



HAL
open science

Borréliose de Lyme : rôle de l'interface cutanée et du microbiome dans la physiopathologie de la maladie

Antoine Grillon

► **To cite this version:**

Antoine Grillon. Borréliose de Lyme : rôle de l'interface cutanée et du microbiome dans la physiopathologie de la maladie. Microbiologie et Parasitologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ097 . tel-02003633

HAL Id: tel-02003633

<https://theses.hal.science/tel-02003633>

Submitted on 1 Feb 2019

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE 414

EA 7290, virulence bactérienne précoce, groupe borréliose de Lyme

THÈSE présentée par :

Antoine Grillon

Soutenue le : 14 Novembre 2017

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**Borréliose de Lyme. Rôle de l'interface cutanée
et du microbiome dans la physiopathologie de
la maladie.**

THÈSE dirigée par :

Mme BOULANGER Nathalie

MCU, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BONNET Sarah

M. LEVEQUE Nicolas

Docteur, INRA, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

PU-PH, Hôpitaux Universitaire de Poitiers

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. BLANC Frédéric

PH, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg

REMERCIEMENTS

A MME LE DOCTEUR SARAH I. BONNET ET A MR LE PROFESSEUR NICOLAS LEVEQUE

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

A Mr le Docteur Frédéric Blanc

Merci de vous rendre disponible pour évaluer ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

A Mme Le Docteur Nathalie Boulanger

Merci d'avoir dirigé ce travail de thèse. Soyez assurée de mon profond respect.

A Mr le Professeur Benoit Jaulhac

Merci de votre soutien lors de ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

A Mme Cathy Barthel, Mme Elody Collin, Mme Laurence Zilliox et Mme Danièle Napolitano

Merci de votre gentillesse et de votre disponibilité au quotidien.

A Mme le Professeur Laurence Sabatier et l'équipe de l'IPHC de Cronenbourg

Merci de votre implication dans ce travail et ceux à venir...

A mes parents

Et de deux ! Merci de votre soutien inconditionnel.

A Céline, Jeanne et Charlotte

Avec tout mon amour

INTRODUCTION	7
I. La Borréliose de Lyme.....	7
A. Historique.....	7
B. Epidémiologie de la borréliose de Lyme.....	7
C. Manifestations cliniques.....	9
D. Le vecteur : La tique du genre <i>Ixodes</i>	16
1. Taxonomie.....	16
2. Anatomie.....	17
3. Cycle de vie de <i>I. ricinus</i>	18
4. Répartition géographique	19
5. Transmission de <i>Borrelia</i> par la tique à l'Homme.....	20
6. La salive des <i>Ixodes</i>	21
E. Le pathogène : <i>Borrelia</i> sp.....	26
1. Morphologie	27
2. Structure génétique	28
3. Interactions entre <i>Borrelia</i> et <i>Ixodes</i> lors de son acquisition par la tique.....	29
F. Diagnostic biologique de la Borréliose de Lyme.....	31
1. Culture de la bactérie.....	31
2. Biologie moléculaire	31
3. Sérologie.....	32
G. Modèles animaux pour l'étude de la maladie de Lyme.....	34
1. Le chien (Beagles).....	34
2. Le primate non humain	36
3. Les lagomorphes	38
4. Les rongeurs.....	39
II. La peau	48
A. Structure et composants principaux.....	48
1. L'épiderme et les kératinocytes.....	50
2. La jonction dermo-épidermique.....	53
3. Le derme et l'hypoderme.....	53
B. Les défenses immunitaires de la peau	56
1. Les kératinocytes	56
2. Les Fibroblastes.....	65
3. Cellules présentatrices de l'antigène, cellules dendritiques et macrophages	66
4. Les cellules T	68
5. Les mastocytes	69
C. Le microbiote cutané	69
1. Composition du microbiote cutané.....	70
2. Rôle du microbiote cutané sur l'immunité.....	74
III. Interactions peau et <i>Borrelia</i>	80
A. Intéractions de <i>Borrelia</i> avec la peau de l'hôte vertébré.....	80
1 Les adhésines de <i>Borrelia</i>	80
2. Relation avec le système immunitaire inné.....	82
3. Relation avec les cellules immunitaires cutanées.....	86
B. Mécanismes d'échappement immunitaire de <i>Borrelia</i>	95
PRESENTATION DES TRAVAUX DE THESE.....	96
RESULTATS.....	101
Etude de la latence cutanée de <i>Borrelia</i> et impact sur la physiopathologie de la maladie	102
Interactions entre le microbiome cutané et <i>Borrelia</i> dans la physiopathologie de la maladie	117
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	134
BIBLIOGRAPHIE.....	144

Liste des abréviations

ACA : acrodermatite chronique atrophiante

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BCR : B cell receptor

BSK : Barbour – Stoenner – Kelly

CD : cluster de différenciation

CFHRs : complement factor H-related proteins

CLA : cutaneous lymphocyte-associated antigen

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CRASP : complement regulator-acquiring surface protein

CSF : colony stimulating factor

CTLRs : C-type lectin receptors

Dbp : decorin binding protein

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

EM : érythème migrant

Erp : OspE-F related lipoprotein

FB : fibroblastes

FGF : fibroblast growth factor

GAG : glycosaminoglycane

GM-CSF : granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

hBD : human β -defensin

IFN : interféron

IL : interleukine

Irac : *Ixodes ricinus* salivary anticomplement protein

Kb : kilobases

KC : kératinocytes

KGF : keratinocyte growth factor

LCR : liquide céphalo-rachidien

LPS : lipopolysaccharide

LTA : acide lipotéchoïque

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1
MMP : matrix metalloprotease
MSCRAMMs : microbial surface components recognising adhesive matrix molecules
MyD88 : myeloid differentiation primary response gene 88
NET : Nuclear extra-cellular Trap
NK : natural killer cell
NKT : natural killer T lymphocyte
NLR : nucleotide-binding domain and leucine- rich repeat- containing molecule
NOD : nucleotide oligomerization domain
Osp : outer surface protein
PAMPs : pathogen associated molecular patterns
PBMCs : peripheral blood mononuclear cells
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PRR : pattern recognition receptor
ROS : reactive oxygen species
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
Salp : salivary protein
TLR : Toll-like receptor
TNF : tumor necrosis factor
TROSPA : tick receptor for OspA
VEGF : vascular endothelial growth factor
VlseE : VMP (vesicular membrane protein)-like sequence E

Liste des Figures

Figure 1 Estimation du taux d'incidence annuel moyen de la borréliose de Lyme.....	8
Figure 2 Exemples d'érythèmes migrants chez l'adulte	10
Figure 3 Coupe histologique de peaux de patients ayant un érythème migrant	10
Figure 4 Exemple d'arthrite de Lyme.....	12
Figure 5 Lymphocytome borrélien	13
Figure 6 Acrodermatite chronique atrophiante.....	15
Figure 7 Nymphes d' <i>Ixodes ricinus</i> gorgées et non gorgées	16
Figure 8 Morphologie de la tique <i>Ixodes ricinus</i>	17
Figure 9 Cycle de vie et hôte de la tique du genre <i>Ixodes</i>	18
Figure 10 Répartition géographique des espèces de tiques du genre <i>Ixodes</i>	19
Figure 11 Position taxonomique des diverses espèces de la Famille des <i>Borreliaceae</i> ...	26
Figure 12 Morphologie des <i>Borrelia</i>	27
Figure 13 Structure génétique de <i>Borrelia burgdorferi</i>	28
Figure 14 Structure générale de la peau.....	49
Figure 15 Organisation de l'épiderme et des kératinocytes	52
Figure 16 Composants de la matrice extracellulaire de la peau.....	55
Figure 17 Principales actions des récepteurs de types Toll, NOD et Lectine de type C ...	60
Figure 18 Voies d'activation associées aux TLRs	60
Figure 19 Mode d'action antibactérien de LL-37	62
Figure 20 Distribution topographique des bactéries selon divers sites cutanés.....	72
Figure 21 Sources principales de nutriments pour les bactéries sur le tissu cutané.....	73
Figure 22 Mécanismes d'action de germes commensaux contre les bactéries.....	75
Figure 23 Composants cellulaires cutanés et contrôle de l'immunité par les microorganismes commensaux	79
Figure 24 Reconnaissance et fonctions des Pattern Recognition Receptors	85
Figure 25 Relation hypothétique entre les cellules immunitaires et <i>Borrelia</i> lors de la transmission de <i>Borrelia</i>	94

Liste des Tableaux

Tableau 1 Principales cytokines et chimiokines produites par les kératinocytes.....	64
Tableau 2 Classification des bactériocines	76
Tableau 3 Activité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des adhésines de <i>Borrelia</i>	81

Introduction

I. La Borréliose de Lyme

A. Historique

Les premières descriptions de la maladie ont été rapportées en Europe dès la fin du XIX^e siècle (1894 par Pick). En 1902, Herxheimer et Hartmann décrivent la maladie de Pick-Herxheimer qui portera par la suite le nom d'acrodermatite chronique atrophiante (ACA)(Herxheimer and Hartmann 1902). L'érythème migrant (EM) a quant à lui été décrit en 1910 par Afzelius (Afzelius 1910) puis en 1913 par Lipschütz qui proposa le terme d'« erythema chronicum migrans » ou érythème de Lipschütz (Lipschütz 1913). Les premières manifestations neurologiques de la maladie furent décrites par Garin et Bujadoux en 1922 (Garin and Bujadoux 1922) puis le lymphocytome cutané bénin, appelé par la suite lymphocytome borrélien fut dénommé ainsi en 1943 par Bäfverstedt (Bäfverstedt 1943). C'est aux Etats-Unis en 1977 que fut donné le nom de maladie de Lyme, en référence à la commune d'Old Lyme dans le Connecticut, regroupant plusieurs cas d'arthrites après piqûres de tique (Steere et al. 1977a, 1977b). C'est en 1982 que le pathogène de la famille des spirochètes fut mis en évidence par Burgdorfer. Aujourd'hui, l'espèce type est dénommée *Borrelia burgdorferi*¹, en hommage à Amédée Borrel² et à Burgdorfer (Burgdorfer et al. 1982).

B. Epidémiologie 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. 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. En 2015, le nombre de cas déclarés aux Etats Unis étaient de 28 453 et le nombre de cas probables de 9616 (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

¹ Le nom de genre *Borrelia* a été créé en 2014 pour éviter la confusion entre les bactéries responsables de la borréliose de Lyme et celles responsables des fièvres récurrentes. Voir paragraphe « Le pathogène ».

² Directeur de l'institut d'Hygiène et de Bactériologie de Strasbourg, de 1919 à 1936.

Le nombre de cas possibles est estimé à 300 000. En France, sur la même année, l'estimation du nombre de cas était de 33202 (Santé publique France, 2016). 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 Slovaquie (Hubálek 2009). L'incidence française est également variable d'une région à une autre avec les anciennes régions Alsace et Limousin comme chefs de file (Figure 1).

