanés humains primaires. L'altération des fonctions – voire l'atteinte de l'intégrité cellulaire – par la salive de tique *I. scapularis* a aussi été décrite sur d'autres types cellulaires, comme les polynucléaires neutrophiles [Montgomery et coll., 2004], ou les cellules endothéliales [Francischetti et coll., 2005a].

Les fibroblastes jouent un rôle déterminant dans les mécanismes de cicatrisation cutanée [Martin, 1997; Singer et coll., 1999] : par le KGF qu'ils synthétisent, les fibroblastes stimulent les kératinocytes et favorisent la réépithélialisation de la plaie [Werner, 1998] ; par

¹⁵³ Cellules NIH-3T3.

¹⁵⁴ Cellules MRC-5.

la synthèse de facteurs proangiogéniques – VEGFs¹⁵⁵, FGFs¹⁵⁶, TGF-β1, angiopoïétine-1 – [Jain, 2003], les fibroblastes favorisent la revascularisation du tissu lésé ; par leur rôle central dans les mécanismes de destruction/remodelage de la matrice extracellulaire [Sorrell et coll., 2009], ainsi que par les propriétés contractiles acquises lors de leur transformation myofibroblastique [Desmouliere et coll., 2005], les fibroblastes participent à la formation, puis à la contraction du tissu de granulation. Ainsi, l'effet lytique de la salive de tique sur les fibroblastes cutanés humains que nous avons mis en évidence *in vitro* nous laisse envisager l'hypothèse que cet effet pourrait contribuer *in vivo* à l'inhibition du processus de cicatrisation cutanée. Cette activité cytotoxique directe de la salive de tique sur les fibroblastes (non décrite jusqu'à présent) complète ainsi l'éventail déjà très largement décrit des activités pharmacologiques et immunomodulatrices de la salive de tique [Francischetti et coll., 2009], qui – par leurs effets inhibiteurs sur l'hémostase (coagulation, agrégation plaquettaire, vasoconstriction), la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire innée cutanée – permettent le maintien de la blessure cutanée, la poursuite du repas sanguin durant les quelques jours que dure celui-ci, et favorisent ainsi indirectement la transmission de *Borrelia* dans la peau.

¹⁵⁵ VEGF : *v*ascular *e*ndothelial *g*rowth *f*actor.

¹⁵⁶ FGF : *f*ibroblast *g*rowth *f*actor.

2 INFLAMMATION CUTANÉE DANS LA BORRÉLIOSE DE LYME

Il est important de garder à l'esprit que la plupart des effets (pharmacologiques et immunologiques) de la salive de tique, aussi variés et puissants qu'ils soient [Francischetti et coll., 2009], sont limités à la fois dans le temps et dans l'espace, à la seule durée du repas sanguin et à la seule région cutanée concernée par la piqûre de tique. C'est pourquoi les nouvelles fonctions de la salive de tique que notre travail de recherche a permis de mettre en évidence (inhibition de la réponse inflammatoire liée à l'effet « antialarmine » sur les kératinocytes, inhibition possible de la cicatrisation cutanée liée à l'effet cytotoxique direct sur les fibroblastes) ne sont à considérer que dans le contexte initial de la piqûre de tique et de la transmission cutanée de *Borrelia*.

Ainsi, même si la destruction probable des fibroblastes par la salive de tique au site de la piqûre de tique exclut *a priori* une participation importante de ces cellules dans le devenir initial des spirochètes injectés, la réponse transcriptionnelle observée sur nos cultures de fibroblastes (ou de kératinocytes) après stimulation par *Borrelia* (mais en absence d'extraits protéiques de glandes salivaires de tique) est probablement un bon reflet de la réponse *in vivo* des fibroblastes (ou des kératinocytes) à l'infection par *Borrelia*, lorsque les effets de la salive de tique se sont dissipés après le détachement de la tique et/ou lorsque les spirochètes ayant migré dans la peau ne sont plus soumis à ces mêmes effets. Parmi l'ensemble des modifications transcriptionnelles que nous avons observées dans les fibroblastes, la régulation positive de signaux pro-inflammatoires (comme la cytokine IL-6 et les chimiokines IL-8 et CXCL1) est probablement un déterminant majeur dans la physiopathologie des lésions cutanées observées. La synthèse de nombreuses cytokines et chimiokines par les fibroblastes cutanés humains avait déjà été décrite dans des modèles *in vitro* [Jones et coll., 1994; Ebnet et coll., 1997], et des études réalisées à partir de biopsies cutanées de lésions d'érythème migrant, de lymphocytome borrélien et d'acrodermatite chronique, examinées *ex vivo*

[Müllegger et coll., 2000; Müllegger et coll., 2007], confirment également nos observations. À ce titre, les fibroblastes cutanés humains peuvent être considérés comme de véritables cellules sentinelles, capables d'initier le recrutement des cellules immunitaires spécialisées au niveau des sites cutanés concernés par la présence et la multiplication locale de *Borrelia*.

Une question fondamentale, mais encore non résolue, dans l'interaction de *Borrelia* avec les cellules immunitaires spécialisées ou les cellules résidentes comme les fibroblastes, est de savoir si cette interaction se résume « simplement » à la mise en place des mécanismes de défense contre la bactérie, ou au contraire si la réponse inflammatoire générée (ou plutôt son exacerbation) pourrait être la cause des manifestations cliniques initiales et chroniques de la maladie. Cette question rejoint aussi celle de la persistance extraordinaire de la bactérie dans le tissu cutané et la survenue possible de manifestations cutanées chroniques de la maladie (l'ACA) après un intervalle libre potentiel de plusieurs années sans symptômes apparents [Asbrink et coll., 1986; Brehmer-Andersson et coll., 1998]. En effet, la forte réponse inflammatoire locale, induite notamment par l'interaction de la bactérie avec les TLRs (ou d'autres PRRs), observée à la fois en phase initiale ou tardive chronique de la maladie, pourrait être liée à la persistance de *Borrelia* dans les tissus lésés et constituer la cause même des lésions tissulaires. Les données expérimentales indiquant la possibilité d'une internalisation [Klempner et coll., 1993] et d'une survie intracellulaire [Wu et coll., 2011] de *Borrelia* dans les fibroblastes cutanés font de ces cellules un possible « sanctuaire » favorisant la persistance à long terme de la bactérie dans la peau.

3 RECHERCHE D'UNE « SIGNATURE » INFLAMMATOIRE LIÉE À L'ORIGINE DE LA SOUCHE

Dans notre étude effectuée sur les fibroblastes, que la souche ait été isolée d'une tique (N40), d'une lésion cutanée d'érythème migrant (Pbre), ou encore d'une lésion cutanée ACA (1 408), les profils transcriptionnels induits sur nos cultures de fibroblastes étaient très similaires. Ainsi, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de « signature » transcriptionnelle spécifique à l'origine des souches testées.

Néanmoins, l'impact du choix de ces souches sur l'analyse globale des résultats mérite d'être discuté plus avant. En effet, si l'espèce *B. burgdorferi* ss est communément isolée de lésions d'érythème migrant, il n'en va pas de même pour les lésions d'ACA, où l'espèce la plus fréquemment isolée est – et de loin – *B. afzelii*, alors que *B. burgdorferi* ss n'est qu'exceptionnellement isolée de telles lésions [Picken et coll., 1998]. Ces différences clinico-biologiques sont à mettre en rapport avec l'existence d'un organotropisme relatif lié à l'espèce de *Borrelia* en cause [Baranton et coll., 2009]. Il n'est pas exclu qu'une souche de *B. afzelii* isolée d'une ACA induise, dans notre modèle expérimental, une stimulation des fibroblastes différente de celle que nous avons observée. Pour analyser plus en détail ce point, l'étude des interactions entre *Borrelia* et fibroblastes mériterait d'être poursuivie avec des souches d'autres espèces (*B. afzelii*, *B. garinii* ...) et une méthodologie similaire, même si les résultats préliminaires obtenus pour tester cette hypothèse semblent indiquer que des souches de différentes espèces induisent un profil inflammatoire similaire dans notre modèle expérimental¹⁵⁷, et si les études *in vivo* réalisées par notre équipe n'ont pas permis d'établir un lien entre le déterminisme évolutif de la maladie et l'espèce de *Borrelia* responsable de l'infection [Kern, 2011]. Mais, si d'aucuns peuvent estimer que l'utilisation de trois souches d'une même espèce (*B. burgdorferi* ss) est une faiblesse de notre étude, car interdisant *de*

¹⁵⁷ Des souches cliniques de *B. afzelii* et de *B. garinii* induisent la synthèse d'IL-8 à des niveaux comparables à ceux obtenus avec nos trois souches de *B. burgdorferi* ss de référence (N40, Pbre, 1 408).

facto la mise en évidence de spécificités liées à l'espèce, ce choix en constitue également une force, puisque dans notre analyse comparative intersouche, les biais relatifs aux variations potentiellement induites par la diversité des espèces utilisées sont limités.

Par ailleurs, la catégorisation formelle des souches bactériennes selon leur pouvoir pathogène réel chez l'homme est problématique. Une des techniques « classiquement » utilisées pour évaluer la virulence des souches de *Borrelia*, basée sur l'analyse de l'espace intergénique de l'ADN ribosomique 16s–23s par PCR-RFLP¹⁵⁸ [Liveris et coll., 1999], a été réalisée sur les trois souches testées par *microarray* : la souche N40 isolée de tique montre un profil de type RST¹⁵⁹ 3 (profil associé aux souches non ou peu disséminantes [Jones et coll., 2006]), alors que les deux souches cliniques montrent un profil de type RST 1 (profil associé aux souches disséminantes [Jones et coll., 2006]). L'étude de ce marqueur génétique semble donc cohérente avec l'origine des souches ; cependant, il est impossible de savoir quel pourrait être le devenir de la souche N40 si celle-ci était inoculée à l'homme, ou encore si la souche Pbre (isolée d'un érythème migrant) eut pu être la cause (comme la souche 1 408) d'une ACA en l'absence de traitement antibiotique instauré précocement après la survenue de l'érythème migrant. Ainsi, quand bien même une signature transcriptionnelle eût été identifiée pour l'une ou l'autre des trois souches testées, des conclusions strictes concernant l'impact d'un potentiel « effet souche » sur le déterminisme de la maladie auraient été difficiles à poser.

Enfin, toutes les analyses *microarrays* permettant l'analyse du profil transcriptionnel des fibroblastes ont été réalisées à l'aide de cellules fibroblastiques dérivées d'un seul et unique lot cellulaire¹⁶⁰ ; or, l'hétérogénéité anatomique [Sorrell et coll., 2009] et tissulaire [Sorrell et coll., 2004] des fibroblastes dermiques est connue pour être à l'origine de variations

¹⁵⁸ RFLP : *restriction length fragment polymorphism*.

¹⁵⁹ RST : *ribosomal spacer type*.