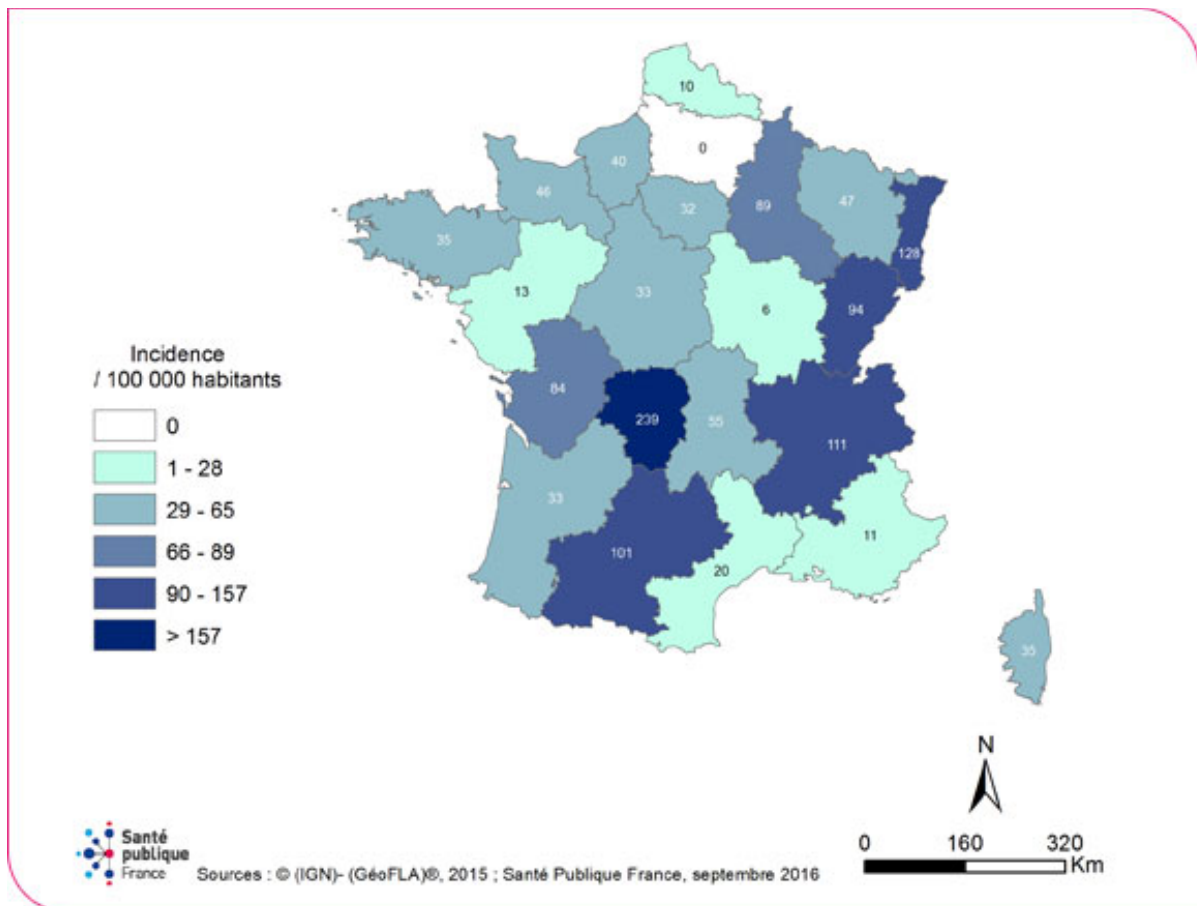


Figure 1 Estimation du taux d'incidence annuel moyen de la borréliose de Lyme par Région, France 2010-2015 réseau sentinelles (Santé publique France 2016)

C. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme sont classiquement organisées en trois phases.

La **phase localisée précoce** correspond à l'apparition au point de piqûre d'un **érythème migrant** (Figure 2A,2B et 2C), c'est à dire d'une lésion maculopapuleuse érythémateuse de plus de 5 cm de diamètre avec ou sans décoloration centrale, s'étendant de manière annulaire et centrifuge sur une période de quelques jours à quelques semaines (Stanek et al. 2012). Sa fréquence est variable en fonction des études, mais se situe autour de 70 à 80% des patients présentant une borréliose de Lyme confirmée en Europe (Strle and Stanek 2009). La bordure active de la lésion associe au front de migration des *Borrelia* dans la peau la réaction inflammatoire cutanée. 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 al. 1995). Cette lésion peut évoluer pendant plusieurs semaines ou mois avant de régresser spontanément puis de disparaître.

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 lympho-histiocytaire, et la présence dans une moindre mesure de plasmocytes, de polynucléaires neutrophiles et de cellules de Langerhans (de Koning 1993; Hulinska et al. 1994) (Figure 3). L'aspect histologique de la bordure inflammatoire des lésions et de la peau « saine » péri-lésionnelle montre également un infiltrat lympho-histiocytaire du derme, essentiellement péri-vasculaire. L'épiderme est épargné, mais l'infiltration 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 al. 1994).

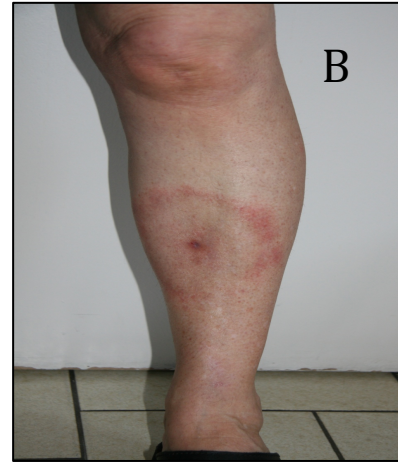
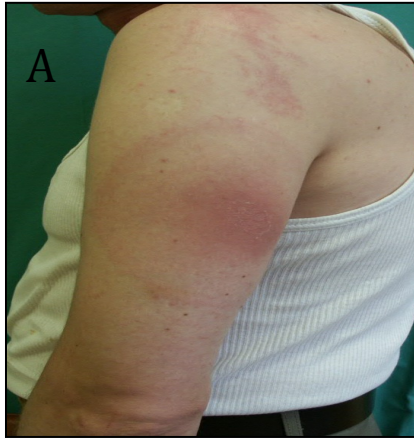


Figure 2 Exemples d'érythèmes migrants chez l'adulte au niveau du bras (A), de la jambe (B) ou du dos (C).
Photos de la collection de la Clinique de Dermatologie de Strasbourg

Infiltrat lymphocytaire périvasculaire

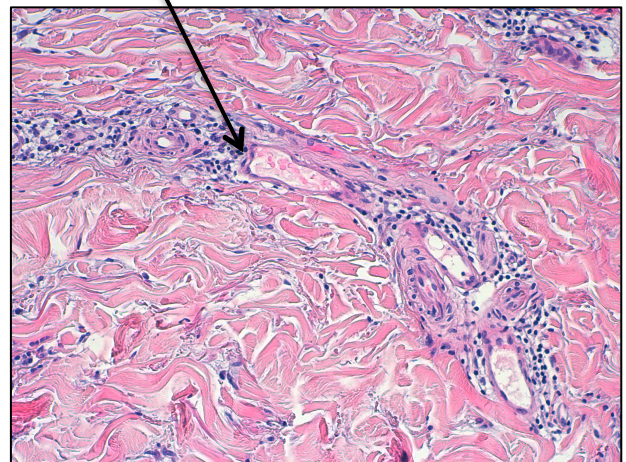
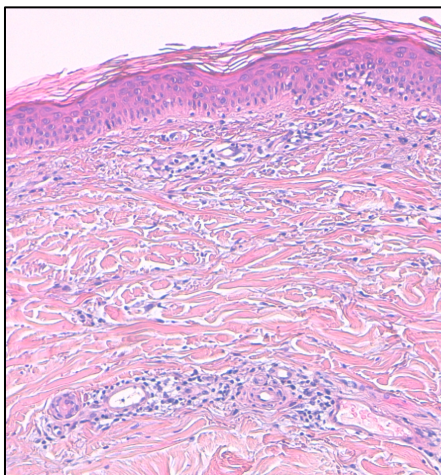


Figure 3 Coupe histologique de peaux de patients ayant un érythème migrant. Photos de la collection de la
Clinique de Dermatologie de Strasbourg

La **phase disséminée précoce**, concomitante ou décalée par rapport à la phase localisée, correspond à l'apparition de deux (ou plus) érythèmes migrants, d'un lymphocytome cutané, à l'apparition d'une neuroborréliose ou d'une symptomatologie cardiaque, articulaire ou oculaire (Stanek et al. 2012). Elle correspond à la dissémination par voie hématogène du pathogène vers les organes distants et profonds. L'atteinte neurologique se manifeste principalement chez l'adulte par des méningo-radiculites sensitives, et les localisations crâniennes de la méningo-radiculite sont fréquentes. Toutes les paires de nerfs crâniens peuvent être touchées, mais l'atteinte uni ou bilatérale du nerf facial est prépondérante, en particulier chez l'enfant. Des atteintes méningées (méningites lymphocytaires) 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 (Oschmann et al. 1998). 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 and Stanek 2009) et les atteintes oculaires peuvent concerner toutes les tuniques de l'œil (conjonctive, cornée, corps vitré, rétine) ainsi que le nerf optique (Bodaghi 2007). Les atteintes articulaires se manifestent essentiellement par des mono ou oligo-arthrites, touchant préférentiellement le genou (Figure 4) (Lipsker and Jaulhac 2009). Ces manifestations articulaires semblent par ailleurs plus fréquentes aux Etats-Unis qu'en Europe (Herzer 1996). L'arthrite de Lyme entraîne un épanchement synovial avec une synovite chronique hypertrophique qui peut évoluer vers une ostéoarthrite avec érosion cartilagineuse et osseuse (Moguelet 2007). L'infiltrat inflammatoire correspond à une synovite non spécifique, riche en cellules³, composée d'une majorité de lymphocytes formant parfois de nombreux follicules lymphoïdes et de plasmocytes. Le liquide articulaire est quant à lui infiltré majoritairement de polynucléaires neutrophiles (Stanek et al. 2012). Les mastocytes peuvent aisément être retrouvés dans les zones où la vascularisation est augmentée (Lipsker and Jaulhac 2009). La présence de ces lésions vasculaires associées à d'abondants dépôts fibrineux interstitiels (représentant plus de 50 % du fragment biopsique) est très évocatrice d'une arthrite de Lyme et permet d'éliminer une arthrite rhumatoïde ou un syndrome de Reiter (Moguelet 2007).

³ Souvent > 2000 Globules blancs par mL (Moguelet 2007)



Figure 4 Exemple d'arthrite de Lyme d'après (Arvikar and Steere 2015)

Le lymphocytome borrélien ne concerne presque qu'exclusivement les formes européennes. Cette manifestation est rare. Dans une étude allemande datant de 1999, seuls 2% des patients atteints de borréliose de Lyme présentaient un lymphocytome (Huppertz et al. 1999). 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) (Figure 5) et la région aréolo-mamelonnaire (chez l'adulte), mais le visage, le tronc et le scrotum peuvent également être concernés par cette lésion (Schramm et al. 2013).

Si l'histologie est indispensable pour affirmer l'existence de l'infiltrat lymphocytaire, le diagnostic de lymphocytome ne peut être retenu après intégration des différentes données cliniques, histologiques, immunohisto-chimiques et moléculaires, permettant d'éliminer son principal diagnostic différentiel : le lymphome B centro-folliculaire primitivement cutané (Moguelet 2007).



Figure 5 Lymphocytome borrélien d'après (Stanek et al. 2012)

La **phase disséminée tardive** se manifeste particulièrement par des atteintes articulaires (arthrites) ou cutanées (ACA) (Stanek et al. 2012).

L'évolution de l'ACA se déroule en **deux phases** et contrairement aux autres manifestations cutanées, elle ne disparaît pas spontanément (Steere 1989). Le début est insidieux avec la présence d'œdèmes, de plaques infiltrées inflammatoires isolées, de nodules ou gonflements aux extrémités. Dans un premier temps, une **phase inflammatoire** apparaît, caractérisée par un érythème bleu violacé, plus ou moins oedémateux voire cyanotique, qui prédomine sur les faces d'extension des membres, dans leur région acrale et en regard des surfaces articulaires (Müllegger & Glatz, 2008). L'érythème et l'œdème vont en général s'étendre par la suite. L'atteinte cutanée est souvent unilatérale, elle peut devenir plus ou moins symétrique plus tardivement. Cette phase peut durer plusieurs semaines ou plusieurs mois. En l'absence de traitement, une atrophie dermo-épidermique qui caractérise la **phase d'état** apparaît lentement et progressivement. Elle siège principalement aux extrémités et peut atteindre les membres inférieurs jusqu'aux crêtes iliaques, les membres supérieurs, et plus rarement, la totalité du tégument. L'atteinte isolée d'un membre est toutefois possible, mais, dans la règle générale, les lésions se développent symétriquement. C'est cette progression en quelques mois vers une phase atrophique irréversible qui lui confère son nom et son aspect caractéristique (Lipsker, 2007). Les lésions sont alors caractérisées par des

plaques atrophiques violacées où l'épiderme est aminci. La peau devient plus fine : elle est plissée et luisante. L'épiderme paraît fané, comme du « papier à cigarette » froissé, avec un aspect brillant. Le réseau veineux superficiel est anormalement visible et d'une coloration très spéciale rose violacée avec des reflets bleutés cyanotiques ou rouge brunâtre (« érythromélie »). Au toucher, la peau est lisse et a perdu de son élasticité. L'atrophie s'accroît : la peau, qui a perdu son élasticité et qui garde le pli à la palpation, devient trop lâche pour les régions qu'elle recouvre et le patient paraît flotter. A ce stade avancé de l'ACA, la palpation permet parfois de mettre en évidence des nodules fibrotiques qui sont des nodules érythémateux ou bleutés, indolores, de quelques millimètres de diamètre et qui siègent au voisinage des articulations, surtout le coude et les genoux (Messer et coll., 2014). Ces nodules sont localisés dans les couches profondes du derme, pouvant atteindre la graisse sous-cutanée. Les bandes fibreuses péri-articulaires sont un autre symptôme évocateur de ce stade. Il s'agit de bandes siégeant sur les surfaces osseuses du membre atteint. Des macules dermiques peuvent se voir en bordure des plaques étendues d'ACA (Grosshans, 2002). Ces lésions peuvent aussi devenir prurigineuses et douloureuses, plus ou moins associées à des hyperesthésies ou paresthésies. Le traitement ne modifie plus l'aspect clinique mais il stabilisera les lésions atrophiques et fera disparaître l'inflammation, sachant que la cicatrisation est souvent altérée.

L'histologie de l'ACA (Figure 6) n'est pas spécifique mais évocatrice et est fréquemment réalisée en pratique courante afin de confirmer la suspicion diagnostique. Lorsque l'ACA est biopsiée à un stade précoce, on visualise un **infiltrat inflammatoire dermique superficiel et profond**, d'intensité modérée, composé principalement de lymphocytes mais aussi d'histiocytes et de plasmocytes, se renforçant autour de vaisseaux dilatés ainsi que des annexes. Cet infiltrat forme parfois un aspect de bande sous-épidermique alors séparée de l'assise basale par une zone de collagène (green-zone). A cet infiltrat s'associe de manière variable un œdème et/ou une fibrose (Smetanick et coll., 2010; Schacht & Kapp, 2011). A ce stade, l'épiderme peut encore être intact ou présenter un léger amincissement.

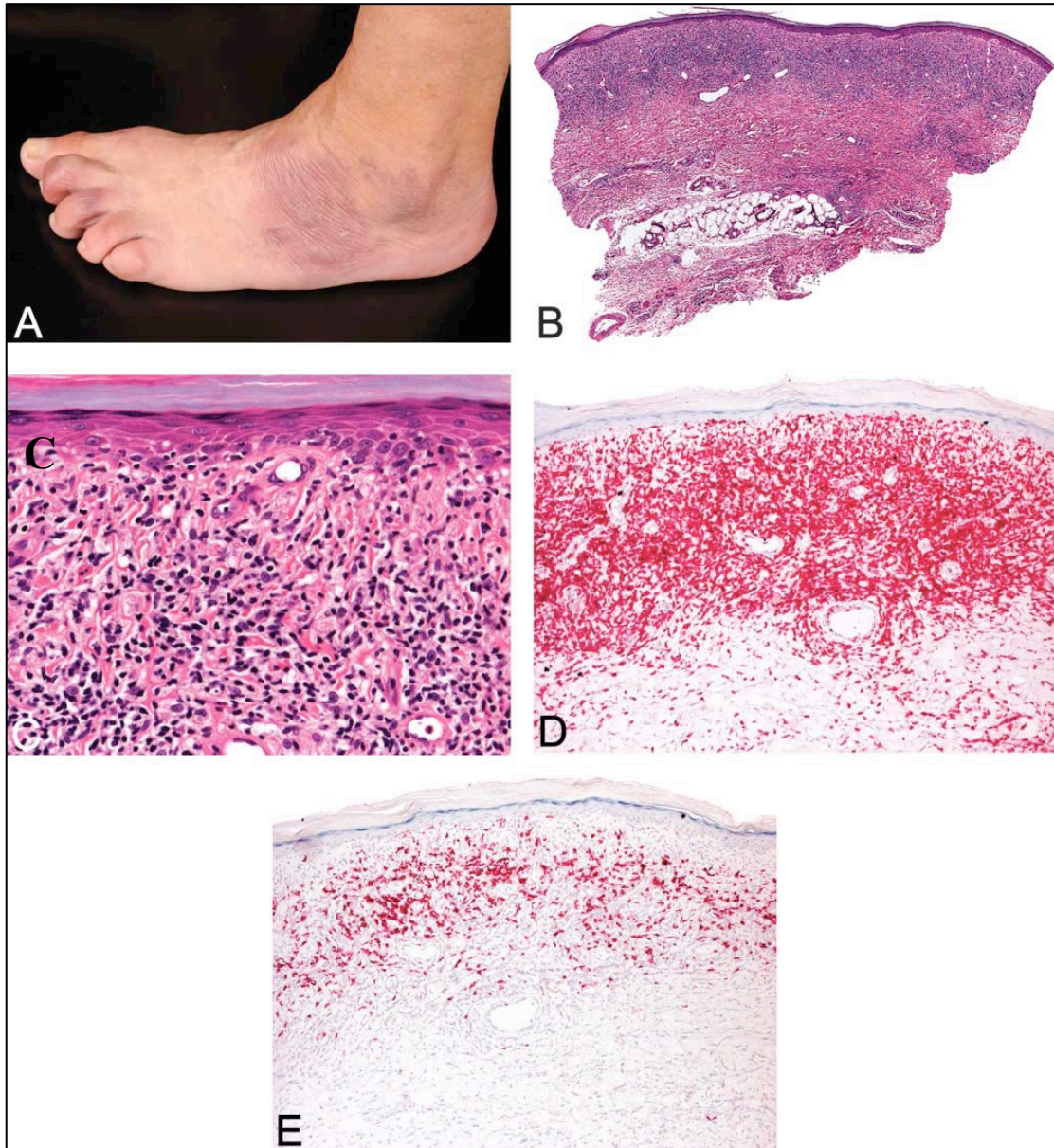


Figure 6 Acrodermatite chronique atrophiante au niveau du pied gauche (A). Infiltrat lymphoplasmocytaire sous épidermique (B et C). Détection de CD3 (D) et de CD20 (E) confirmant la prédominance des LT CD3+ au sein des infiltrats. D'après (Tee et al. 2013).

D. Le vecteur : La tique du genre *Ixodes*

1. Taxonomie

Les tiques sont des arthropodes appartenant à la Classe des *Arachnida*, Sous-classe des *Acari*, Superordre des *Parasitiformes*, Ordre des *Ixodida* et Famille des *Ixodidae*. Leur nom provient du grec *ixodès* signifiant « gluant ». La glue était à l'époque obtenu à partir des baies de gui (*Viscum album*), et certaines tiques blanches gonflées ressemblent à une baie de gui, « engluée » à la peau. L'Ordre des *Ixodida* regroupent 896 espèces réparties en trois Familles : *Ixodidae* (tiques dures), *Argasidae* (tiques molles) et *Nuttalliellidae*⁴ (Guglielmone 2010). Le terme de tique dure provient des zones du tégument chitinisées dures, présentes chez les *Ixodidae* et absentes chez les *Argasidae*.

Parmi ces tiques, *Ixodes ricinus*⁵ est le principal vecteur de la borréliose de Lyme en Europe (Figure 7). Cette espèce appartient à un complexe dont *I. persulcatus*, *I. pacificus* et *I. scapularis* font également partie et lui sont phylogénétiquement proches (Xu et al. 2003).



Figure 7 Nymphes d'*Ixodes ricinus* gorgées et non gorgées. Photographie N. Boulanger

⁴ Une seule espèce compose ce genre : *Nuttalliella namaqua*

⁵ Le terme « ricinus » provient de la graine de ricin, dont elle possède l'aspect

2. Anatomie

L'anatomie des *Ixodidae* (Figure 8) est caractéristique des acariens, à savoir un corps segmenté en deux parties : l'idiosome (corps) et le capitulum (tête). Le capitulum comporte trois pièces piqueuses : l'hypostome⁶ en position ventrale et deux chélicères⁷ en position dorsale. L'ensemble de ces pièces piqueuses porte le nom de rostre vulnérant. Il comporte également 2 pièces sensorielles en position latérale, les pédipalpes.

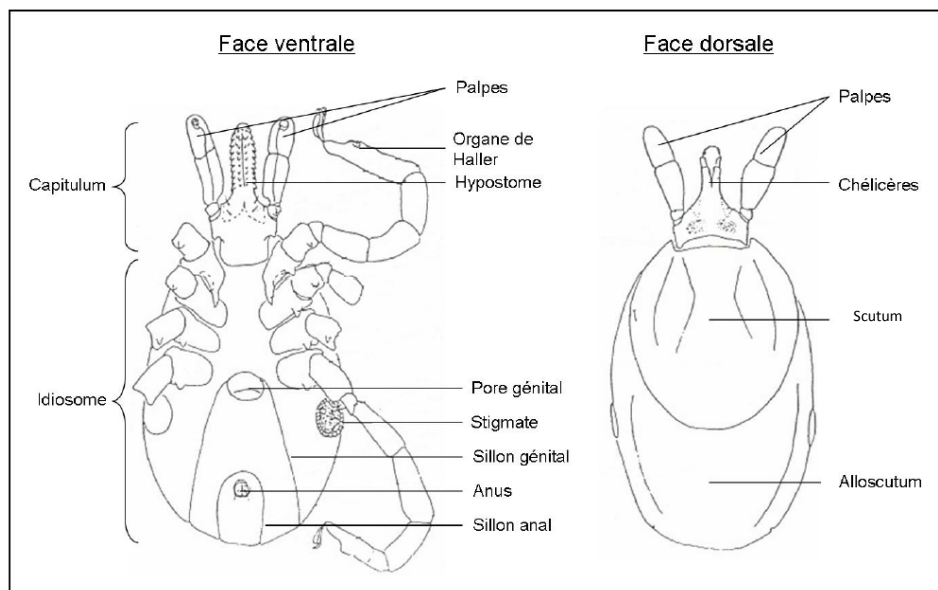


Figure 8 Morphologie de la tique *Ixodes ricinus* d'après Morel, cité dans (Boyard et al. 2007)

L'organe de Haller, entre autres organes sensoriels, permet à la tique de percevoir son environnement⁸ et participe à la recherche de l'hôte, en détectant le CO₂ émis par ceux-ci, des molécules odorantes (phénols et lactones) et sont également sensibles à la dessiccation (Leonovich 2004).

⁶ L'hypostome, garni de plusieurs dents, permet l'ancrage de la tique dans la peau de l'hôte

⁷ Les chélicères dilacèrent le tissu de l'hôte

⁸ Les tiques du genre *Ixodes* ne possèdent pas d'yeux

3. Cycle de vie de *I. ricinus*

Les tiques du genre *Ixodes* sont des ectoparasites hématophages stricts et possèdent trois stases⁹ de développement : la larve, la nymphe et l'adulte. Le caractère parasitaire n'est que temporaire et correspond à la prise d'un unique repas sanguin sur un hôte vertébré. Entre chaque stase de développement, la tique reste à terre. La durée du cycle de vie de ces tiques dures étant de 2 à 3 ans en moyenne, elles passent donc plus de temps à terre que sur leurs hôtes.

La larve se nourrit classiquement sur de petits mammifères tels que les rongeurs, sur des oiseaux ou des reptiles (Figure 9). Après son repas sanguin, qui dure entre 2 et 3 jours, celle-ci va muer en nymphe qui se nourrit sur des hôtes similaires, pendant environ 5 jours. Enfin, la nymphe va muer en adulte (mâle ou femelle) et seule la femelle effectuera un dernier repas sanguin (7-10 jours) sur de gros mammifères, avant de pondre 2000 à 3000 œufs puis de mourir (Mannelli et al. 2012).