¹⁶⁰ Ce lot de fibroblastes provient précisément de la peau jugale d'un homme âgé de 55 ans.

concernant les profils d'expression génique de cette population cellulaire [Chang et coll., 2002; Rinn et coll., 2006; Rinn et coll., 2008]. Par conséquent, les résultats des analyses *microarrays* auraient pu être différents, et des variations entre les profils transcriptionnels induits par les trois souches testées – plus importantes que celles observées dans notre étude – auraient pu être mises en évidence, si un autre lot de cellules (issues du même patient mais d'un site anatomique différent, ou tout simplement d'un autre patient) avait été utilisé. Cependant, le modèle d'étude que nous avons choisi (fibroblastes dermiques isolés d'une seule région anatomique, mais de toute l'épaisseur du derme) reste intéressant dans la mesure où *Borrelia* est susceptible d'interagir aussi bien avec les fibroblastes du derme papillaire que du derme réticulaire, et ce quel que soit le stade du cycle infectieux des spirochètes (effraction cutanée lors de la transmission, érythème migrant, ACA). De plus, l'interprétation des résultats obtenus est facilitée par l'absence de biais liés aux variations intra- et interindividuelles qu'aurait inévitablement entraînés l'utilisation respective de lots cellulaires issus de sites anatomiques différents d'un même patient ou de patients différents.

4 PEAU, IMMUNITÉ ET MALADIES À TRANSMISSION VECTORIELLE

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés spécifiquement à l'étude des interactions entre *Borrelia* et les cellules résidentes principales de la peau (kératinocytes et fibroblastes). Néanmoins, dans la peau, les interactions de *Borrelia* avec l'hôte ne se résument pas qu'aux seules cellules résidentes majoritaires de la peau : les cellules spécialisées de la réponse immunitaire sont fortement impliquées dans la réponse de l'hôte à l'infection par *Borrelia*. Si les interactions de *Borrelia* avec les monocytes/macrophages [Cruz et coll., 2008; Salazar et coll., 2009], les cellules dendritiques [Filgueira et coll., 1996; Suhonen et coll., 2003], ou encore les lymphocytes [Knigge et coll., 1996; Kalish et coll., 2003; Kinjo et coll., 2006; Collins et coll., 2008], sont des données largement reprises dans la littérature, d'autres types cellulaires jusqu'ici peu étudiés dans le cadre la borréliose de Lyme participent probablement à la réponse de l'hôte contre l'infection et mériteraient d'être étudiés de façon plus approfondie. C'est le cas notamment des mastocytes [Talkington et coll., 1999], dont le rôle dans la reconnaissance des pathogènes et les effets sur la modulation de la réponse immunitaire (innée et adaptative) n'ont été que très récemment mis en évidence [Abraham et coll., 2010; Kumar et coll., 2010].

Dans la triade hôte/pathogène/vecteur, l'interface cutanée et ses défenses immunitaires jouent un rôle clé dans la borréliose de Lyme, mais aussi dans de nombreuses autres maladies à transmission vectorielles – comme l'anaplasmose, la peste, la dengue ou encore le paludisme – ; la diversité des stratégies d'invasion puis d'échappement aux réponses immunitaires de l'hôte, que combinent les différents pathogènes à transmission vectorielle et leurs vecteurs, montre à quel point pathogènes et vecteurs se sont adaptés à leurs hôtes respectifs [Frischknecht, 2007]. Dans le cadre de ces maladies à transmission vectorielle, l'étude de l'interface cutanée (et en particulier son versant immunitaire) suscite un intérêt

croissant dans la communauté scientifique, et les nouvelles techniques d'imagerie *in vivo* ont permis d'établir de nouveaux concepts, voire de remettre en question certains paradigmes.

C'est le cas notamment dans l'étude du paludisme. Ainsi, il semblait établi qu'après l'inoculation cutanée, le parasite quittait rapidement la peau et que la transformation des sporozoïtes (formes infestantes du parasite injectées avec la salive du moustique vecteur) en mérozoïtes (formes du parasite capables d'infecter les hématies) ne pouvait survenir que dans le foie. De nouvelles données indiquent au contraire que le parasite est capable d'établir, au sein des différentes structures de la peau – épiderme, derme et follicules pileux [Gueirard et coll., 2010] – une niche dans laquelle survient une transformation complète des sporozoïtes en mérozoïtes [Gueirard et coll., 2010]. Dans les ganglions lymphatiques de drainage, le parasite est également capable d'initier une maturation, même si celle-ci n'est que partielle [Amino et coll., 2006]. Ces nouveaux éléments physiopathologiques clés de l'infection palustre établissent clairement l'existence d'une véritable « phase cutanée » pré-érythrocytaire dans le cycle infectieux du parasite [Sinnis et coll., 2008].

Le virus de la dengue, dont la transmission vectorielle est assurée par des moustiques hématophages du genre *Aedes*, amorce aussi son processus infectieux par une phase de multiplication cutanée, qui précède une éventuelle dissémination hématogène du virus (responsable de la fièvre dengue) et son passage vers les hépatocytes et les cellules endothéliales (dont l'infection participe aux mécanismes physiopathologiques responsables de la fièvre hémorragique de dengue [Green et coll., 2006]). Si la « cible » cellulaire cutanée principale du virus de la dengue demeure les cellules dendritiques immatures (dans lesquelles il pénètre en utilisant le récepteur DC-SIGN [Tassaneetrithep et coll., 2003]), des données récentes indiquent que les kératinocytes sont également des cellules permissives pour ce virus [Surasombatpattana et coll., 2011] (les kératinocytes sont aussi permissifs pour un autre flavivirus, le virus West Nile, transmis par les moustiques du genre *Culex* [Lim et coll.,

2011]). La réponse antivirale des kératinocytes à l'infection par le virus de la dengue (synthèse d'interférons et de peptides antimicrobiens [Surasombatpattana et coll., 2011]) souligne une fois encore le rôle de sentinelles des cellules résidentes cutanées dans les mécanismes immunitaires de défense de la peau [Nestle et coll., 2009].

Les leishmanies, protistes flagellés transmis à l'homme par piqûre de certaines espèces de phlébotomes¹⁶¹ (comprenant les genres *Phlebotomus* et *Lutzomia*), sont un autre exemple de pathogène à transmission vectorielle, dont la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'atteinte cutanée de la maladie a sensiblement évolué au cours des dernières années. Les leishmanies ont longtemps été considérées comme des parasites intracellulaires stricts du système réticulo-histiocytaire, mais de nouvelles données indiquent que les cellules cibles initiales de *Leishmania major* sont, comme pour *A. phagocytophilum* [Dumler et coll., 2005], les polynucléaires neutrophiles [Ritter et coll., 2009]. Le parasite est non seulement capable de survivre dans ces cellules phagocytaires [Laufs et coll., 2002], mais il est également transmis par les neutrophiles apoptotiques aux macrophages [van Zandbergen et coll., 2004], et son « passage » initial dans les polynucléaires neutrophiles semble nécessaire au maintien de sa virulence [Peters et coll., 2008]. Les leishmanies se servent ainsi des polynucléaires neutrophiles comme « cheval de Troie » pour infecter leurs cellules hôtes définitives, les macrophages [Laskay et coll., 2003].

Outre la borréliose de Lyme, ces quelques exemples de pathologies à transmission vectorielle nous montrent la complexité des mécanismes mis en jeu à la fois par l'organisme pour se défendre, mais aussi par les pathogènes et leurs vecteurs pour les contourner, et ils soulignent l'importance de l'interface cutanée dans le déterminisme évolutif des maladies qu'ils induisent.

¹⁶¹ La transmission des leishmanies à l'hôte vertébré se fait par régurgitation du contenu intestinal lors de la piqûre de la peau par ces petits insectes diptères.

CONCLUSIONS

Les études que nous avons réalisées *in vitro* nous ont permis de confirmer la participation des deux principales cellules résidentes de la peau – les kératinocytes et les fibroblastes –, dans la réaction inflammatoire dont l'infection cutanée à *Borrelia* s'accompagne. Aucune « signature » transcriptionnelle liée à la souche n'a pu être mise en évidence dans le modèle fibroblaste, mais la poursuite de ce travail avec des souches d'espèces différentes pourrait permettre l'identification de voies transcriptionnelles spécifiques, en lien avec le déterminisme évolutif de la maladie. De plus, si nous avons identifié les principaux déterminants antigéniques de *Borrelia* responsables de la réponse inflammatoire des kératinocytes (OspC et OspA), il serait intéressant de poursuivre l'étude des déterminants de surface responsables de la stimulation des fibroblastes. L'utilisation de souches mutantes pour BBK32, DbpA et DbpB, ou d'autres lipoprotéines de surface pourrait permettre de répondre à cette question.

Par ailleurs, le modèle expérimental utilisé nous a permis de mettre en évidence deux nouveaux rôles de la salive de tique : une fonction « antialarmine » sur la réponse des kératinocytes à l'infection par *Borrelia*, et une toxicité cellulaire sur les fibroblastes dermiques, dont les effets directs ou indirects pourraient favoriser la transmission de *Borrelia*, son implantation cutanée initiale, et sa dissémination secondaire aux organes cibles. Les effets de Salp15 étant maintenant bien déterminés, notre modèle expérimental sur kératinocytes pourrait constituer un bon outil pour la caractérisation et l'étude d'autres protéines immunomodulatrices de la salive de tique.

L'étude de l'immunité innée cutanée dans la borréliose de Lyme ne se résumant pas aux seules cellules résidentes majoritaires de la peau, le rôle d'autres cellules, et notamment des acteurs cellulaires spécialisés principaux de la réponse immunitaire (lymphocytes, cellules dendritiques, mastocytes ...) mériterait d'être approfondi plus avant, en bénéficiant de la complémentarité des approches expérimentales *in vivo* et *in vitro* maîtrisées dans le laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott A (2006) Lyme disease: uphill struggle. *Nature* 439:524-5.

Aberer E, Klade H, Hobisch G (1991a) A clinical, histological, and immunohistochemical comparison of acrodermatitis chronica atrophicans and morphea. *The American Journal of dermatopathology* 13:334-41.

Aberer E, Klade H, Stanek G et coll. (1991b) *Borrelia burgdorferi* and different types of morphea. *Dermatologica* 182:145-54.

Aberer E, Neumann R, Lubec G (1987a) Acrodermatitis chronica atrophicans in association with lichen sclerosus et atrophicans: tubulo-interstitial nephritis and urinary excretion of spirochete-like organisms. *Acta dermato-venereologica* 67:62-5.

Aberer E, Neumann R, Stanek G (1985) Is localised scleroderma a *Borrelia* infection? *Lancet* 2:278.

Aberer E, Stanek G (1987b) Histological evidence for spirochetal origin of morphea and lichen sclerosus et atrophicans. *The American Journal of dermatopathology* 9:374-9.

Aberer E, Stanek G, Ertl M et coll. (1987c) Evidence for spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). *Acta dermato-venereologica* 67:225-31.

Abraham SN, St John AL (2010) Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews Immunology* 10:440-52.