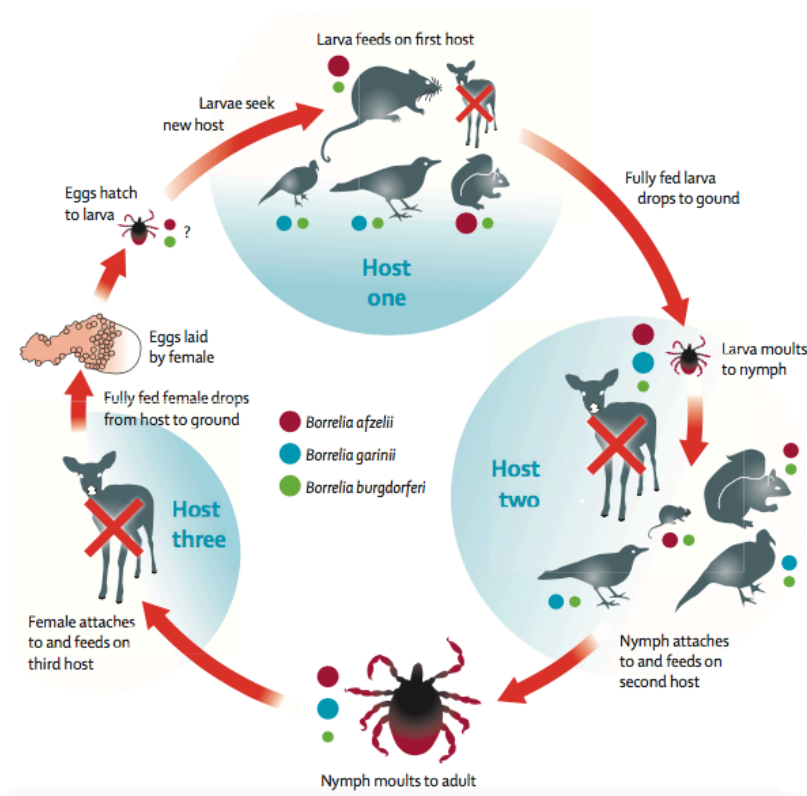


Figure 9 Cycle de vie et hôte de la tique du genre *Ixodes* d'après (Stanek et al. 2012)

⁹ Alors que le « stade » est la forme prise par un acarien après une simple mue de croissance (nymphe des tiques molles), la « stase » est la forme prise après une métamorphose qui entraîne en plus des modifications de croissance un changement d'aspect.

4. Répartition géographique

Les tiques sont très sensibles à la dessiccation, on les retrouve donc essentiellement dans les zones forestières humides et tempérées (80% d'hygrométrie annuelle moyenne). Néanmoins, elles peuvent être retrouvées dans des zones urbaines ou semi-urbaines (Dister et al. 1997; Junntila et al. 1999; Rizzoli et al. 2014). Elles sont exclues des biotopes trop secs et les zones d'altitude¹⁰. Les principales espèces¹¹ responsables de la transmission de *Borrelia* sont *I. ricinus*, présente des pays scandinaves à l'Afrique du Nord, et de l'Espagne à la Russie (Gern 2009), *I. persulcatus* en Asie et en Europe de l'Est, *I. scapularis* sur la côte Est et au centre Est des Etats-Unis, et *I. pacificus* sur la côte Ouest des Etats-Unis (Figure 10).

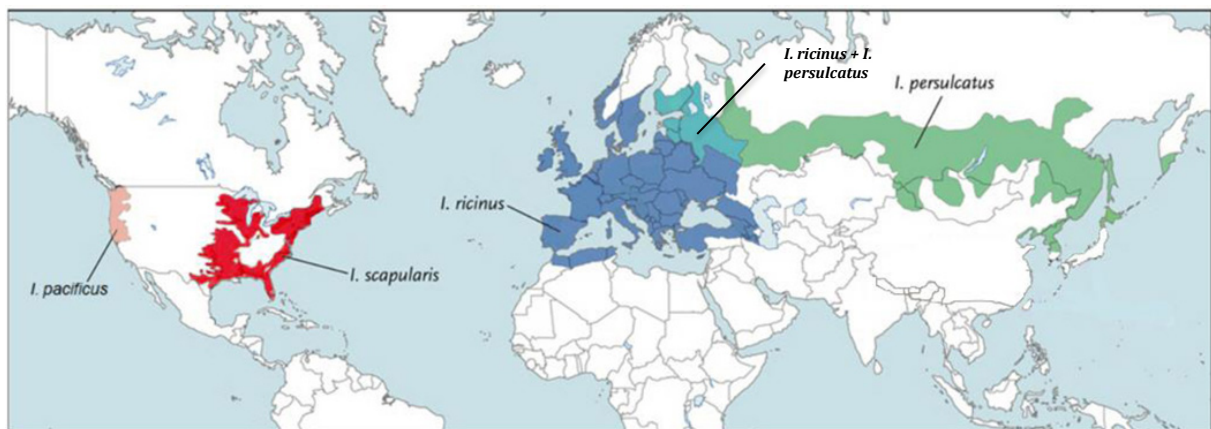


Figure 10 Répartition géographique des espèces de tiques du genre *Ixodes* impliquées dans la transmission de *Borrelia* sp. (Diuk-Wasser et al. 2016)

¹⁰ La limite d'altitude est autour de 1000 à 1500 mètres

¹¹ D'autres espèces de tiques comme *I. hexagonus* (hérisson) et *I. uriae* (oiseaux marins) participent au maintien de *Borrelia* dans la nature, mais leur implication en pathologie humaine n'a pas été démontrée

5. Transmission de *Borrelia burgdorferi* par la tique à l'Homme

L'Homme n'est qu'un hôte accidentel du cycle de vie de la tique. Lorsque celle-ci pique ce dernier, elle commence par dilacerer la peau à l'aide de ses chélicères. Elles s'enfoncent alors dans la peau, et l'hypostome, à l'aide de ses dents rétrogrades, assure l'ancrage dans les tissus (Kazimírová and Stibrániová 2013). Cette pénétration s'accompagne de la sécrétion de ciment, qui conforte la fixation. Elle crée par la suite une poche de lyse, lui permettant d'ingurgiter le sang libéré.

Toutes les stases de développement de la tique ne sont pas impliquées dans la transmission de la bactérie. En effet, en l'absence de transmission transovarienne¹² (Rollend et al. 2013), ce sont uniquement la nymphe et l'adulte qui peuvent transmettre le pathogène. La nymphe est majoritairement impliquée dans cette transmission chez l'homme en raison de sa petite taille et de la durée relativement peu élevée de son repas (3 à 5 jours), sa piqûre passant donc plus souvent inaperçue (Matuschka et al. 1992).

La bactérie est initialement présente au niveau du tube digestif de la tique. Lors du repas sanguin de celle-ci, le pathogène va se multiplier intensément *in situ* (De Silva and Fikrig 1995) et changer l'expression de certains de ses gènes, comme *OspC*, au détriment d'*OspA*¹³ (Grimm et al. 2004), en raison d'un changement de l'environnement physiologique du contenu intestinal¹⁴ (Yang et al. 2000). Ce changement permet la migration de la bactérie vers l'hémolymphe, puis vers les glandes salivaires, et elle sera ensuite co-inoculée avec la salive (Dunham-Ems et al. 2009). Ce délai de migration, de 36 à 72 heures, correspond aux délais de transmission observés chez l'animal (Piesman et al. 1987; Crippa et al. 2002; Hojgaard et al. 2008; Heylen et al. 2013). Le risque de transmission est d'autant plus élevé que la durée d'attachement est longue, avec une efficacité maximale de transmission (2,4% chez l'homme) observée vers 72 heures aux Etats-Unis (Hojgaard et al. 2008). En Europe, la transmission de la bactérie pourrait être plus rapide, dès 24h (Crippa et al. 2002) La dose infectante minimale n'est pas définie avec certitude, mais est en tout cas faible, de l'ordre d'une centaine de bactéries, voire moins (Ohnishi et al. 2001; Lima et al. 2005; Kern et al. 2015).

¹² Les publications montrant une transmission transovarienne de *B. burgdorferi* ont majoritairement été réalisées à l'aide d'anticorps polyclonaux qui croisent de fait avec *B. miyamotoi*, dont la transmission transovarienne est bien établie.

¹³ La lipoprotéine *OspA* permet à la bactérie de se fixer à la paroi intestinale via TROSPA, son récepteur (Pal et al. 2004)

¹⁴ Acidification et augmentation de la température.

Un des points clefs de la transmission de *Borrelia* réside dans sa co-inoculation avec la salive de la tique. Cette salive possède en effet de nombreux facteurs ayant des activités anti-hémostatiques, antalgiques/anti-inflammatoires et immuno-modulatrices de l'immunité innée et adaptative (Kazimírová and Stibrániová 2013; Simo et al. 2017).

6. La salive des *Ixodes*

La salive de tique possède de nombreuses fonctions essentielles pendant les phases libres et parasitaires de l'arthropode. Lors de la phase libre, les glandes salivaires sont impliquées dans le captage de l'eau environnementale et la sécrétion de fluides hygroscopiques à partir des *acini* agranulaires¹⁵. Lors de la phase parasitaire, la salive de la tique intervient tout au long du repas sanguin, facilitant celui-ci, et facilitant également la transmission de pathogènes. Ce repas sanguin est particulièrement long pour les tiques dures du genre *Ixodes* notamment, entre 3 et 10 jours. Dès la piqûre de la tique sur l'hôte vertébré, la salive participe à la constitution d'un ciment autour des pièces piqueuses, favorisant l'ancrage de celle-ci. Par la suite, la salive permet l'élimination de l'excès d'eau ingéré lors du repas ainsi qu'un rôle de maintien de la pression osmotique (*Ixodes*). En dehors de ce rôle physiologique, la salive de la tique possède également un armement pharmacologique complexe, bloquant le processus de démangeaison et la douleur liées à l'effraction cutanée, inhibant l'hémostase, et modulant les réponses immunitaires innées et adaptatives, l'angiogenèse et la réparation tissulaire de l'hôte (Simo et al. 2017). Enfin, la salive de tique entraîne une réponse immunitaire de la part de l'hôte. Si la piqûre sur un hôte naïf présente peu ou pas d'infiltrat cellulaire, la répétition de ces piqûres induit une réaction inflammatoire associée à des mastocytes et à des éosinophiles (Krause et al. 2009)(Goodman et al. 2005). De plus, une réponse en anticorps dirigés contre la salive est développée par l'hôte, pouvant conduire à un processus de résistance, et chez la tique à une diminution de la durée du repas sanguin. Les conséquences directes de cette réponse sont chez la tique femelle une mortalité accrue et une diminution de la production d'œufs, et chez l'hôte vertébré une diminution du risque de transmission bactérienne (Burke et al. 2005).

¹⁵ Les glandes salivaires de la tique sont au nombre de deux et constituées de grains, les *acini*, regroupées en grappes et reliés entre eux par des canaux. Il existe 4 types d'*acini*, chacun ayant une fonction propre.

Les connaissances actuelles sur la composition de la salive de tique reposent essentiellement sur des analyses protéomiques et transcriptomiques de celle-ci. Les sialomes (ensemble des molécules contenues dans la salive) et transcriptomes de diverses espèces de tiques dures ou molles, à différents stades de vies et de sexe ont ainsi été établis. Ainsi, chez les *Ixodes*, les sialomes et transcriptomes d'*I. scapularis*, *I. pacificus* et *I. ricinus* ont été décrits (Chmelar et al. 2012; Francischetti et al. 2005; Liu and Bonnet 2014; McNally et al. 2012; Schwarz et al. 2012; Valenzuela et al. 2002; Vennestrøm and Jensen 2007). Ces analyses ont montré que les tiques dures possèdent plus de 25 familles de protéines dans leur sialome, et que les grandes familles de protéines sont conservées chez les tiques dures et molles. Cependant, il faut souligner que, pour toutes les espèces de tiques avec un transcriptome connu, moins de 5% des protéines ont été exprimées et leur fonction vérifiée, et que des familles entières de protéines n'ont pas une identification sur le plan fonctionnel (Francischetti et al. 2009).

Activités anticoagulantes

La salive des *Ixodes* agit sur les trois acteurs majeurs de la coagulation, la vasoconstriction, l'agrégation plaquettaire et la coagulation proprement dite. Ainsi, *I. scapularis* sécrète des vasodilatateurs comme la prostacycline, la prostaglandine E2 ou le tHRF¹⁶ (Dai et al. 2010; Ribeiro and Mather 1998; Sa-Nunes et al. 2007). L'agrégation plaquettaire est quant à elle inhibée par des molécules comme l'Ixodegrine, agissant comme antagoniste du complexe GPIIb/IIIa¹⁷ (*I. scapularis*/*I. pacificus*) ou IRS-2¹⁸ (*I. ricinus*), inhibant l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et la cathepsine G (Chmelar et al. 2011; Francischetti et al. 2005). Plusieurs molécules sont responsables d'une action anticoagulante, par inhibition à différents niveaux des voies intrinsèques ou extrinsèques de la coagulation, comme l'Ixolaris, la Pentalaris, Salp14¹⁹, TIX-5²⁰, IxscS-1E1²¹ (*I. scapularis*) ou Ir-CPI²² et IRS-2 (*I. ricinus*) (Šimo et al. 2017).

¹⁶ tick histamine release factor

¹⁷ La glycoprotéine GPIIb/IIIa se lie au fibrinogène et au facteur Willebrand pour permettre l'agrégation plaquettaire

¹⁸ *Ixodes ricinus* serpin-2

¹⁹ Salivary protein 14

²⁰ Tick inhibitor of factor Xa towards factor V

²¹ *Ixodes scapularis* saliva serine protease inhibitor (serpin)

²² *Ixodes ricinus*-contact-phase-inhibitor

Activités anti-inflammatoires

La salive d'*Ixodes* contient des molécules anti-inflammatoires, inhibant ainsi la douleur et les démangeaisons ressenties par l'hôte, et liées à la production locale d'histamine, de sérotonine ou de bradykinine. Cette activité évite ainsi les réactions de grattage qui pourraient perturber la prise du repas sanguin. Parmi celles-ci, nous pouvons citer la famille des lipocalines, dont plusieurs membres ont été décrits chez *I. persulcatus* et *I. ricinus*, et qui séquestrent et inhibent l'action de l'histamine et de la sérotonine (Beaufays et al. 2008; Konnai et al. 2011). Chez *I. scapularis*, une métalloprotéase à activité kininasique induit l'hydrolyse de la bradykinine (Ribeiro and Mather 1998).

Activités immuno-modulatrices

La voie alterne du complément est la principale ligne de défense innée contre les pathogènes. La corrélation entre la spécificité d'hôte de certaines espèces du genre *Ixodes*, et l'aptitude de la salive à inhiber spécifiquement la cascade du complément de leurs hôtes préférentiels, témoigne de l'importance que revêt l'inhibition du complément pour la réussite du repas sanguin (Lawrie et al. 1999). Les protéines Isac²³, Salp20 et Isac-1 d'*I. scapularis*, ainsi que les protéines IRAC-1 et 2²⁴ ou celles de la famille IxAC²⁵ d'*I. ricinus*, inhibent la formation de la C3-convertase par inhibition du recrutement du facteur B par le composant C3b (Couvreur et al. 2008; Šimo et al. 2017).

En dehors de son activité inhibitrice du complément, la salive des *Ixodes* agit également sur l'immunité innée cutanée en inhibant la sécrétion de peptides antimicrobiens, défensines et cathélicidine, diminuant ainsi la réponse locale au point de piqûre (Kern et al. 2011; Marchal et al. 2009). Le chimiotactisme des cellules immunitaires innées est aussi diminué par la salive de la tique. L'activité de l'IL-8, par exemple, est fortement inhibée par la salive de diverses espèces d'*Ixodes* (Hajnická et al. 2001). Parmi les molécules impliquées, nous pouvons citer Salp16 Iper1²⁶ d'*I. scapularis*

²³ *Ixodes scapularis* salivary anticomplement protein

²⁴ *Ixodes ricinus* salivary anticomplement protein

²⁵ *Ixodes* anti-complement

²⁶ Salivary protein 16 *Ixodes scapularis* 1

ou Ir-LBP²⁷ d'*I. ricinus*. Enfin, d'autres molécules citées plus tôt (IRIS, IRS-2, prostaglandine E2) possèdent également une activité immunosuppressive en inhibant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et en modulant l'activité de cellules immunitaires spécialisées, tels que les macrophages, les lymphocytes T ou les cellules dendritiques (Chmelar et al. 2011; Leboulle et al. 2002; Sa-Nunes et al. 2007).

La salive d'*Ixodes* agit sur l'immunité adaptative de l'hôte vertébré. La protéine Salp15 d'*I. scapularis* inhibe la prolifération lymphocytaire par liaison au récepteur CD4 des lymphocytes T helper, inhibant la production d'IL-2 (Anguita et al. 2002). La protéine IRIS d'*I. ricinus* possède des effets similaires sur les lymphocytes T CD4+. La piqûre d'*Ixodes* conduit par ailleurs à une polarisation de type T_H2 des lymphocytes T CD4+, favorisant l'infection à *Borrelia* (Zeidner et al. 1997). La sialostatine L²⁸, produite par *I. scapularis*, inhibe également la prolifération des lymphocytes T CD8+ (Schwarz et al. 2012). Enfin, la protéine BIP²⁹ sécrétée par *I. ricinus* inhibe la prolifération des lymphocytes B murins, en agissant probablement sur la voie de signalisation des TLRs (Hannier et al. 2004).

Implication de la salive d'*Ixodes* dans la transmission de *Borrelia*

Plusieurs molécules de la salive de la tique *Ixodes* sont directement impliquées dans la transmission de *Borrelia*. Ainsi, Salp15, en dehors des rôles précédemment décrits, se lie à la lipoprotéine OspC de *Borrelia*. Cette liaison protège la bactérie de l'action du complément et de la lyse médiée par les anticorps (Schuijt et al. 2008). Cette protection de la bactérie par Salp15 est critique dans la transmission du pathogène, son inhibition par RNAi-silencing diminuant drastiquement la capacité de transmission de *Borrelia* chez la souris par la tique (Ramamoorthi et al. 2005). Les protéines de la salive de tique impliquées dans l'inhibition du complément ont elles aussi montré leur importance lors de la transmission de *Borrelia*. La protéine TSLPI³⁰, diminue l'effet lytique du complément de l'hôte sur *Borrelia* (de Taeye et al. 2013). Salp20 protège partiellement *Borrelia* de la lyse par le sérum humain (Tyson et al. 2007). L'immunisation de souris par tHRF ou le « silencing » par utilisation d'ARN interférents

²⁷ *Ixodes ricinus* leukotrien binding protein

²⁸ La sialostatine L est une cystatine (inhibiteur des cystine-protéases) qui possède une forte affinité pour la cathepsine L, d'où son nom

²⁹ B-cell inhibitory protein

³⁰ tick salivary lectin pathway inhibitor

de cette molécule diminue la durée du repas sanguin de la tique ainsi que le taux de *Borrelia* chez l'hôte (Dai et al. 2010). Enfin, toutes les protéines de la salive de la tique ayant des effets immunomodulateurs, même si leurs rôles n'ont pas été encore complètement décrits dans l'infection à *Borrelia*, sont susceptibles de favoriser l'infection en évitant la destruction de la bactérie par le système immunitaire de l'hôte.

E. Le pathogène : *Borrelia* sp

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*. Le genre *Borrelia* a été créé en 2014 sur des bases moléculaire et évite la confusion entre les espèces de *Borrelia* responsable de la borréliose de Lyme (ancien complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato), des espèces responsables des fièvres récurrentes (Adeolu and Gupta 2014). A ce jour, le genre *Borrelia* comporte 21 espèces (Figure 11), dont huit impliquées en pathologie humaine et isolées en culture à partir de prélèvements humains, cinq dont l'ADN seul a été détecté chez l'humain et huit détectées exclusivement chez les tiques. En Europe, toutes les espèces pathogènes sont présentes, mais trois d'entre elles sont les plus fréquentes : *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi*, avec une plus grande prévalence de *B. garinii* et *B. afzelii*. À l'inverse, en Amérique du Nord, *B. burgdorferi* est la seule espèce pathogène certaine pour l'homme présente avec *B. mayonii* (Pritt et al. 2016).

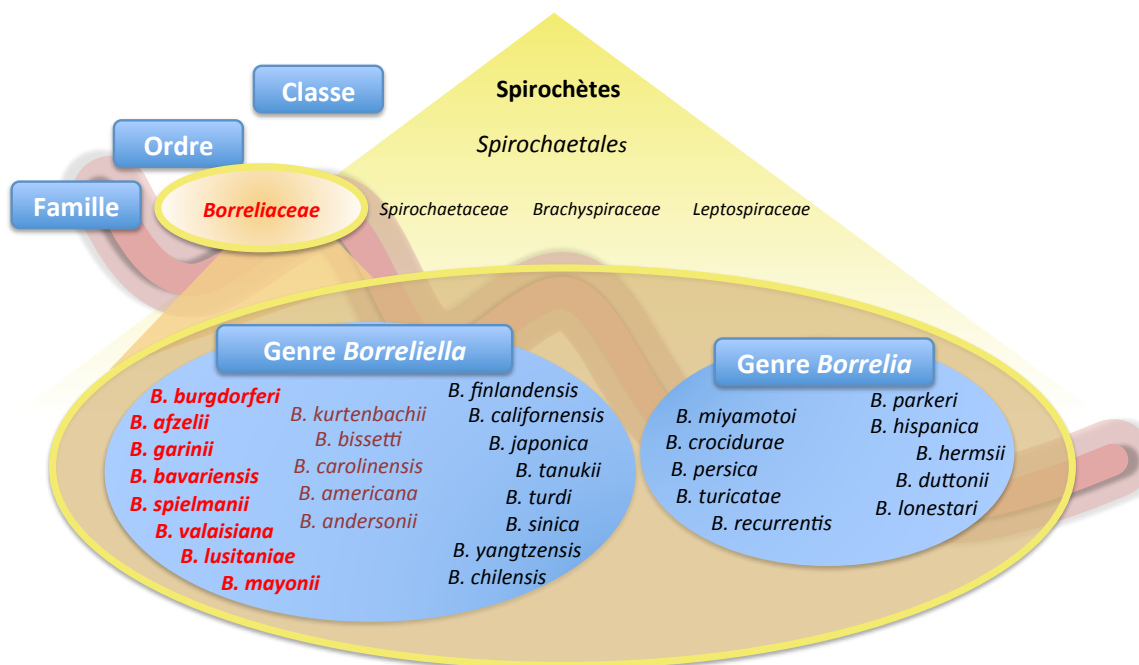


Figure 11 Position taxonomique des diverses espèces de la Famille des *Borreliaceae*. Dans le genre *Borrelia*, les espèces en rouge sont celles dont la culture a été possible à partir de prélèvements humains, en violet celles dont l'ADN a été retrouvé à partir de prélèvements humains, et en noir celles retrouvées uniquement chez les tiques.

1. Morphologie

La structure de ces spirochètes en fait des bactéries facilement reconnaissables en microscopie à fond noir ou à contraste de phase, de part leur forme hélicoïdale et leur mobilité particulière. Ces bactéries ont une longueur de 4 à 30 μm , pour une largeur de 0,2 à 0,5 μm (Figure 12). Elles possèdent un cylindre protoplasmique, incluant une membrane plasmique et une couche de peptidoglycane, ainsi qu'une membrane externe. La paroi de *Borrelia* est similaire aux bactéries à Gram négatif, bien que dépourvue de lipopolysaccharide (LPS). La région située entre la membrane externe et la couche de peptidoglycane forme le périplasme. Les flagelles périplasmiques sont attachés aux extrémités du cylindre protoplasmique et sont enroulés autour de lui, conférant à la bactérie sa forme particulière et sa mobilité (Charon et al. 2009).

La mobilité de la bactérie est complexe, incluant des mouvements de rotation, de torsion et de compression. Ces mouvements particuliers seraient dûs à une rotation asymétrique des flagelles périplasmiques, certains tournant dans le sens horaire et les autres dans le sens anti-horaire (Li et al. 2002). Ces mouvements lui donnent la capacité de se mouvoir dans des milieux visqueux où d'autres bactéries en seraient incapables (Kimsey and Spielman 1990).