Adusumilli S, Booth CJ, Anguita J et coll. (2010) Passage through *Ixodes scapularis* ticks enhances the virulence of a weakly pathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 78:138-44.

Afzelius A (1910) Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. *Archiv fur Dermatologie und Syphilis* 101:405-6.

Akimoto S, Ishikawa O, Miyachi Y (1996) The absence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in the sera of Japanese patients with localized scleroderma. *The Journal of rheumatology* 23:573-4.

Alban PS, Johnson PW, Nelson DR (2000) Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 146 (Pt 1):119-27.

Alberts B, Johnson A, Lewis J et coll. (2011) *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion Médecine Sciences.

- Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M et coll. (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nature medicine* 8:878-84.
- Amino R, Thiberge S, Martin B et coll. (2006) Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine* 12:220-4.
- Anderson JF (1991) Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scandinavian journal of infectious diseases Supplementum* 77:23-34.
- Anderson JF, Barthold SW, Magnarelli LA (1990) Infectious but nonpathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of clinical microbiology* 28:2693-9.
- Andrade BB, de Oliveira CI, Brodskyn CI et coll. (2007) Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scandinavian journal of immunology* 66:122-7.
- Andres C, Ziai M, Bruckbauer H et coll. (2010) Acrodermatitis chronica atrophicans in two children. *International journal of dermatology* 49:180-3.
- Anguita J, Persing DH, Rincon M et coll. (1996) Effect of anti-interleukin 12 treatment on murine lyme borreliosis. *The Journal of clinical investigation* 97:1028-34.
- Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW et coll. (2002) Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16:849-59.
- Antonara S, Chafel RM, LaFrance M et coll. (2007) *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using *in vivo* phage display. *Molecular microbiology* 66:262-76.
- Apostolopoulos V, McKenzie IF (2001) Role of the mannose receptor in the immune response. *Current molecular medicine* 1:469-74.
- Asbrink E (1985) Erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. Early and late manifestations of *Ixodes ricinus*-borne *Borrelia* spirochetes. *Acta dermato-venereologica Supplementum* 118:1-63.
- Asbrink E, Hovmark A, Olsson I (1986) Clinical manifestations of acrodermatitis chronica atrophicans in 50 Swedish patients. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 263:253-61.
- Bärfverstedt B (1943) Über lymphadenosis benigne cutis, eine klinische und pathologisch-anatomische Studie. *Acta dermato-venereologica*
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D et coll. (1994) The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology* 12:881-922.
- Bannwarth A (1941) Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und „Rheumatismus“ Ein Beitrag zum Problem „Allergie und Nervensystem“ in zwei Teilen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 113:284-376.

- Baranton G, De Martino SJ (2009) *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. *Current problems in dermatology* 37:1-17.
- Baranton G, Postic D, Saint Girons I et coll. (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International journal of systematic bacteriology* 42:378-83.
- Barbour AG, Hayes SF (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiological reviews* 50:381-400.
- Barthold SW, Beck DS, Hansen GM et coll. (1990) Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *The Journal of infectious diseases* 162:133-8.
- Barthold SW, Hodzic E, Tunev S et coll. (2006) Antibody-mediated disease remission in the mouse model of lyme borreliosis. *Infection and immunity* 74:4817-25.
- Barthold SW, Moody KD, Terwilliger GA et coll. (1988) Experimental Lyme arthritis in rats infected with *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of infectious diseases* 157:842-6.
- Beaufays J, Adam B, Decrem Y et coll. (2008a) *Ixodes ricinus* tick lipocalins: identification, cloning, phylogenetic analysis and biochemical characterization. *PLoS One* 3:e3941.
- Beaufays J, Adam B, Menten-Dedoyart C et coll. (2008b) Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS One* 3:e3987.
- Beermann C, Wunderli-Allenspach H, Groscurth P et coll. (2000) Lipoproteins from *Borrelia burgdorferi* applied in liposomes and presented by dendritic cells induce CD8(+) T-lymphocytes *in vitro*. *Cellular immunology* 201:124-31.
- Behera AK, Hildebrand E, Bronson RT et coll. (2006) MyD88 deficiency results in tissue-specific changes in cytokine induction and inflammation in interleukin-18-independent mice infected with *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 74:1462-70.
- Behera AK, Thorpe CM, Kidder JM et coll. (2004) *Borrelia burgdorferi*-induced expression of matrix metalloproteinases from human chondrocytes requires mitogen-activated protein kinase and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathways. *Infection and immunity* 72:2864-71.
- Bellet-Edimo R, Betschart B, Gern L (2005) Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmissions of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* 128:117-25.
- Berger BW, Johnson RC, Kodner C et coll. (1992) Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *Journal of clinical microbiology* 30:359-61.
- Berglund J, Eitrem R, Ornstein K et coll. (1995) An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *The New England journal of medicine* 333:1319-27.

- Bergstrom S, Bundoc VG, Barbour AG (1989) Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* 3:479-86.
- Bernardino AL, Myers TA, Alvarez X et coll. (2008) Toll-like receptors: insights into their possible role in the pathogenesis of Lyme neuroborreliosis. *Infection and immunity* 76:4385-95.
- Birder LA, Perl ER (1994) Cutaneous sensory receptors. *Journal of clinical neurophysiology* 11:534-52.
- Blasius AL, Beutler B (2010) Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32:305-15.
- Bockenstedt LK, Kang I, Chang C et coll. (2001) CD4+ T helper 1 cells facilitate regression of murine Lyme carditis. *Infection and immunity* 69:5264-9.
- Bodaghi B (2007) Manifestations oculaires de la maladie de Lyme. *Médecine et maladies infectieuses* 37:518-22.
- Bolz DD, Sundsbak RS, Ma Y et coll. (2004) MyD88 plays a unique role in host defense but not arthritis development in Lyme disease. *Journal of immunology* 173:2003-10.
- Brandt ME, Riley BS, Radolf JD et coll. (1990) Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infection and immunity* 58:983-91.
- Brehmer-Andersson E (1993) Histopathologic patterns of acrodermatitis chronica atrophicans. *Clinics in dermatology* 11:385-92.
- Brehmer-Andersson E, Hovmark A, Asbrink E (1998) Acrodermatitis chronica atrophicans: histopathologic findings and clinical correlations in 111 cases. *Acta dermato-venereologica* 78:207-13.
- Brissette CA, Bykowski T, Cooley AE et coll. (2009a) *Borrelia burgdorferi* RevA antigen binds host fibronectin. *Infection and immunity* 77:2802-12.
- Brissette CA, Cooley AE, Burns LH et coll. (2008) Lyme borreliosis spirochete Erp proteins, their known host ligands, and potential roles in mammalian infection. *International journal of medical microbiology* 298 Suppl 1:257-67.
- Brissette CA, Haupt K, Barthel D et coll. (2009b) *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infection and immunity* 77:300-6.
- Brissette CA, Verma A, Bowman A et coll. (2009c) The *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein ErpX binds mammalian laminin. *Microbiology* 155:863-72.
- Brorson O, Brorson SH (1997) Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection* 25:240-6.

- Brorson O, Brorson SH (1998) *In vitro* conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection* 26:144-50.
- Brouqui P, Badiaga S, Raoult D (1996) Eucaryotic cells protect *Borrelia burgdorferi* from the action of penicillin and ceftriaxone but not from the action of doxycycline and erythromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40:1552-4.
- Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet C et coll. (2000) Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *European journal of immunology* 30:914-9.
- Brown EL, Wooten RM, Johnson BJ et coll. (2001) Resistance to Lyme disease in decorin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 107:845-52.
- Brzonova I, Wollenberg A, Prinz JC (2002) Acrodermatitis chronica atrophicans affecting all four limbs in an 11-year-old girl. *The British journal of dermatology* 147:375-8.
- Buchwald A (1883) Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Archiv fur Dermatologie und Syphilis* 10:553-6.
- Buechner SA, Rufli T, Erb P (1993) Acrodermatitis chronic atrophicans: a chronic T-cell-mediated immune reaction against *Borrelia burgdorferi*? Clinical, histologic, and immunohistochemical study of five cases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 28:399-405.
- Bulut Y, Faure E, Thomas L et coll. (2001) Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *Journal of immunology* 167:987-94.
- Bunikis J, Noppa L, Bergstrom S (1995) Molecular analysis of a 66-kDa protein associated with the outer membrane of Lyme disease *Borrelia*. *FEMS microbiology letters* 131:139-45.
- Burckhardt JL (1911) Zur Frage der Follikel und Keimzentrenbildung in der haut. *Frankfurter Zeitschrift fur Pathologie* 6:352-59.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF et coll. (1982) Lyme disease-a tick-borne spirochetosis ? *Science* 216:1317-9.
- Burke G, Wikel SK, Spielman A et coll. (2005) Hypersensitivity to ticks and Lyme disease risk. *Emerging infectious diseases* 11:36-41.
- Cabello FC, Godfrey HP, Newman SA (2007) Hidden in plain sight: *Borrelia burgdorferi* and the extracellular matrix. *Trends in microbiology* 15:350-4.
- Canica MM, Nato F, du Merle L et coll. (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian journal of infectious diseases* 25:441-8.
- Capinera JL (2008) *Encyclopedia of Entomology*. Springer-Verlag New York Inc.

- Carlesimo M, Abruzzese C, Narcisi A et coll. (2010) Acrodermatitis chronic atrophicans and morphea. *European journal of dermatology* 20:405-7.
- Casjens S, Palmer N, van Vugt R et coll. (2000) A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* 35:490-516.
- Casjens SR, Fraser-Liggett CM, Mongodin EF et coll. (2011) Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *Journal of bacteriology* 193:1489-90.
- Castelli E, Caputo V, Morello V et coll. (2008) Local reactions to tick bites. *The American Journal of dermatopathology* 30:241-8.
- Cervantes JL, Dunham-Ems SM, La Vake CJ et coll. (2011) Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:3683-8.
- Chang HY, Chi JT, Dudoit S et coll. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:12877-82.
- Chary-Valckenaere I, Jaulhac B, Champigneulle J et coll. (1998) Ultrastructural demonstration of intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* in Lyme arthritis. *British journal of rheumatology* 37:468-70.
- Chauhan VS, Sterka DG, Jr., Furr SR et coll. (2009) NOD2 plays an important role in the inflammatory responses of microglia and astrocytes to bacterial CNS pathogens. *Glia* 57:414-23.
- Chmelar J, Oliveira CJ, Rezacova P et coll. (2011) A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117:736-44.
- Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H et coll. (1993) Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis. *Acta paediatrica* 386:1-75.
- Chu CY, Liu W, Jiang BG et coll. (2008) Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *Journal of clinical microbiology* 46:3130-3.
- Cinco M, Cini B, Murgia R et coll. (2001) Evidence of involvement of the mannose receptor in adhesion of *Borrelia burgdorferi* to monocyte/macrophages. *Infection and immunity* 69:2743-7.
- Cluss RG, Silverman DA, Stafford TR (2004) Extracellular secretion of the *Borrelia burgdorferi* Oms28 porin and Bgp, a glycosaminoglycan binding protein. *Infection and immunity* 72:6279-86.