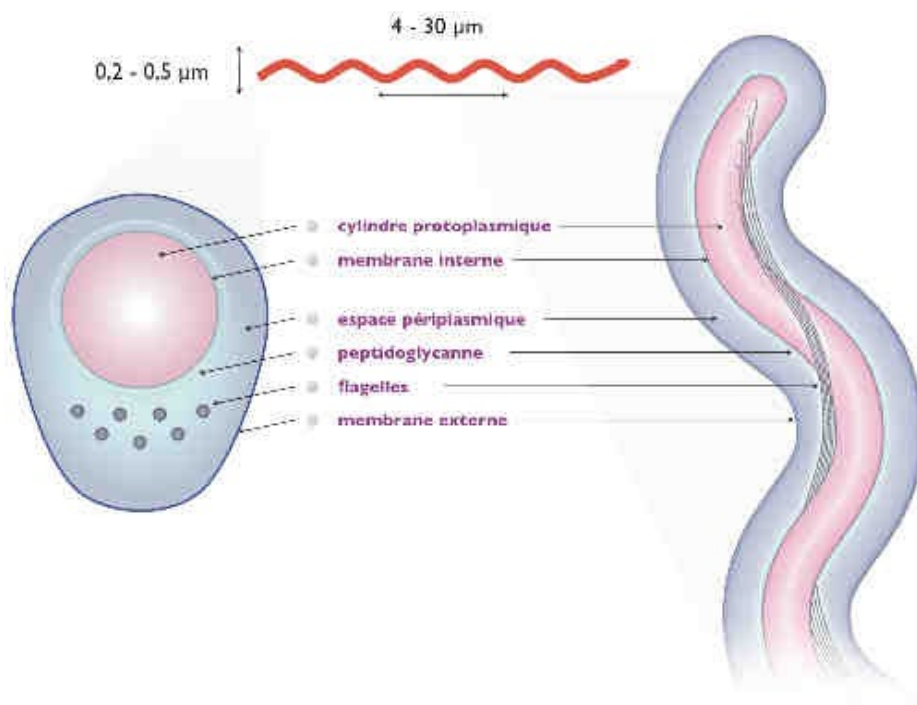


Figure 12 Morphologie des *Borrelia* d'après (Guerau-De-Arellano and Huber 2005; Rosa et al. 2005)

2. Structure génétique

Le génome de *Borrelia* est un des plus complexes du monde bactérien (Fraser et al. 1997; Qiu and Martin 2014). Plus de 20 éléments génétiques différents ont été mis en évidence dans la souche type B31 (*B. burgdorferi*). Ceci inclut un chromosome linéaire d'environ 900 Kb associé à de multiples³¹ plasmides circulaires et linéaires d'une taille cumulée d'environ 600 Kb (Radolf et al. 2012a) (Figure 13). Le chromosome contient la majorité des gènes de ménage et est relativement stable dans son organisation et son contenu pour l'ensemble des espèces du genre. Les plasmides, codant essentiellement des gènes de virulence, et en particulier des lipoprotéines de surface, montrent une variabilité bien plus importante, et ne sont pas représentés de manière égale selon les espèces (Radolf et al. 2012a).

Cette complexité génétique serait liée à l'obligation pour la bactérie de s'adapter à des environnements différents entre les hôtes vertébrés et les tiques (Hovius et al. 2007). De plus, les capacités métaboliques de *Borrelia* sont extrêmement limitées. Le genre est auxotrophe³² pour l'ensemble des acides aminés, nucléotides et acides gras. Il manque également les gènes codant les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques et de la phosphorylation oxydative, apportant de l'énergie à la place de la fermentation lactique (Radolf et al. 2012a).

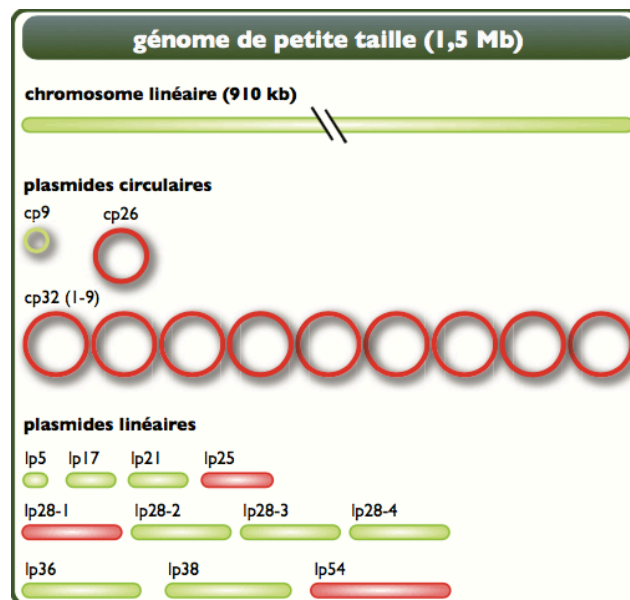


Figure 13 Structure génétique de *Borrelia burgdorferi*. (Schramm et al. 2013)

³¹ Vingt et un plasmides pour la souche type B31, 9 circulaires et douze linéaires, d'une taille de 5 à 56 Kb.

³² L'auxotrophie correspond à l'incapacité d'un organisme à synthétiser des molécules essentielles à son développement.

3. Interactions entre *Borrelia* et *Ixodes* lors de son acquisition par la tique

Dans le cycle naturel, *Borrelia* est acquise par les larves ou les nymphes après repas sanguin sur un hôte infecté. Lors de cette acquisition, les bactéries semblent se mouvoir dans la peau de l'hôte de manière aléatoire, indépendamment de la piqûre de la tique (Moriarty et al. 2008). Cette acquisition par la larve est rapide, dès 8 heures, mais le taux d'infection est d'autant plus élevé que le repas sanguin est long (Piesman 1991). La majorité des larves se nourrissant sur un hôte compétent infecté acquiert le pathogène en 48 heures (De Silva et al. 1997). De plus, l'infection des tiques est d'autant plus importante que le taux d'infestation en larve sur l'hôte vertébré est important, suggérant un potentiel chimiotactisme de la salive de la tique sur *Borrelia*³³ (Levin et al. 1997). En dehors de tout chimiotactisme, la salive de la tique possède un rôle essentiel dans la transmission de la bactérie de l'hôte vers la tique via la protéine Salp25D, qui, de part son activité antioxydante, facilite ce passage (Anderson and Valenzuela 2007; Narasimhan et al. 2007b).

Chez la bactérie, la synthèse de la lipoprotéine OspA semble essentielle à la transmission, l'administration d'anticorps anti-OspA à des souris infectées diminuant de manière drastique le taux d'infection des larves (De Silva et al. 1997). L'expression de OspA par la bactérie dans la peau serait déclenchée par la piqûre de la tique, qui en augmentant les taux locaux d'adrénaline et de noradrénaline, permettrait cette synthèse (Scheckelhoff et al. 2007). Enfin, OspA permet à la bactérie de s'arrimer au tube digestif de la tique via son récepteur TROSPA, évitant son expulsion lors de la digestion (Pal et al. 2004).

L'activation de la voie Hk1-Rp1³⁴ par la bactérie est également essentielle à la transmission et à la survie de la bactérie chez le vecteur. Cette voie, en augmentant la production intracellulaire de c-di-GMP³⁵, permet l'inhibition du système RpoS-RpoN, ce qui déclenche un changement dans l'expression des gènes de la bactérie, lui permettant de s'adapter à la tique (Caimano et al. 2011; He et al. 2011; Kostick et al. 2011). Cette adaptation remodelerait la surface de *Borrelia*, la protégeant des substances antimicrobiennes du tube digestif de la tique (Battisti et al. 2008).

³³ Ce chimiotactisme n'a à l'heure actuelle pas été mis en évidence

³⁴ Histidine-kinase 1-response regulatory protein 1

³⁵ Cyclic-di-Guanosine-mono-phosphate

La protéine de *Borrelia* BBD18 posséderait également un rôle important dans la transmission, en agissant comme régulateur. Son expression conduit à une inhibition d'expression d'OspC³⁶ (Hayes et al. 2014).

L'ingestion de sang par la larve entraîne une intense multiplication de la bactérie dans l'intestin de la tique, qui dure plusieurs semaines jusqu'à la mue (Radolf et al. 2012a). Après le détachement de la tique, la bactérie doit alors trouver des sources alternatives de carbone, le taux de glucose digestif de la tique diminuant peu à peu. *Borrelia* se tourne vers l'utilisation du glycérol, en surexprimant l'opéron *glp*³⁷ (Pappas et al. 2011). Cette surexpression serait également liée à l'activation de la voie Hk1-Rp1 (He et al. 2011). La tique entoure son repas sanguin d'une gaine de glycoprotéine et de chitine, appelée membrane péritrophique (Sonenshine 1993). Le N-acetyl-glucosamine et le chitibiose serait alors des sources alternatives de carbone pour la synthèse du peptidoglycane de *Borrelia* (Tilly et al. 2001).

³⁶ Si OspA est une lipoprotéine essentielle dans la transmission et le maintien de *Borrelia* chez la tique, OspC est essentielle dans la transmission du vecteur vers l'hôte vertébré.

³⁷ Glycerol-3-Phosphate

F. Diagnostic biologique de la Borréliose de Lyme

A l'exception de l'EM, toutes les manifestations de la maladie requièrent une confirmation biologique.

Les signes biologiques de la Borréliose de Lyme (en dehors des tests spécifiques) sont relativement pauvres. Le taux de leucocytes est généralement identique à celui retrouvé chez les individus sains. A la phase précoce de la maladie, une légère augmentation des transaminases peut être observée chez environ 20% des patients en Europe, et, dans les cas de neuroborrélioses, le LCR montre généralement une pléiocytose à majorité de lymphocytes, une glycorachie normale et une protéinorachie à la limite supérieure de la normale. Dans les cas d'arthrites, le liquide articulaire montre un infiltrat à majorité de polynucléaires neutrophiles, avec une numération de l'ordre de 25 000³⁸ Leucocytes/mm³ (Stanek et al. 2012).

1. Culture de la bactérie

La culture représente le « gold standard » dans le diagnostic de la maladie. Néanmoins, celle-ci est coûteuse, longue (2 à 6 semaines), et nécessite des milieux de culture particuliers³⁹, liés à l'auxotrophie du spirochète⁴⁰. De plus, la sensibilité de la culture reste très faible, de l'ordre de 40-70% à partir de biopsies d'EM, 3-17% à partir de LCR, et devient anecdotique dans les liquides articulaires ou biopsies synoviales (Borchers et al. 2015). Le résultat négatif en culture d'un échantillon biologique ne signe donc pas l'absence de la bactérie et n'exclut pas le diagnostic.

2. Biologie moléculaire

La PCR peut être réalisée à partir de nombreux échantillons biologiques, comme la peau, les prélèvements articulaires, oculaires, cardiaques, le LCR, etc...

Néanmoins, s'il existe de nombreuses techniques (cibles, préparation de l'échantillon), aucune n'est standardisée et les sensibilités observées sont divergentes

³⁸ De 500 à 110 000 leucocytes/mm³

³⁹ généralement milieu BSK-II (Barbour-Stoener-Kelly modifié)

⁴⁰ Les milieux sont généralement constitués d'une base de milieu de culture cellulaire, associée à de la sérum albumine bovine, de la N-acétyl-glucosamine, du sérum de lapin en quantité variable, citrate, pyruvate, et d'autres ingrédients en quantité variable selon les milieux considérés

selon les études. Dans les biopsies d'EM, la sensibilité est de l'ordre de 75-80%, de 15-30% dans le LCR, et de 60 à 85% dans les prélèvements articulaires (Borchers et al. 2015). Là encore, un résultat négatif ne doit pas exclure le diagnostic, notamment dans les cas de neuroborrélioses. Dans ces manifestations, la sensibilité de la PCR est inférieure à 1%.

3. Sérologie

La sérologie est de loin l'examen le plus pratiqué dans le diagnostic de la borréliose de Lyme, le plus utile actuellement ; le plus décrié aussi, mais également le moins bien utilisé et interprété.

Classiquement, la sérologie se déroule en deux étapes :

- La première consiste en un test ELISA⁴¹, qui, s'il est positif, est confirmé ou non par western-blot
- Le western-blot, réputé moins sensible que les tests ELISA, mais plus spécifique, permet de différencier les faux positifs des vrais positifs

Différents tests ELISA, utilisant soit des broyats de bactéries entières ou des antigènes purifiés existent sur le marché. De même, il existe différents kits de western-blot, dont la sensibilité et la spécificité varient selon les fabricants (CNR *Borrelia* 2017).

Néanmoins, une méta-analyse récente des données de sérologie permet de donner les sensibilités/spécificité suivantes (Leefflang et al. 2016) :

Au cours de l'EM, la sérologie possède une sensibilité d'environ 50 [40-61] %. La spécificité est de l'ordre de 95%. Ce chiffre, faible, est néanmoins logique. Le délai d'apparition de l'EM étant de 3 à 30 jours en moyenne, le délai moyen d'apparition des IgM étant de 3 à 5 semaines, le délai d'apparition de IgG de 6 à 8 semaines, une zone de chevauchement de patients atteints de la borréliose de Lyme et ayant une sérologie négative est inévitable. C'est pour cette raison que la sérologie n'est pas recommandée dans les formes cutanées précoces de la maladie.

⁴¹ Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

Dans les cas de neuroborrélioses, la sensibilité est d'environ 77 [67-85] % dans le sérum et d'environ 74 [38-93] % dans le LCR, lié en grande partie aux différences de sensibilité des kits disponibles sur le marché. La sensibilité des IgM et des IgG est similaire, avec une meilleure spécificité pour les IgG. L'approche par la recherche de synthèse intrathécale⁴² n'améliore globalement pas la sensibilité mais serait légèrement plus spécifique.