Coburn J, Chege W, Magoun L et coll. (1999) Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi* beta3-chain integrin ligand identified using a phage display library. *Molecular microbiology* 34:926-40.

Coburn J, Cugini C (2003) Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin alpha V beta 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7301-6.

Coburn J, Leong JM, Erban JK (1993) Integrin alpha IIb beta 3 mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:7059-63.

Codolo G, Amedei A, Steere AC et coll. (2008) *Borrelia burgdorferi* NapA-driven Th17 cell inflammation in lyme arthritis. *Arthritis and rheumatism* 58:3609-17.

Cohuet A, Harris C, Robert V et coll. (2010) Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector ? *Trends in parasitology* 26:130-6.

Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J et coll. (1997) Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* 89:1111-9.

Coleman JL, Roemer EJ, Benach JL (1999) Plasmin-coated *Borrelia Burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. *Infection and immunity* 67:3929-36.

Coleman JL, Sellati TJ, Testa JE et coll. (1995) *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infection and immunity* 63:2478-84.

Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I et coll. (2004) First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of clinical microbiology* 42:1316-8.

Collins C, Shi C, Russell JQ et coll. (2008) Activation of gamma delta T cells by *Borrelia burgdorferi* is indirect via a TLR- and caspase-dependent pathway. *Journal of immunology* 181:2392-8.

Collins C, Wolfe J, Roessner K et coll. (2005) Lyme arthritis synovial gamma delta T cells instruct dendritic cells via fas ligand. *Journal of immunology* 175:5656-65.

Coulson IH, Smith NP, Holden CA (1989) Acrodermatitis chronica atrophicans with coexisting morphoea. *The British journal of dermatology* 121:263-9.

Couvreur B, Beaufays J, Charon C et coll. (2008) Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One* 3:e1400.

Crippa M, Rais O, Gern L (2002) Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector borne and zoonotic diseases* 2:3-9.

- Crother TR, Champion CI, Whitelegge JP et coll. (2004) Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin. *Infection and immunity* 72:5063-72.
- Cruz AR, Moore MW, La Vake CJ et coll. (2008) Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, potentiates innate immune activation and induces apoptosis in human monocytes. *Infection and immunity* 76:56-70.
- Cugini C, Medrano M, Schwan TG et coll. (2003) Regulation of expression of the *Borrelia burgdorferi* beta(3)-chain integrin ligand, P66, in ticks and in culture. *Infection and immunity* 71:1001-7.
- Daix V, Schroeder H, Praet N et coll. (2007) *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect molecular biology* 16:155-66.
- Das S, Banerjee G, DePonte K et coll. (2001) Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *The Journal of infectious diseases* 184:1056-64.
- Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ et coll. (1988) Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *The New England journal of medicine* 319:1441-6.
- Davis GE, Pintar Allen KA, Salazar R et coll. (2001) Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *Journal of cell science* 114:917-30.
- de Koning J (1993) Histopathologic patterns of erythema migrans and borrelial lymphocytoma. *Clinics in dermatology* 11:377-83.
- de Koning J, Tazelaar DJ, Hoogkamp-Korstanje JA et coll. (1995) Acrodermatitis chronica atrophicans: a light and electron microscopic study. *Journal of cutaneous pathology* 22:23-32.
- De Martino S. (2007) Thèse de Doctorat d'Université. Étude *in vitro* et sur modèle murin de souches humaines du complexe *Borrelia burgdorferi*. Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- de Silva AM, Fikrig E (1995) Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 53:397-404.
- de Silva AM, Telford SR, 3rd, Brunet LR et coll. (1996) *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *The Journal of experimental medicine* 183:271-5.
- Dennis DT, Nekomoto TS, Victor JC et coll. (1998) Reported distribution of *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *Journal of medical entomology* 35:629-38.

- Deruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL et coll. (2008) Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *The Journal of experimental medicine* 205:2019-31.
- Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound repair and regeneration* 13:7-12.
- DiCaudo DJ, Su WP, Marshall WF et coll. (1994) Acrodermatitis chronica atrophicans in the United States: clinical and histopathologic features of six cases. *Cutis* 54:81-4.
- Diegmann J, Junker K, Gerstmayer B et coll. (2005) Identification of CD70 as a diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *European journal of cancer* 41:1794-801.
- Dillon WI, Saed GM, Fivenson DP (1995) *Borrelia burgdorferi* DNA is undetectable by polymerase chain reaction in skin lesions of morphea, scleroderma, or lichen sclerosus et atrophicus of patients from North America. *Journal of the American Academy of Dermatology* 33:617-20.
- Diza E, Papa A, Vezyri E et coll. (2004) *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerging infectious diseases* 10:1692-3.
- Dorward DW, Fischer ER, Brooks DM (1997) Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing Lyme disease. *Clinical infectious diseases* 25 Suppl 1:S2-8.
- Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC et coll. (2005) Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging infectious diseases* 11:1828-34.
- Dunham-Ems SM, Caimano MJ, Pal U et coll. (2009) Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *The Journal of clinical investigation* 119:3652-65.
- Ebnet K, Brown KD, Siebenlist UK et coll. (1997) *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *Journal of immunology* 158:3285-92.
- Embers ME, Ramamoorthy R, Philipp MT (2004) Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *Microbes and infection* 6:312-8.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D et coll. (2009) Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation* 119:3573-85.
- Fan W, Leonardi CL, Penneys NS (1995) Absence of *Borrelia burgdorferi* in patients with localized scleroderma (morphea). *Journal of the American Academy of Dermatology* 33:682-4.
- Feder HM, Jr., Johnson BJ, O'Connell S et coll. (2007) A critical appraisal of "chronic Lyme disease". *The New England journal of medicine* 357:1422-30.

- Fialova A, Cimburek Z, Iezzi G et coll. (2010) *Ixodes ricinus* tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes and infection* 12:580-5.
- Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS et coll. (1990) Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 250:553-6.
- Fikrig E, Feng W, Barthold SW et coll. (2000) Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 expression and the inhibition of spirochete transmission. *Journal of immunology* 164:5344-51.
- Fikrig E, Narasimhan S (2006) *Borrelia burgdorferi*—traveling incognito ? *Microbes and infection* 8:1390-9.
- Fikrig E, Pal U, Chen M et coll. (2004) OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infection and immunity* 72:1755-9.
- Filgueira L, Nestle FO, Rittig M et coll. (1996) Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. *Journal of immunology* 157:2998-3005.
- Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E et coll. (2008) Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International journal of medical microbiology* 298:279-90.
- Finkel MF, Johnson RC (1990) *Borrelia* lymphocytoma: a possible North American case. *Wisconsin medical journal* 89:683-6.
- Fischer JR, LeBlanc KT, Leong JM (2006) Fibronectin binding protein BBK32 of the Lyme disease spirochete promotes bacterial attachment to glycosaminoglycans. *Infection and immunity* 74:435-41.
- Flower DR (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *The Biochemical journal* 318 (Pt 1):1-14.
- Foley DM, Gayek RJ, Skare JT et coll. (1995) Rabbit model of Lyme borreliosis: erythema migrans, infection-derived immunity, and identification of *Borrelia burgdorferi* proteins associated with virulence and protective immunity. *The Journal of clinical investigation* 96:965-75.
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L (2011) Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scandinavian journal of immunology* 73:408-19.
- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM (2004) Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thrombosis and haemostasis* 91:886-98.
- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM (2005a) Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis* 94:167-74.

Francischetti IM, My Pham V, Mans BJ et coll. (2005b) The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect biochemistry and molecular biology* 35:1142-61.

Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ et coll. (2009) The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience* 14:2051-88.

Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF et coll. (2002) Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99:3602-12.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM et coll. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390:580-6.

Frauenschuh A, Power CA, Deruaz M et coll. (2007) Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *The Journal of biological chemistry* 282:27250-8.

Frischknecht F (2007) The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cellular microbiology* 9:1630-40.

Fuchs H, Wallich R, Simon MM et coll. (1994) The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12594-8.

Fujiwara H, Fujiwara K, Hashimoto K et coll. (1997) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA (*B. garinii* or *B. afzelii*) in morphea and lichen sclerosus et atrophicus tissues of German and Japanese but not of US patients. *Archives of dermatology* 133:41-4.

Fukunaga M, Hamase A, Okada K et coll. (1996) *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from *Ixodid* ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiology and immunology* 40:877-81.

Fung BP, McHugh GL, Leong JM et coll. (1994) Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infection and immunity* 62:3213-21.

Galindo M, Santiago B, Alcami J et coll. (2001) Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in human dermal fibroblasts. *Clinical and experimental immunology* 123:36-41.

Garg R, Juncadella IJ, Ramamoorthi N et coll. (2006) Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *Journal of immunology* 177:6579-83.

Garin C, Bujadoux D (1922) Paralysie par les tiques. *Journal des maladies régnantes à Lyon* 77:765-7.

- Gebbia JA, Coleman JL, Benach JL (2001) *Borrelia* spirochetes upregulate release and activation of matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) and collagenase 1 (MMP-1) in human cells. *Infection and immunity* 69:456-62.
- Georgilis K, Peacocke M, Klempner MS (1992) Fibroblasts protect the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from ceftriaxone *in vitro*. *The Journal of infectious diseases* 166:440-4.
- Gerber MA, Shapiro ED, Burke GS et coll. (1996) Lyme disease in children in southeastern Connecticut. Pediatric Lyme Disease Study Group. *The New England journal of medicine* 335:1270-4.
- Gern L (2009) Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Current problems in dermatology* 37:18-30.
- Gern L, Rouvinez E, Toutoungi LN et coll. (1997) Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia parasitologica* 44:309-14.
- Gern L, Toutoungi LN, Hu CM et coll. (1991) *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Medical and veterinary entomology* 5:431-5.
- Ghosh AK, Jacobs-Lorena M (2009) *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. *Current opinion in microbiology* 12:394-400.
- Gillespie RD, Dolan MC, Piesman J et coll. (2001) Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of immunology* 166:4319-26.
- Girard YA, Fedorova N, Lane RS (2011) Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* and Detection of *B. bissettii*-Like DNA in Serum of North-Coastal California Residents. *Journal of clinical microbiology* 49:945-54.
- Girschick HJ, Huppertz HI, Russmann H et coll. (1996) Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatology international* 16:125-32.
- Gläser R, Harder J, Lange H et coll. (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nature immunology* 6:57-64.
- Godfrey DI, Berzins SP (2006) NKT cells join the war on Lyme disease. *Nature immunology* 7:904-6.
- Gondolf KB, Mihatsch M, Curschellas E et coll. (1994) Induction of experimental allergic arthritis with outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Arthritis and rheumatism* 37:1070-7.
- Goodlad JR, Davidson MM, Gordon P et coll. (2002) Morphea and *Borrelia burgdorferi*: results from the Scottish Highlands in the context of the world literature. *Molecular pathology* : MP 55:374-8.

- Gordillo-Perez G, Torres J, Solorzano-Santos F et coll. (2007) *Borrelia burgdorferi* infection and cutaneous Lyme disease, Mexico. *Emerging infectious diseases* 13:1556-8.
- Green S, Rothman A (2006) Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Current opinion in infectious diseases* 19:429-36.
- Grice EA, Segre JA (2011) The skin microbiome. *Nature reviews Microbiology* 9:244-53.
- Grimm D, Tilly K, Byram R et coll. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3142-7.
- Gross DM, Steere AC, Huber BT (1998) T helper 1 response is dominant and localized to the synovial fluid in patients with Lyme arthritis. *Journal of immunology* 160:1022-8.
- Gruntar I, Malovrh T, Murgia R et coll. (2001) Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 109:383-8.
- Gueirard P, Tavares J, Thiberge S et coll. (2010) Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18640-5.
- Guerau-de-Arellano M, Huber BT (2005) Chemokines and Toll-like receptors in Lyme disease pathogenesis. *Trends Mol Med* 11:114-20.
- Guo BP, Brown EL, Dorward DW et coll. (1998) Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* 30:711-23.
- Guo BP, Norris SJ, Rosenberg LC et coll. (1995) Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infection and immunity* 63:3467-72.
- Guo X, Booth CJ, Paley MA et coll. (2009) Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infection and immunity* 77:2320-9.
- Hagman KE, Lahdenne P, Popova TG et coll. (1998) Decorin-binding protein of *Borrelia burgdorferi* is encoded within a two-gene operon and is protective in the murine model of Lyme borreliosis. *Infection and immunity* 66:2674-83.
- Hajnicka V, Vancova I, Kocakova P et coll. (2005) Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130:333-42.
- Hajnicka V, Vancova-Stibraniova I, Slovak M et coll. (2011) *Ixodid* tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *International journal for parasitology* 41:213-23.
- Hallstrom T, Haupt K, Kraiczy P et coll. (2010) Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *The Journal of infectious diseases* 202:490-8.

- Hammerschmidt S, Agarwal V, Kunert A et coll. (2007) The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *Journal of immunology* 178:5848-58.
- Hannier S, Liversidge J, Sternberg JM et coll. (2003) *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite immunology* 25:27-37.
- Hannier S, Liversidge J, Sternberg JM et coll. (2004) Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology* 113:401-8.
- Hansen K, Serup J, Hoybye S (1987) Antibodies to *Borrelia burgdorferi* and localised scleroderma. *Lancet* 1:682.
- Harder J, Schröder JM (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *The Journal of biological chemistry* 277:46779-84.
- Hatfield GW, Hung SP, Baldi P (2003) Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Molecular microbiology* 47:871-7.
- Haupt K, Kraiczky P, Wallich R et coll. (2007) Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins. *The Journal of infectious diseases* 196:124-33.
- He M, Boardman BK, Yan D et coll. (2007) Regulation of expression of the fibronectin-binding protein BBK32 in *Borrelia burgdorferi*. *Journal of bacteriology* 189:8377-80.
- Hellwage J, Meri T, Heikkila T et coll. (2001) The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of biological chemistry* 276:8427-35.
- Henningsson AJ, Tjernberg I, Malmvall BE et coll. (2011) Indications of Th1 and Th17 responses in cerebrospinal fluid from patients with Lyme neuroborreliosis: a large retrospective study. *Journal of neuroinflammation* 8:36.
- Herxheimer K, Hartmann K (1902) Ueber Acrodermatitis chronica atrophicans. *Archives of dermatology* 61:57-76.
- Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R et coll. (1999) Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of immunology* 163:2382-6.
- Hoesly JM, Mertz LE, Winkelmann RK (1987) Localized scleroderma (morphea) and antibody to *Borrelia burgdorferi*. *Journal of the American Academy of Dermatology* 17:455-8.
- Hojgaard A, Eisen RJ, Piesman J (2008) Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* ss during the key third day of feeding by nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology* 45:732-6.

- Holick MF (1988) Skin: site of the synthesis of vitamin D and a target tissue for the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Annals of the New York Academy of Sciences* 548:14-26.
- Hovius JW (2009) Spitting image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response. *The Journal of investigative dermatology* 129:2337-9.
- Hovius JW, de Jong MA, den Dunnen J et coll. (2008a) Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS pathogens* 4:e31.
- Hovius JW, Ramamoorthi N, Van't Veer C et coll. (2007) Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector borne and zoonotic diseases* 7:296-303.
- Hovius JW, Schuijt TJ, de Groot KA et coll. (2008b) Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *The Journal of infectious diseases* 198:1189-97.
- Hu LT, Eskildsen MA, Masgala C et coll. (2001) Host metalloproteinases in Lyme arthritis. *Arthritis and rheumatism* 44:1401-10.
- Hubalek Z (2009) Epidemiology of lyme borreliosis. *Current problems in dermatology* 37:31-50.
- Hulinska D, Bartak P, Hercogova J et coll. (1994) Electron microscopy of Langerhans cells and *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients. *Zentralblatt fur Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 280:348-59.
- Hyde FW, Johnson RC (1984) Genetic relationship of lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira* spp. *Journal of clinical microbiology* 20:151-4.
- Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine* 9:685-93.
- Jaulhac B, Heller R, Limbach FX et coll. (2000) Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis. *Journal of clinical microbiology* 38:1895-900.
- Jenke AC, Stoek LM, Zilbauer M et coll. (2011) Facial palsy: etiology, outcome and management in children. *European journal of paediatric neurology* 15:209-13.
- Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW et coll. (1984) *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *International journal of systematic bacteriology* 34:496-7.
- Jones KL, Glickstein LJ, Damle N et coll. (2006) *Borrelia burgdorferi* genetic markers and disseminated disease in patients with early Lyme disease. *Journal of clinical microbiology* 44:4407-13.
- Jones NC, Germain A, Riley KE et coll. (1994) *Borrelia burgdorferi* decreases hyaluronan synthesis but increases IL-6 production by fibroblasts. *Microbial pathogenesis* 16:261-7.

- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-10.
- Juncadella IJ, Garg R, Ananthnarayanan SK et coll. (2007) T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS immunology and medical microbiology* 49:433-8.
- Jurca T, Ruzic-Sabljić E, Lotric-Furlan S et coll. (1998) Comparison of peripheral and central biopsy sites for the isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from erythema migrans skin lesions. *Clinical infectious diseases* 27:636-8.
- Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS et coll. (1998) Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 287:41-52.
- Kalish RS, Wood JA, Golde W et coll. (2003) Human T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* infection: no correlation between human leukocyte function antigen type 1 peptide response and clinical status. *The Journal of infectious diseases* 187:102-8.
- Kanitakis J (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology* 12:390-9.
- Kapetanovic R, Cavaillon JM (2007) Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. *Expert opinion on biological therapy* 7:907-18.
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y (1993) Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiology and immunology* 37:843-8.
- Kawai T, Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34:637-50.
- Keane-Myers A, Nickell SP (1995) T cell subset-dependent modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *Journal of immunology* 154:1770-6.
- Kern A. (2011) Thèse de Doctorat d'Université. Inflammation cutanée lors de la transmission vectorielle de la borréliose de Lyme : étude sur modèle murin. Université de Strasbourg, Strasbourg.
- Kern A, Collin E, Barthel C et coll. (2011) Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of Lyme disease. *Vector borne and zoonotic diseases* 11:1343-50.
- Kim JH, Singvall J, Schwarz-Linek U et coll. (2004) BBK32, a fibronectin binding MSCRAMM from *Borrelia burgdorferi*, contains a disordered region that undergoes a conformational change on ligand binding. *The Journal of biological chemistry* 279:41706-14.
- Kindstrand E, Nilsson BY, Hovmark A et coll. (1997) Peripheral neuropathy in acrodermatitis chronica atrophicans - a late *Borrelia* manifestation. *Acta neurologica Scandinavica* 95:338-45.

Kinjo Y, Tupin E, Wu D et coll. (2006) Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nature immunology* 7:978-86.

Klempner MS, Noring R, Epstein MP et coll. (1995) Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of infectious diseases* 171:1258-65.

Klempner MS, Noring R, Rogers RA (1993) Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of infectious diseases* 167:1074-81.

Klenha J, Krs V (1967) Lysozyme in mouse and human skin. *The Journal of investigative dermatology* 49:396-9.

Knigge H, Simon MM, Meuer SC et coll. (1996) The outer surface lipoprotein OspA of *Borrelia burgdorferi* provides co-stimulatory signals to normal human peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *European journal of immunology* 26:2299-303.

Konnai S, Nishikado H, Yamada S et coll. (2011) Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus* Schulze. *Experimental parasitology* 127:467-74.

Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F (2008) Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 90:227-42.

Kotsyfakis M, Horka H, Salat J et coll. (2010) The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Molecular microbiology* 77:456-70.

Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF et coll. (2007) Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry* 282:29256-63.

Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IM et coll. (2006) Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry* 281:26298-307.

Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M et coll. (2001) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *European journal of immunology* 31:1674-84.

Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M et coll. (2002) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: insufficient killing of the pathogens by complement and antibody. *International journal of medical microbiology* 291 Suppl 33:141-6.

Krause PJ, Grant-Kels JM, Tahan SR et coll. (2009) Dermatologic changes induced by repeated *Ixodes scapularis* bites and implications for prevention of tick-borne infection. *Vector borne and zoonotic diseases* 9:603-10.

- Krocova Z, Macela A, Hernychova L et coll. (2003) Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *The Journal of parasitology* 89:14-20.
- Krumdieck R, Hook M, Rosenberg LC et coll. (1992) The proteoglycan decorin binds C1q and inhibits the activity of the C1 complex. *Journal of immunology* 149:3695-701.
- Kubes M, Kocakova P, Slovak M et coll. (2002) Heterogeneity in the effect of different *Ixodid* tick species on human natural killer cell activity. *Parasite immunology* 24:23-8.
- Kumar V, Sharma A (2010) Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Molecular immunology* 48:14-25.
- Labandeira-Rey M, Seshu J, Skare JT (2003) The absence of linear plasmid 25 or 28-1 of *Borrelia burgdorferi* dramatically alters the kinetics of experimental infection via distinct mechanisms. *Infection and immunity* 71:4608-13.
- Lagal V, Portnoi D, Faure G et coll. (2006) *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes and infection* 8:645-52.
- Lam TT, Nguyen TP, Montgomery RR et coll. (1994) Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infection and immunity* 62:290-8.
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W (2003) Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes ? *Trends in microbiology* 11:210-4.
- Laufs H, Muller K, Fleischer J et coll. (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and immunity* 70:826-35.
- Lawrenz MB, Wooten RM, Norris SJ (2004) Effects of vlsE complementation on the infectivity of *Borrelia burgdorferi* lacking the linear plasmid lp28-1. *Infection and immunity* 72:6577-85.
- Lawrie CH, Randolph SE, Nuttall PA (1999) *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental parasitology* 93:207-14.
- Le Fleche A, Postic D, Girardet K et coll. (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International journal of systematic bacteriology* 47:921-5.
- Leboulle G, Crippa M, Decrem Y et coll. (2002) Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *The Journal of biological chemistry* 277:10083-9.
- Lee ML, Kuo FC, Whitmore GA et coll. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:9834-9.
- Lee WY, Moriarty TJ, Wong CH et coll. (2010) An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nature immunology* 11:295-302.