Les cas d'arthrite de Lyme sont ceux où les tests disponibles possèdent les meilleures performances, avec une sensibilité pour les IgG d'environ 96 [93-100] %, et une spécificité de 94 [91-97] %. Pour les cas d'arthrites, les IgM possèdent une faible sensibilité. Dans les cas d'ACA, la sérologie donne également d'excellents résultats avec une sensibilité des IgG de 97 [94-99] % et une spécificité de 95 [88-98] %.

L'interprétation de la sérologie, bien que très utile, possède néanmoins ses limites. Les IgM n'étant pas un marqueur d'évolutivité, elle ne permet pas de faire la différence entre une infection active et une infection traitée. La sérologie ne permet pas non plus de distinguer une cicatrice sérologique d'une réinfection⁴³.

Comme nous l'avons vu, les tests de diagnostic disponibles actuellement ne sont pas parfaits et ne permettent pas de couvrir tous les aspects de la maladie. C'est dans cette optique que de nouvelles techniques à visée diagnostique doivent être développées.

⁴² L'index de synthèse intrathécale consiste à faire le ratio entre les taux d'IgG anti-*Borrelia* dans le sérum et le LCR. En cas de neuroborréliose, le taux d'IgG du LCR est supérieur à celui du sérum, permettant de faire le diagnostic

⁴³ Les anticorps anti-*Borrelia* ne sont pas protecteurs d'une nouvelle infection et peuvent persister des mois voire des années après une primo-infection (Stanek et al. 2012)

G. Modèles animaux pour l'étude de la maladie de Lyme

« Le meilleur modèle d'un chat, est un chat, et de préférence le même chat »

Norbert Weiner, mathématicien

« Tous les modèles sont faux, mais certains sont utiles »

Georges Box, statisticien

L'étude des aspects physiopathologiques de la borréliose de Lyme repose sur des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*. A côté des modèles *in vitro*, les approches *in vivo* sont nécessaires pour permettre une étude globale des interactions entre la bactérie et son hôte. Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour l'étude de la maladie. Nous décrirons ici les principaux modèles ayant servi ou servant à la recherche sur la borréliose de Lyme.

1. Le chien (*Beagles*)

Le chien est un animal sensible à *Borrelia* (Mather et al. 1994) et développe de sévères arthrites, histologiquement proche de celles de l'Humain (Kornblatt et al. 1985), apparaissant entre 2 et 5 mois après la piqûre (Appel et al. 1993). Ces arthrites sont accompagnées d'une élévation faible de la température, classiquement entre 39,5 et 40°C⁴⁴. Les premiers chiens infectés expérimentalement par des tiques étaient des Beagles, et de fortes variations dans la réponse immunitaire entre les chiens exposés en laboratoire et ceux exposés naturellement ont été observés, de même qu'entre les chiens symptomatiques et non-symptomatiques (Greene et al. 1988; Callister et al. 2000; Hovius et al. 2000; Baum et al. 2014). De fait, les chiens, en dehors de manifestations articulaires, ne développent pas de symptomatologie cutanée, et beaucoup de chiens séropositifs ne développent aucune manifestation clinique⁴⁵, ce qui rend inutile

⁴⁴ La température normale du chien est de 38,5°C

⁴⁵ Certaines études rapportent la présence de glomérulonéphrites, de nécroses tubulaires et de néphrites chez des chiens possédant des anticorps dirigés contre *Borrelia*, mais aucune étude n'a mis en évidence le pathogène dans ces lésions, et la causalité n'a jamais été prouvée (Littman et al. 2006; Hutton et al. 2008)

l'utilisation de la sérologie chez cet animal (Goossens et al. 2003). De même, des spirochètémies ont été observées chez des chiens asymptomatiques (Greene 1991). Il est à noter que dans ce modèle, l'infection par l'utilisation de tiques adultes semble efficace, tandis que plusieurs expositions répétées à des nymphes infectées sont nécessaires pour obtenir une infection. De même, l'inoculation de culture bactérienne (10^8 en IV) n'entraîne pas de symptomatologie clinique, et aucune détection du spirochète n'est possible 6 mois après cette injection (Appel et al. 1993).

La peau de chiens infectés expérimentalement par des tiques (*I. dammini/I. scapularis*) reste positive en culture et par PCR pendant 5 mois environ, au niveau du site de piqûre, et les bactéries peuvent être retrouvées jusqu'à 1 an après l'infection. Histologiquement, la peau montre un infiltrat périvasculaire composé de plasmocytes, de lymphocytes et de mastocytes, ce qui est très proche des observations humaines, mais sans symptomatologie clinique visible. Un infiltrat de polynucléaires neutrophiles peut être observé si une pustule se développe au point de piqûre (Appel et al. 1993).

Au niveau vasculaire et neural, des vascularites et des névrites peuvent être observées chez une minorité d'animaux infectés (Summers et al. 2005), sans signes cliniques associés (Krimer et al. 2011).

Ce modèle a permis d'étudier l'activité d'un corticostéroïde sur un animal infecté, et ses conséquences cliniques. La prise orale de prednisone⁴⁶ 420 jours après la piqûre de tiques infectées à *B. burgdorferi*, entraîne l'apparition systématique d'une sévère polyarthrite⁴⁷ mais la prise d'un traitement antibiotique⁴⁸ préalable à l'utilisation de la prednisone évite l'apparition de cette symptomatologie (Straubinger et al. 2000). Néanmoins, la même équipe a également montré qu'un traitement par amoxicilline ou doxycycline chez le chien pouvait échouer à l'élimination complète de la bactérie, dans une minorité de cas⁴⁹ (Straubinger et al. 1997).

Ce modèle a également été largement utilisé pour la recherche de vaccins canins et humains (Coughlin et al. 1995; Ma et al. 1995, 1996; Golde et al. 1997; Conlon et al. 2000; Straubinger et al. 2001; Töpfer and Straubinger 2007; Lafleur et al. 2009; Eschner

⁴⁶ 2 mg/Kg deux fois par jour pendant 14 jours

⁴⁷ Dans le groupe témoin, un seul chien sur trois présentait des signes histologiques d'arthrite de faible intensité

⁴⁸ Azithromycine 25 mg/Kg/j ou ceftriaxone 25 mg/Kg/j ou doxycycline 10 mg/Kg/x2/j pendant 30 jours

⁴⁹ 1/5 chiens traités par amoxicilline et 2/6 chiens traités par doxycycline

and Mugnai 2015; La Fleur et al. 2015) et pour l'évaluation de produits répulsifs contre les tiques⁵⁰ (Endris et al. 2002; Bonneau et al. 2010; Honsberger et al. 2016).

2. Le primate non humain

Le macaque rhésus (*Macacca mulatta*) peut développer une infection disséminée à *Borrelia*, lorsqu'elle est inoculée à forte concentration⁵¹ ou après repas sanguin de tiques infectées⁵² (*I. dammini*/*I. scapularis*). Le spirochète peut être isolé par culture jusqu'à 6 semaines post-infection (quel que soit le mode d'infection) dans la peau et dans le sang, mais n'est détecté ni dans l'urine ni dans le LCR, mais est détecté dans le tissu cérébral et les méninges, durant les 5 premières semaines de développement de la maladie (Philipp et al. 1993). La présence de la bactérie a par ailleurs été observée dans la conjonctive d'un singe, sans signe de conjonctivite associée.

Cliniquement, un EM est observable chez la majorité des singes infectés dès la première semaine, mais de manière plus fréquente chez ceux infectés par le repas sanguin de tiques que chez ceux infectés à la seringue. Cet EM dure environ une semaine et est histologiquement proche de ceux observés chez l'Humain, avec un infiltrat lymphocytaire périvasculaire et nerveux superficiel et profond. Un épisode fébrile y est fréquemment associé (Roberts et al. 1995).

Six mois après l'infection et en absence de traitement, le singe développe une oligo ou polyarthrite, principalement aux genoux et aux coudes. L'examen histologique du liquide articulaire révèle un infiltrat de monocytes-macrophages et de lymphocytes, accompagnée ou non d'une hyperplasie synoviale. Il est à noter que la majorité des articulations, bien que touchées cliniquement et/ou histologiquement, restaient négatives en culture (Roberts et al. 1995).

Le modèle du macaque rhésus a essentiellement été utilisé comme modèle de neuroborréliose. Un infiltrat lymphocytaire périvasculaire et péri-nerveux, co-localisé avec la bactérie⁵³, et des atteintes neurologiques périphériques (démýélinisations, fibroses des gaines nerveuses, dégénérescences axonales transitoires) ont été observés.

⁵⁰ Ces études ont démontrés la bonne efficacité de la perméthrine, de l'azapentadiène et de la phénylpyrazone comme molécules acaricides

⁵¹ 10⁶ à 10⁸ *B. burgdorferi* réparti en injections intrapéritonéales, intradermiques et sous cutanées

⁵² Entre 2 et 14 tiques gorgées sur 20 tiques déposées

⁵³ Présence de la bactérie retrouvée par immunomarquage

L'examen du LCR montre l'apparition d'une pléiocytose vers 5 semaines post-infection, durant jusqu'à 10-13 semaines, où la présence de *Borrelia* peut être détectée par PCR et, plus rarement, par culture (Pachner et al. 1995). De même, les astrocytes du singe sont sensibles à la lipoprotéine OspA de *Borrelia*, qui provoque leur prolifération mais aussi leur apoptose, signes également observés chez l'humain⁵⁴ (Dotevall et al. 1999; Ramesh et al. 2003), ainsi qu'une apoptose neuronale au niveau des ganglions rachidiens (Ramesh et al. 2013).

Les autres organes, à l'exception du cœur où une myocardite peut être décelée un an après l'infection, ne sont pas atteints cliniquement, mais des infiltrats lymphocytaires ont été décrits dans le poumon, les reins et le muscle (Roberts et al. 1995; England et al. 1997a, 1997b).

De même que l'Humain, le singe immunocompétent développe une réponse humorale. Après infection, les IgM sont détectables à 3 semaines puis diminuent par la suite, et les IgG entre 5 à 7 semaines, puis continuent d'augmenter jusqu'à 10 semaines (Pachner et al. 2001). L'utilisation de corticostéroïdes⁵⁵, préalablement et postérieurement à l'infection, entraîne une modification de cette réponse. Les IgM sont détectables à 3 semaines, mais contrairement au singe immunocompétent, leur production continue d'augmenter jusqu'à 9 semaines, tandis que les IgG restent à un taux très faible, pendant toute la durée de l'expérimentation. Ces observations sont inversement corrélées avec la charge bactérienne, qui reste faible chez le singe immunocompétent⁵⁶, mais qui est élevée chez le singe traité par corticostéroïde, de 100 à 10 000 copies selon les tissus⁵⁷ (Pachner et al. 2001).

Enfin, il a été montré chez le singe que *Borrelia* pouvait être retrouvée après traitement antibiotique⁵⁸ d'une phase disséminée de l'infection. Néanmoins, ces résultats restent controversés dans le sens où l'inoculum ayant permis l'infection était

⁵⁴ Les patients atteints de neuroborréliose avant traitement ont un taux de GFAP (gliary fibrillary acidic protein) élevé, signe d'une astrogliose

⁵⁵ 2 mg/Kg/j dexaméthasone orale pendant 1 semaine puis 1 mg/Kg/j pendant 10 semaines

⁵⁶ Moins de 100 copies par 500 ng d'ADN extrait de tissu

⁵⁷ Les taux les plus importants étaient retrouvés au niveau du cœur et des muscles, la peau n'a pas été testée dans cette étude

⁵⁸ Xénodiagnostic après traitement par 12 mg/Kg de doxycycline pendant 28 jours

anormalement élevé par rapport à une infection naturelle⁵⁹, ainsi que la voie d'inoculation (Embers et al. 2012).

Le modèle du primate non humain est certainement le plus complet et le plus proche de l'être humain. Cependant, aucune étude n'a été réalisée chez celui-ci en utilisant des doses infectieuses proches d'une infection naturelle chez l'Homme, et les questions éthiques existantes à leur utilisation en limitent l'accès.

3. Les lagomorphes

Le lapin :

Le lapin est prolifique, de petite taille et vit dans des conditions d'élevage facilement contrôlables. La physiologie du lapin est bien décrite et, chez cette espèce, la réponse immunitaire est efficace, permettant la production d'anticorps spécifiques.