- Lenormand C, Jaulhac B, De Martino S et coll. (2009) Species of *Borrelia burgdorferi* complex that cause borrelial lymphocytoma in France. *The British journal of dermatology* 161:174-6.
- Letrilliart L, Ragon B, Hanslik T et coll. (2005) Lyme disease in France: a primary care-based prospective study. *Epidemiology and infection* 133:935-42.
- Li X, Liu X, Beck DS et coll. (2006) *Borrelia burgdorferi* lacking BBK32, a fibronectin-binding protein, retains full pathogenicity. *Infection and immunity* 74:3305-13.
- Liang FT, Brown EL, Wang T et coll. (2004a) Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *The American journal of pathology* 165:977-85.
- Liang FT, Jacobs MB, Bowers LC et coll. (2002a) An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. *The Journal of experimental medicine* 195:415-22.
- Liang FT, Nelson FK, Fikrig E (2002b) Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *The Journal of experimental medicine* 196:275-80.
- Liang FT, Yan J, Mbow ML et coll. (2004b) *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infection and immunity* 72:5759-67.
- Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM et coll. (2011) Keratinocytes are cell targets of West Nile virus *in vivo*. *Journal of virology* 85:5197-201.
- Lima CM, Zeidner NS, Beard CB et coll. (2005) Differential infectivity of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* derived from *Ixodes scapularis* salivary glands and midgut. *Journal of medical entomology* 42:506-10.
- Lin B, Kidder JM, Noring R et coll. (2001) Differences in synovial fluid levels of matrix metalloproteinases suggest separate mechanisms of pathogenesis in Lyme arthritis before and after antibiotic treatment. *The Journal of infectious diseases* 184:174-80.
- Lipschütz B (1913) Über eine seltene Erythemform (*erythema chronicum migrans*). *Archiv für Dermatologie und Syphilis* 118:349-56.
- Lipsker D (2007) Aspects dermatologiques au cours de la maladie de Lyme. *Médecine et maladies infectieuses* 37:540-7.
- Liu N, Montgomery RR, Barthold SW et coll. (2004) Myeloid differentiation antigen 88 deficiency impairs pathogen clearance but does not alter inflammation in *Borrelia burgdorferi*-infected mice. *Infection and immunity* 72:3195-203.
- Livengood JA, Gilmore RD, Jr. (2006) Invasion of human neuronal and glial cells by an infectious strain of *Borrelia burgdorferi*. *Microbes and infection* 8:2832-40.

- Liveris D, Varde S, Iyer R et coll. (1999) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 37:565-9.
- Lorena D, Uchio K, Costa AM et coll. (2002) Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound repair and regeneration* 10:86-92.
- Ma Y, Sturrock A, Weis JJ (1991) Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. *Infection and immunity* 59:671-8.
- Maas-Szabowski N, Fusenig NE (1996) Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* 107:849-55.
- Maas-Szabowski N, Szabowski A, Stark HJ et coll. (2001) Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 116:816-20.
- Machackova M, Obornik M, Kopecky J (2006) Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *in vivo*. *Folia parasitologica* 53:153-8.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Fish D (1987) Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari:Ixodidae). *The Journal of infectious diseases* 156:234-6.
- Male D, Brostoff J, Roth DB et coll. (2007) *Immunologie*. Elsevier.
- Malhotra R, Ward M, Sim RB et coll. (1999) Identification of human complement Factor H as a ligand for L-selectin. *The Biochemical journal* 341 (Pt 1):61-9.
- Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A et coll. (2009) Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature immunology* 10:587-94.
- Marchal C. (2009) Thèse de Doctorat d'Université. Inflammation cutanée et borréliose de Lyme : rôle de l'immunité innée et de la tique dans la transmission à l'homme de *Borrelia burgdorferi*. Université de Strasbourg, Strasbourg.
- Marchal C, Schramm F, Kern A et coll. (2011) Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. *Infection and immunity* 79:774-85.
- Marchal CM, Luft BJ, Yang X et coll. (2009) Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the *in vitro* interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of investigative dermatology* 129:2515-7.
- Marconi RT, Liveris D, Schwartz I (1995) Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *Journal of clinical microbiology* 33:2427-34.

- Margos G, Hojgaard A, Lane RS et coll. (2010) Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and tick-borne diseases* 1:151-8.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M et coll. (2009) A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and environmental microbiology* 75:5410-6.
- Marinkovich MP, Keene DR, Rimberg CS et coll. (1993) Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Developmental dynamic* 197:255-67.
- Marsch WC, Mayet A, Wolter M (1993) Cutaneous fibroses induced by *Borrelia burgdorferi*. *The British journal of dermatology* 128:674-8.
- Martin P (1997) Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75-81.
- Masuzawa T, Takada N, Kudeken M et coll. (2001) *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51:1817-24.
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M et coll. (1992) Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European *Ixodes ticks*. *Parasitology research* 78:695-8.
- Matyniak JE, Reiner SL (1995) T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. *The Journal of experimental medicine* 181:1251-4.
- McQuibban GA, Gong JH, Wong JP et coll. (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. *Blood* 100:1160-7.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7.
- Meis JF, Koopman R, van Bergen B et coll. (1993) No evidence for a relation between *Borrelia burgdorferi* infection and old lesions of localized scleroderma (morphea). *Archives of dermatology* 129:386-7.
- Mermod C, Aeschlimann A, Graf JF (1975) Écologie et éthologie d'*Ixodes ricinus* L. en Suisse. Deuxieme note: comparaison des populations 1972 et 1973. *Acarologia* 16:612-20.
- Miklosy J, Kasas S, Zurn AD et coll. (2008) Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *Journal of neuroinflammation* 5:40.
- Miller JC, Narayan K, Stevenson B et coll. (2005) Expression of *Borrelia burgdorferi* erp genes during infection of non-human primates. *Microbial pathogenesis* 39:27-33.

- Miller JC, Stevenson B (2006) *Borrelia burgdorferi* erp genes are expressed at different levels within tissues of chronically infected mammalian hosts. *International journal of medical microbiology* 296 Suppl 40:185-94.
- Montgomery RR, Lusitani D, De Boisfleury Chevance A et coll. (2004) Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infection and immunity* 72:2989-94.
- Montgomery RR, Nathanson MH, Malawista SE (1993) The fate of *Borrelia burgdorferi*, the agent for Lyme disease, in mouse macrophages. Destruction, survival, recovery. *Journal of immunology* 150:909-15.
- Montgomery RR, Nathanson MH, Malawista SE (1994) Fc- and non-Fc-mediated phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by macrophages. *The Journal of infectious diseases* 170:890-3.
- Moore MW, Cruz AR, LaVake CJ et coll. (2007) Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* potentiates innate immune activation and induces gamma interferon production. *Infection and immunity* 75:2046-62.
- Moreno C, Kutzner H, Palmedo G et coll. (2003) Interstitial granulomatous dermatitis with histiocytic pseudorosettes: a new histopathologic pattern in cutaneous borreliosis. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA sequences by a highly sensitive PCR-ELISA. *Journal of the American Academy of Dermatology* 48:376-84.
- Motaleb MA, Corum L, Bono JL et coll. (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:10899-904.
- Müllegger RR, Glatz M (2008) Skin manifestations of Lyme borreliosis: diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology* 9:355-68.
- Müllegger RR, McHugh G, Ruthazer R et coll. (2000) Differential expression of cytokine mRNA in skin specimens from patients with erythema migrans or acrodermatitis chronica atrophicans. *The Journal of investigative dermatology* 115:1115-23.
- Müllegger RR, Means TK, Shin JJ et coll. (2007) Chemokine signatures in the skin disorders of Lyme borreliosis in Europe: predominance of CXCL9 and CXCL10 in erythema migrans and acrodermatitis and CXCL13 in lymphocytoma. *Infection and immunity* 75:4621-8.
- Nahimana I, Gern L, Blanc DS et coll. (2004) Risk of *Borrelia burgdorferi* infection in western Switzerland following a tick bite. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 23:603-8.
- Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B et coll. (2002) A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect molecular biology* 11:641-50.
- Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S et coll. (2006) Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thrombosis and haemostasis* 96:7-13.

- Nazario S, Das S, de Silva AM et coll. (1998) Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 58:780-5.
- Neelakanta G, Li X, Pal U et coll. (2007) Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS pathogens* 3:e33.
- Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB et coll. (2004) Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia parasitologica* 51:67-71.
- Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ et coll. (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews Immunology* 9:679-91.
- Nigrovic LE, Thompson KM (2007) The Lyme vaccine: a cautionary tale. *Epidemiology and infection* 135:1-8.
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N et coll. (2007) Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *The Journal of investigative dermatology* 127:594-604.
- Norgard MV, Riley BS, Richardson JA et coll. (1995) Dermal inflammation elicited by synthetic analogs of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infection and immunity* 63:1507-15.
- Norman MU, Moriarty TJ, Dresser AR et coll. (2008) Molecular mechanisms involved in vascular interactions of the Lyme disease pathogen in a living host. *PLoS pathogens* 4:e1000169.
- Norris SJ, Carter CJ, Howell JK et coll. (1992) Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infection and immunity* 60:4662-72.
- Nuttall PA, Labuda M (2004) Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129 Suppl:S177-89.
- Ogden NH, Lindsay LR, Morshed M et coll. (2008) La borréliose de Lyme au Canada : un problème grandissant. *Relevé des maladies transmissibles au Canada* 34:1-19.
- Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM (2001) Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:670-5.
- Olson CM, Jr., Bates TC, Izadi H et coll. (2009) Local production of IFN-gamma by invariant NKT cells modulates acute Lyme carditis. *Journal of immunology* 182:3728-34.
- Oosting M, Berende A, Sturm P et coll. (2010) Recognition of *Borrelia burgdorferi* by NOD2 is central for the induction of an inflammatory reaction. *The Journal of infectious diseases* 201:1849-58.

- Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G et coll. (2007) Alarmins initiate host defense. *Advances in experimental medicine and biology* 601:185-94.
- Oschmann P, Dorndorf W, Hornig C et coll. (1998) Stages and syndromes of neuroborreliosis. *Journal of neurology* 245:262-72.
- Pachner AR, Delaney E, O'Neill T et coll. (1995) Inoculation of nonhuman primates with the N40 strain of *Borrelia burgdorferi* leads to a model of Lyme neuroborreliosis faithful to the human disease. *Neurology* 45:165-72.
- Pachner AR, Itano A, Ricalton N (1991) An outer surface protein is a major T cell antigen in experimental Lyme disease in CB6F1 mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 636:393-5.
- Pal U, Li X, Wang T et coll. (2004a) TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119:457-68.
- Pal U, Montgomery RR, Lusitani D et coll. (2001) Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-tick interactions in vivo by outer surface protein A antibody. *Journal of immunology* 166:7398-403.
- Pal U, Yang X, Chen M et coll. (2004b) OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *The Journal of clinical investigation* 113:220-30.
- Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA (2009) 'Nothing is permanent but change'- antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cellular microbiology* 11:1697-705.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature reviews Immunology* 4:617-29.
- Parola P, Raoult D (2001) Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases* 32:897-928.
- Parveen N, Leong JM (2000) Identification of a candidate glycosaminoglycan-binding adhesin of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* 35:1220-34.
- Paster BJ, Dewhirst FE (2000) Phylogenetic foundation of spirochetes. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2:341-4.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ et coll. (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual review of microbiology* 48:585-617.
- Pausa M, Pellis V, Cinco M et coll. (2003) Serum-resistant strains of *Borrelia burgdorferi* evade complement-mediated killing by expressing a CD59-like complement inhibitory molecule. *Journal of immunology* 170:3214-22.
- Pechova J, Stepanova G, Kovar L et coll. (2002) Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia parasitologica* 49:153-9.

Pejler G, Abrink M, Ringvall M et coll. (2007) Mast cell proteases. *Advances in immunology* 95:167-255.

Pérez-Eid C (2007) *Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Tec & Doc Lavoisier.

Perry AK, Chen G, Zheng D et coll. (2005) The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell research* 15:407-22.

Peters NC, Egen JG, Secundino N et coll. (2008) *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321:970-4.

Petzke MM, Brooks A, Krupna MA et coll. (2009) Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *Journal of immunology* 183:5279-92.

Pflieger D, Chabane S, Gaillard O et coll. (2006) Comparative proteomic analysis of extracellular matrix proteins secreted by two types of skin fibroblasts. *Proteomics* 6:5868-79.

Philipp MT, Aydintug MK, Bohm RP, Jr. et coll. (1993) Early and early disseminated phases of Lyme disease in the rhesus monkey: a model for infection in humans. *Infection and immunity* 61:3047-59.

Pick PJ (1894) Uber eine neue Krankheit "Erythromelie". *Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher* 66:336.

Picken RN, Strle F, Picken MM et coll. (1998) Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *The Journal of investigative dermatology* 110:211-4.

Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW et coll. (1991) ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 349:796-9.

Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ et coll. (1987) Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *Journal of clinical microbiology* 25:557-8.

Piesman J, Schneider BS, Zeidner NS (2001) Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *Journal of clinical microbiology* 39:4145-8.

Postic D, Garnier M, Baranton G (2007) Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *International journal of medical microbiology* 297:263-71.

Postic D, Ras NM, Lane RS et coll. (1998) Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *Journal of clinical microbiology* 36:3497-504.

- Prevot PP, Adam B, Boudjeltia KZ et coll. (2006) Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The Journal of biological chemistry* 281:26361-9.
- Prevot PP, Beschin A, Lins L et coll. (2009) Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The FEBS journal* 276:3235-46.
- Probert WS, Allsup KM, LeFebvre RB (1995) Identification and characterization of a surface-exposed, 66-kilodalton protein from *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 63:1933-9.
- Probert WS, Johnson BJ (1998) Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Molecular microbiology* 30:1003-15.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008) The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* 17:1063-72.
- Puechal X, Sibilia J (2009) What should be done in case of persistent symptoms after adequate antibiotic treatment for Lyme disease ? *Current problems in dermatology* 37:191-9.
- Raibaud S, Schwarz-Linek U, Kim JH et coll. (2005) *Borrelia burgdorferi* binds fibronectin through a tandem beta-zipper, a common mechanism of fibronectin binding in staphylococci, streptococci, and spirochetes. *The Journal of biological chemistry* 280:18803-9.
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U et coll. (2005) The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436:573-7.
- Ranki A, Aavik E, Peterson P et coll. (1994) Successful amplification of DNA specific for Finnish *Borrelia burgdorferi* isolates in erythema chronicum migrans but not in circumscribed scleroderma lesions. *The Journal of investigative dermatology* 102:339-45.
- Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J et coll. (1985) Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of experimental medicine* 161:332-44.
- Ribeiro JM, Mather TN (1998) *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental parasitology* 89:213-21.
- Ribeiro JM, Spielman A (1986) *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Experimental parasitology* 62:292-7.
- Ribeiro JM, Weis JJ, Telford SR, 3rd (1990) Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental parasitology* 70:382-8.
- Richter D, Schlee DB, Allgower R et coll. (2004) Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Applied and environmental microbiology* 70:6414-9.
- Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ et coll. (1997) Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies

of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clinical microbiology and infection* 3:109-16.

Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB et coll. (2006) Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS genetics* 2:e119.

Rinn JL, Wang JK, Liu H et coll. (2008) A systems biology approach to anatomic diversity of skin. *The Journal of investigative dermatology* 128:776-82.

Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G (2009) Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites ? *Trends in parasitology* 25:505-10.

Rosa PA, Tilly K, Stewart PE (2005) The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature reviews Microbiology* 3:129-43.

Rousselle JC, Callister SM, Schell RF et coll. (1998) Borreliacidal antibody production against outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of infectious diseases* 178:733-41.

Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L et coll. (2011) *Borrelia carolinensis* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolated from rodents and a tick from the south-eastern USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61:381-3.

Rudenko N, Golovchenko M, Lin T et coll. (2009a) Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *Journal of clinical microbiology* 47:3875-80.

Rudenko N, Golovchenko M, Ruzek D et coll. (2009b) Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS microbiology letters* 292:274-81.

Ruzic-Sabljić E, Lotric-Furlan S, Maraspin V et coll. (2001) Analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from cerebrospinal fluid. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 109:707-13.

Ruzic-Sabljić E, Maraspin V, Lotric-Furlan S et coll. (2002) Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wiener klinische Wochenschrift* 114:544-50.

Sa-Nunes A, Báfica A, Antonelli LR et coll. (2009) The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *Journal of immunology* 182:7422-9.

Sa-Nunes A, Báfica A, Lucas DA et coll. (2007) Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *Journal of immunology* 179:1497-505.

Saalbach A, Klein C, Sleeman J et coll. (2007) Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells. *Journal of immunology* 178:4966-74.

Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews Immunology* 8:559-68.

Saito K, Ito T, Asashima N et coll. (2007) Case report: *Borrelia valaisiana* infection in a Japanese man associated with traveling to foreign countries. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77:1124-7.

Saksela O, Rifkin DB (1988) Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annual review of cell biology* 4:93-126.

Salazar JC, Duhnam-Ems S, La Vake C et coll. (2009) Activation of human monocytes by live *Borrelia burgdorferi* generates TLR2-dependent and -independent responses which include induction of IFN- β . *PLoS pathogens* 5:e1000444.

Sambri V, Aldini R, Massaria F et coll. (1996) Uptake and killing of Lyme disease and relapsing fever borreliae in the perfused rat liver and by isolated Kupffer cells. *Infection and immunity* 64:1858-61.

Sangamnatdej S, Paesen GC, Slovak M et coll. (2002) A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect molecular biology* 11:79-86.

Schempp C, Bocklage H, Lange R et coll. (1993) Further evidence for *Borrelia burgdorferi* infection in morphea and lichen sclerosus et atrophicus confirmed by DNA amplification. *The Journal of investigative dermatology* 100:717-20.

Schittek B, Hipfel R, Sauer B et coll. (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology* 2:1133-7.

Schneider BS, Higgs S (2008) The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102:400-8.

Schoeler GB, Lane RS (1993) Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the western blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology* 30:80-6.

Schoeler GB, Manweiler SA, Wikel SK (2000) Cytokine responses of C3H/HeN mice infested with *Ixodes scapularis* or *Ixodes pacificus* nymphs. *Parasite immunology* 22:31-40.

Schramm F, De Martino S, Jaulhac B (2009) Biologie des *Borrelia* et diagnostic biologique de la borréliose de Lyme. *Les Nouvelles Dermatologiques* 28:9-15.

Schroeder H, Daix V, Gillet L et coll. (2007) The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes and infection* 9:247-50.

-
- Schuijt TJ, Hovius JW, van Burgel ND et coll. (2008) The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infection and immunity* 76:2888-94.
- Schwan TG, Piesman J (2000) Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *Journal of clinical microbiology* 38:382-8.
- Schwan TG, Piesman J, Golde WT et coll. (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:2909-13.
- Scrimenti RJ (1970) Erythema chronicum migrans. *Archives of dermatology* 102:104-5.
- Seemanapalli SV, Xu Q, McShan K et coll. (2010) Outer surface protein C is a dissemination-facilitating factor of *Borrelia burgdorferi* during mammalian infection. *PLoS One* 5:e15830.
- Sellati TJ, Abrescia LD, Radolf JD et coll. (1996) Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* activate vascular endothelium *in vitro*. *Infection and immunity* 64:3180-7.
- Sellati TJ, Burns MJ, Ficazzola MA et coll. (1995) *Borrelia burgdorferi* upregulates expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils *in vitro*. *Infection and immunity* 63:4439-47.
- Seshu J, Esteve-Gassent MD, Labandeira-Rey M et coll. (2006) Inactivation of the fibronectin-binding adhesin gene *bbk32* significantly attenuates the infectivity potential of *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* 59:1591-601.
- Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Current opinion in cell biology* 10:602-8.
- Shi C, Sahay B, Russell JQ et coll. (2011) Reduced immune response to *Borrelia burgdorferi* in the absence of gamma delta T cells. *Infection and immunity*
- Shi Y, Xu Q, McShan K et coll. (2008a) Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 76:1239-46.
- Shi Y, Xu Q, Seemanapalli SV et coll. (2008b) Common and unique contributions of decorin-binding proteins A and B to the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 3:e3340.
- Shin OS, Isberg RR, Akira S et coll. (2008) Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptors 2, 5, and 9 in phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and cytokine induction. *Infection and immunity* 76:2341-51.
- Siegel C, Hallstrom T, Skerka C et coll. (2010) Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 5:e13519.
- Silzle T, Randolph GJ, Kreutz M et coll. (2004) The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *International journal of cancer* 108:173-80.

- Simon R, Lam A, Li MC et coll. (2007) Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer informatics* 3:11-7.
- Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine* 341:738-46.
- Singh SK, Girschick HJ (2006) Toll-like receptors in *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation. *Clinical microbiology and infection* 12:705-17.
- Sinnis P, Zavala F (2008) The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. *Future microbiology* 3:275-8.
- Sjowall J, Carlsson A, Vaarala O et coll. (2005) Innate immune responses in Lyme borreliosis: enhanced tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12 in asymptomatic individuals in response to live spirochetes. *Clinical and experimental immunology* 141:89-98.
- Sjowall J, Fryland L, Nordberg M et coll. (2011) Decreased Th1-type inflammatory cytokine expression in the skin is associated with persisting symptoms after treatment of erythema migrans. *PLoS One* 6:e18220.
- Skalova A, Iezzi G, Ampenberger F et coll. (2008) Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *Journal of immunology* 180:6186-92.
- Skare JT, Mirzabekov TA, Shang ES et coll. (1997) The Oms66 (p66) protein is a *Borrelia burgdorferi* porin. *Infection and immunity* 65:3654-61.
- Smetanick MT, Zellis SL, Ermolovich T (2010) Acrodermatitis chronica atrophicans: a case report and review of the literature. *Cutis* 85:247-52.
- Smith RS, Smith TJ, Blieden TM et coll. (1997) Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *The American journal of pathology* 151:317-22.
- Soares CA, Lima CM, Dolan MC et coll. (2005) Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect molecular biology* 14:443-52.
- Sorrell JM, Caplan AI (2004) Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of cell science* 117:667-75.
- Sorrell JM, Caplan AI (2009) Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *International review of cell and molecular biology* 276:161-214.
- Stanek G, Strle F (2003) Lyme borreliosis. *Lancet* 362:1639-47.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L (2004) The emergence of Lyme disease. *The Journal of clinical investigation* 113:1093-101.

- Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN et coll. (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *The New England journal of medicine* 308:733-40.
- Steere AC, Malawista SE, Hardin JA et coll. (1977a) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Annals of internal medicine* 86:685-98.
- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR et coll. (1977b) Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis and rheumatism* 20:7-17.
- Steere AC, Sikand VK, Meurice F et coll. (1998) Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *The New England journal of medicine* 339:209-15.
- Sterka D, Jr., Marriott I (2006a) Characterization of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein expression in primary murine microglia. *Journal of neuroimmunology* 179:65-75.
- Sterka D, Jr., Rati DM, Marriott I (2006b) Functional expression of NOD2, a novel pattern recognition receptor for bacterial motifs, in primary murine astrocytes. *Glia* 53:322-30.
- Stevens A, Lowe JS, Caratero C et coll. (2006) *Histologie humaine*, 3ème édition edn. Elsevier.
- Stevenson B, El-Hage N, Hines MA et coll. (2002) Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infection and immunity* 70:491-7.
- Stewart PE, Byram R, Grimm D et coll. (2005) The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* 53:1-13.
- Straubinger RK, Straubinger AF, Harter L et coll. (1997) *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. *Infection and immunity* 65:1273-85.
- Strle F, Stanek G (2009) Clinical manifestations and diagnosis of lyme borreliosis. In: *Current problems in dermatology* (Lipsker D, Jaulhac B eds) Karger: Basel, 51-110
- Suhonen J, Hartiala K, Viljanen MK (1998) Tube phagocytosis, a novel way for neutrophils to phagocytize *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 66:3433-5.
- Suhonen J, Komi J, Soukka J et coll. (2003) Interaction between *Borrelia burgdorferi* and immature human dendritic cells. *Scandinavian journal of immunology* 58:67-75.
- Surasombatpattana P, Hamel R, Patramool S et coll. (2011) Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. *Infection, genetics and evolution* 11:1664-73.

- Szczepanski A, Fleit HB (1988) Interaction between *Borrelia burgdorferi* and polymorphonuclear leukocytes phagocytosis and the Induction of the respiratory burst. *Annals of the New York Academy of Sciences* 539:425–8.
- Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG (1987) Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 55:2311-3.
- Talkington J, Nickell SP (1999) *Borrelia burgdorferi* spirochetes induce mast cell activation and cytokine release. *Infection and immunity* 67:1107-15.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A et coll. (2003) DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 197:823-9.
- Thangamani S, Higgs S, Ziegler S et coll. (2010) Host immune response to mosquito-transmitted chikungunya virus differs from that elicited by needle inoculated virus. *PLoS One* 5:e12137.
- Tilly K, Bestor A, Jewett MW et coll. (2007) Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. *Infection and immunity* 75:1517-9.
- Tilly K, Krum JG, Bestor A et coll. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infection and immunity* 74:3554-64.
- Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite immunology* 28:131-41.
- Tsinganou E, Gebbers JO (2010) Human intestinal spirochetosis—a review. *German medical science* 8:Doc01.
- Tupin E, Benhnia MR, Kinjo Y et coll. (2008) NKT cells prevent chronic joint inflammation after infection with *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:19863-8.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:5116-21.
- Tyson K, Elkins C, Patterson H et coll. (2007) Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect molecular biology* 16:469-79.
- Vaillant L, Goudeau A (1992) Localized scleroderma is not a *Borrelia burgdorferi* infection in France. *Dermatology* 184:286-8.
- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN et coll. (2000) Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry* 275:18717-23.

- Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A et coll. (2000) Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96:2673-81.
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A et coll. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of immunology* 173:6521-5.
- Vaziri-Sani F, Hellwage J, Zipfel PF et coll. (2005) Factor H binds to washed human platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis* 3:154-62.
- Verma A, Brissette CA, Bowman A et coll. (2009) *Borrelia burgdorferi* BmpA is a laminin-binding protein. *Infection and immunity* 77:4940-6.
- Vincent MS, Roessner K, Lynch D et coll. (1996) Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by *Borrelia*-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *The Journal of experimental medicine* 184:2109-17.
- Vu TH, Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development* 14:2123-33.
- Wang G, Ma Y, Buyuk A et coll. (2004) Impaired host defense to infection and Toll-like receptor 2-independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR2-deficient C3H/HeJ mice. *FEMS microbiology letters* 231:219-25.
- Wang G, van Dam AP, Le Fleche A et coll. (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *International journal of systematic bacteriology* 47:926-32.
- Wang J, Hori K, Ding J et coll. (2011) Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Journal of cellular physiology* 226:1265-73.
- Weber K, Preac-Mursic V, Reimers CD (1988) Spirochetes isolated from two patients with morphea. *Infection* 16:25-6.
- Weide B, Schitteck B, Klyszcz T et coll. (2000) Morphea is neither associated with features of *Borrelia burgdorferi* infection, nor is this agent detectable in lesional skin by polymerase chain reaction. *The British journal of dermatology* 143:780-5.
- Werner S (1998) Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine & growth factor reviews* 9:153-65.
- Werner S, Krieg T, Smola H (2007) Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 127:998-1008.
- Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C et coll. (2004) *Borrelia*-specific interferon-gamma and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *The Journal of infectious diseases* 189:1881-91.

- Wienecke R, Schlupen EM, Zochling N et coll. (1995) No evidence for *Borrelia burgdorferi*-specific DNA in lesions of localized scleroderma. *The Journal of investigative dermatology* 104:23-6.
- Wikel SK (1999) Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International journal for parasitology* 29:851-9.
- Wikel SK, Graham JE, Allen JR (1978) Acquired resistance to ticks. IV. Skin reactivity and *in vitro* lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen. *Immunology* 34:257-63.
- Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK et coll. (1997) Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infection and immunity* 65:335-8.
- Wooten RM, Ma Y, Yoder RA et coll. (2002) Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *Journal of immunology* 168:348-55.
- Wu J, Weening EH, Faske JB et coll. (2011) Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires β 1 integrins and Src kinase activity. *Infection and immunity* 79:1338-48.
- Xu Q, McShan K, Liang FT (2008) Essential protective role attributed to the surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* against innate defences. *Molecular microbiology* 69:15-29.
- Xu Q, Seemanapalli SV, McShan K et coll. (2006) Constitutive expression of outer surface protein C diminishes the ability of *Borrelia burgdorferi* to evade specific humoral immunity. *Infection and immunity* 74:5177-84.
- Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M et coll. (1999) Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *The Journal of investigative dermatology* 112:483-8.
- Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281-4.
- Yamasaki K, Gallo RL (2008) Antimicrobial peptides in human skin disease. *European journal of dermatology* 18:11-21.
- Yang X, Goldberg MS, Popova TG et coll. (2000) Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* 37:1470-9.
- Yang XF, Pal U, Alani SM et coll. (2004) Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *The Journal of experimental medicine* 199:641-8.
- Yoshinari NH, Reinhardt BN, Steere AC (1991) T cell responses to polypeptide fractions of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis. *Arthritis and rheumatism* 34:707-13.

Zalaudek I, Leinweber B, Kerl H et coll. (2005) Acrodermatitis chronica atrophicans in a 15-year-old girl misdiagnosed as venous insufficiency for 6 years. *Journal of the American Academy of Dermatology* 52:1091-4.

Zambrano MC, Beklemisheva AA, Bryksin AV et coll. (2004) *Borrelia burgdorferi* binds to, invades, and colonizes native type I collagen lattices. *Infection and immunity* 72:3138-46.

Zeidner NS, Schneider BS, Nuncio MS et coll. (2002) Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *The Journal of parasitology* 88:1276-8.

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG et coll. (1997) Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell* 89:275-85.

Zhao Z, Chang H, Trevino RP et coll. (2003) Selective up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human erythema migrans skin lesions of acute lyme disease. *The Journal of infectious diseases* 188:1098-104.

Inflammation cutanée et borréliose de Lyme

Résumé

Nous avons étudié le rôle de l'immunité innée de la peau lors de la transmission des *Borrelia* (agent infectieux de la borréliose de Lyme) par son vecteur, une tique dure du genre *Ixodes*. Nous avons montré que la salive de tique et la protéine salivaire Salp15 inhibent la réaction inflammatoire (production de chimiokines et de peptides antimicrobiens) des kératinocytes induite par *Borrelia*. Cet effet anti-« alarmine » de la salive de tique contribue probablement à créer un environnement cutané local favorable à la transmission de *Borrelia*. Nous avons montré que *Borrelia* induit également au niveau des fibroblastes cutanés la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires. Nous avons observé un effet toxique direct de la salive de tique sur les fibroblastes cutanés : cet effet dose-dépendant est de nature protéique mais non lié à la protéine Salp15. Ces résultats indiquent que les fibroblastes jouent un rôle important dans l'inflammation cutanée induite par *Borrelia*.

Mots clés : Immunité innée cutanée ; Borréliose de Lyme ; Cellules résidentes de la peau : kératinocytes, fibroblastes ; Peptides antimicrobiens ; Salive de tique.

Résumé en anglais

We studied the role of the skin innate immunity during the transmission of *Borrelia* (the infectious agent of Lyme borreliosis) by its vector, a hard tick belonging to the genus *Ixodes*. We showed that tick saliva and its protein Salp15 both inhibit *Borrelia*-induced inflammatory reaction of keratinocytes. The antialarmin effect of tick saliva ensures a favorable environment for *Borrelia*. We also showed that *Borrelia* induces a strong inflammatory response in dermal fibroblasts. We also demonstrate a dose-dependent lytic effect of tick salivary gland extracts on dermal fibroblasts and that this cytotoxic effect was of proteinaceous nature and not related to Salp15. These results indicate that dermal fibroblasts could be considered as central mediators in immune cell recruitment to the skin site of *Borrelia* invasion.

Key words : Cutaneous innate immunity; Lyme borreliosis; Skin resident cells: keratinocytes, fibroblasts; Antimicrobial peptides; Tick saliva.