Les premiers lapins infectés ont été des lapins blancs New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*). Ces lapins se sont montrés réceptifs à l'infection par *B. burgdorferi* ss, à partir de repas sanguin d'*I. ricinus*, *I. dammini*/*I. scapularis* et *I. pacificus* infectés, et les spirochètémies après repas sanguin sont observées jusqu'à 10 jours (Burgdorfer 1984). Le lapin New Zealand a ensuite été utilisé comme modèle de neuroborréliose, où la présence d'ADN de *Borrelia* a été retrouvée dans le LCR ainsi que dans le tissu cérébral (Pachner et al. 1994) après injection de *B. burgdorferi* ss. Ce modèle est intéressant par le développement chez cette espèce d'un érythème migrant, manifestation cutanée majeure et fréquente chez l'homme. Cet EM dure environ 7 (de 1 à 19 jours) jours après injection de 10^3 *B. burgdorferi* ss par voie intradermique (Kornblatt et al. 1984; Foley et al. 1995). Douze semaines après l'infection, les cultures de peaux deviennent négatives, et le lapin développe naturellement une forte immunité protectrice contre une réinfection (Foley et al. 1995). Cette capacité a été utilisée dans la recherche vaccinale, où il a été montré que les lapins immunisés par la lipoprotéine OspA ou par des vésicules de membranes externes n'étaient pas protégés contre

⁵⁹ Infection par injection de 10^8 bactéries en intrapérionéal, 10^8 en sous-cutanée, 2.10^7 en intradermique et 10^8 en sous-cutanée sur un autre site

l'infection, à la différence de ceux immunisés par une infection préalable⁶⁰ (Shang et al. 2000). Cette notion de protection naturelle de cette espèce a été remise en question en 2007, lorsque des cultures de peaux de lapins 2 ans post-infection se sont montrées positives⁶¹ (Embers et al. 2007). L'espèce semble par contre peu sensible à *B. afzelii* après infection par la tique *I. ricinus*, et le lapin européen⁶² a été proposé comme zoonophylactique dans le cycle naturel, en détournant les tiques infectieuses des hôtes compétents (Matuschka et al. 2000). Enfin, en dehors de l'érythème migrant, les autres manifestations de la maladie sont peu présentes chez le lapin⁶³.

D'autres espèces de lapin semblent réceptives au spirochète mais n'ont jamais servi de modèle de laboratoire. En 1989, il a été montré que la culture de reins provenant de lapins sauvages à queue blanche (*Sylvilagus floridanus*) étaient positives à *B. burgdorferi* ss, et que les tiques sauvages (*I. dentatus*)⁶⁴ récupérées sur ces lagomorphes étaient elles aussi positives (Anderson et al. 1989). Par ailleurs, ces lapins sont capables de développer une réponse immunitaire contre *Borrelia*, et ces anticorps sont détectables par ELISA (Magnarelli et al. 1990). La sensibilité à *Borrelia* du lapin à queue blanche via *I. dentatus* et *I. spinipalpis* dans le cycle naturel de la maladie a ensuite été proposée (*B. burgdorferi* ss, *B. andersoni* et *Borrelia* genomospecies 2) (Telford and Spielman 1989a, 1989b; Hamer et al. 2012; Scott et al. 2017). Une espèce proche, *Sylvilagus bachmani*, semble également compétente dans le maintien de la bactérie dans la nature (Peavy et al. 1997). *A contrario*, le lapin à queue noire (*Lepus californicus*) semble indemne de la maladie (Henke et al. 1990).

4. Les rongeurs

Le rat :

Le rat du coton (*Sigmodon hispidus*) a montré en premier sa sensibilité à l'infection par *B. burgdorferi* ss après injection intradermique et repas sanguin d'*I.*

⁶⁰ Infection par 10⁷ *Borrelia burgdorferi* ss B31 en intradermique. 5 mois après, toutes les peaux testées étaient négatives en culture

⁶¹ Un lapin sur huit après inoculation de 10⁶ *B. burgdorferi* ss intradermique

⁶² Le lapin Européen, ou lapin de garenne, correspond à la même espèce *O. cuniculus*

⁶³ Des arthrites ont été observées chez le lapin American Dutch (Moody et al. 1990b)

⁶⁴ *I. dentatus* se nourrit sur le lapin et les oiseaux

scapularis infectés (Burgdorfer and Gage 1987). Le rat est par ailleurs un hôte réservoir dans le cycle naturel de la maladie (*Rattus rattus* et *Rattus Norvegicus*) (Matuschka et al. 1996, 1997). Une spirochétémie est observée chez cette espèce pendant 3 à 4 semaines. Les rats Lewis, Fischer 344 ou Sprague Downley (souches de laboratoire provenant de *Rattus norvegicus*) développent des infections disséminées (reins, rate, cerveau) et également de fortes atteintes poly-articulaires sous forme d'arthrites (Barthold et al. 1988a, 1988b), avec ses délais d'apparition des formes articulaires variables selon les souches utilisées. Les rats nouveaux-nés sont plus sensibles au développement d'arthrites que les rats sevrés, mais les aspect histo-morphologique des articulations sont identiques, et proches de ceux observés chez l'homme (Barthold et al. 1988b), avec un infiltrat leucocytaire important à majorité de polynucléaires neutrophiles, de monocytes et de mastocytes (Valencia et al. 1993). Ces atteintes sont liés au moins en partie à la réponse immunitaire aux lipoprotéines membranaires de la bactérie (Osp) (Gondolf et al. 1994; Batsford et al. 2004).

A la différence du lapin, le rat développe une infection disséminée sur le long terme, la culture de spirochètes étant positive pendant 30 jours dans le sang, 60 jours dans le cerveau, et 360 jours dans les articulations, les reins, la rate et le foie (Moody et al. 1990a). Cette capacité a été utilisée pour étudier les adaptations antigéniques et moléculaires de la bactérie chez l'hôte vertébré, en utilisant des implants intrapéritonéaux (Akins et al. 1998; Hefty et al. 2001; Revel et al. 2002; Parveen et al. 2003; Purser et al. 2003). Dans le sang, la bactérie semble être capable de traverser les vaisseaux sanguins rapidement après injection intraveineuse (2 heures), puis dissémine de manière aléatoire vers les différents organes en une à six heures (Galbe et al. 1993). Le rat développe également une atteinte cérébrale, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique augmentant dès 12 heures après injection intraveineuse de *B. burgdorferi* ss et les spirochètes sont retrouvés dans le LCR à 48 heures⁶⁵ (Garcia-Monco et al. 1990). Ce modèle de neuroborréliose chez le rat a été également utilisé pour appréhender l'importance de l'activation microgliale dans la pathogénèse de ces formes cliniques⁶⁶ (Brissette et al. 2012; Smith et al. 2014).

⁶⁵ Cette augmentation de perméabilité n'était pas retrouvée après injection intradermique

⁶⁶ L'activation microgliale entraîne une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoire, tel que l'IL-1 β .

Le Hamster :

Les hamsters syriens (*Mesocricetus auratus*) sont sensibles à l'infection par *Borrelia* et développent une infection généralisée où les spirochètes sont cultivables dans le sang pendant 6 jours, dans le foie, les reins, les testicules et le cerveau à 14 jours, et les yeux jusqu'à 52 jours après injection intra-péritonéale, signe d'une infection disséminée. Néanmoins, le hamster immunocompétent ne semble développer ni de symptomatologie clinique, ni de modifications histologiques suite à l'infection. L'infection n'est établie que par l'utilisation de doses infectantes supérieures ou égales à 10^3 bactéries⁶⁷ (Johnson et al. 1984; Duray and Johnson 1986; Moody et al. 1990b; Piesman et al. 1990). Chez le hamster, la dissémination de *Borrelia* semble importante, au regard de fort taux de positivité des cultures cardiaques et urinaires jusqu'à 84 jours post-infection⁶⁸ (Goodman et al. 1991). Enfin, le hamster est un moins bon réservoir que la souris, puisque moins de tiques infectées sont retrouvées après repas sanguin, comparativement à la souris (Piesman 1993).

L'injection directe dans les pattes arrière de hamster entraîne le développement d'une arthrite transitoire avec un infiltrat diffus de polynucléaires, associé à un épanchement articulaire, remplacé ensuite par une discrète synovite chronique. Chez le hamster irradié, l'arthrite est beaucoup plus intense et de durée prolongée, avec une présence de spirochètes plus importante et plus longue (Schmitz et al. 1988; Hejka et al. 1989). Par ailleurs, les hamsters immunisés passivement par du sérum de lapin immun sont protégés de l'infection par *Borrelia*⁶⁹ (Johnson et al. 1986). L'immunisation préalable par le sérum de hamsters immuns chez ces hamsters irradiés permet de prévenir l'infection, et ces sérums possèdent une activité bactéricide marquée et rapide⁷⁰ (Schmitz et al. 1990, 1991; Lovrich et al. 1991; Sachsenmeier et al. 1992). Cette immunité protectrice dépend au moins en partie d'une réponse contre la lipoprotéine OspC (Hughes et al. 1993). Le hamster préalablement vacciné par un lysat complet de *Borrelia* développe de sévères arthrites et a été utilisé dans l'analyse des mécanismes

⁶⁷ Par comparaison, une tique infectée injecterait environ 100 spirochètes

⁶⁸ 98% de cultures cardiaques et 90% de cultures de vessies positives

⁶⁹ Dose infectante utilisée : 1000 bactéries

⁷⁰ Dès 2 heures

physiopathologiques responsables de ces atteintes. Ce mécanisme dépend au moins en partie de la réponse immunitaire contre la lipoprotéine OspA (Lim et al. 1995a, 1995b; Du Chateau et al. 1996; Duchateau et al. 1997; DuChateau et al. 1999; Munson et al. 2012), mais non d'OspC (Lovrich et al. 2005).

Le modèle a aussi été utilisé pour la détermination des concentrations minimales bactéricides de divers antibiotiques vis-à-vis de *Borrelia* (Johnson et al. 1990) et également dans des études concernant l'innocuité et/ou l'efficacité de différents vaccins ou adjuvants (Jobe et al. 1994; Lim et al. 1994; Johnson et al. 1995; Lovrich et al. 1995; Croke et al. 2000; Xiao et al. 2011) ou dans le développement de tests sérologiques .

De ces études, il ressort que le hamster semble être un bon modèle d'étude de la physiopathologie arthritique, mais que les réponses immunitaires observées sont différentes des autres rongeurs ainsi que de l'homme.

Le cochon d'inde :

Le cochon d'Inde a très peu été utilisé comme modèle dans la recherche sur la borréliose de Lyme. Le cochon d'inde (*Cavia porcellus*), comme le lapin, développe des lésions cutanées après repas sanguin de tiques positives. Ces lésions sont visualisées 7 jours après le repas sanguin et disparaissent trois jours après leur apparition (Krinsky et al. 1982). De plus, le cochon d'Inde est capable de développer une résistance au repas sanguin de nymphes s'il a été préalablement exposé à des larves (Nazario et al. 1998). Cette résistance met en jeu une forte réponse cutanée à polynucléaires basophiles et éosinophiles (Krinsky et al. 1982) et a été utilisée pour l'analyse de la réponse immunitaire contre la salive de tique (Narasimhan et al. 2007a; Kotsyfakis et al. 2008). Ce modèle permet d'obtenir une infection à *B. burgdorferi* ss disséminée, si les animaux sont infectés jeunes (≤ 3 mois). Les spirochètes peuvent être retrouvés par culture 4 semaines après infection par voie intradermique dans la vessie, les articulations, le cœur, la rate et la moelle épinière (Sonnesyn et al. 1993). Huit semaines après l'infection, la majorité des organes deviennent négatifs en culture, à l'exception notable des articulations (Sonnesyn et al. 1993). Cliniquement, le cochon d'Inde développe une myocardite dans la majorité des cas (90%), mais ne développe ni arthrites (10% des cas) ni autres symptômes de la maladie (Sonnesyn et al. 1993).

La gerbille :

La gerbille (*Meriones unguiculatus*) a peu été utilisée comme modèle de la borréliose de Lyme. La gerbille développe une infection disséminée après injection intradermique ou intra-péritonéale, persistante pendant environ 6 mois, à l'exception des articulations qui peuvent rester positives en culture pendant un an (Preac Mursic et al. 1990). Une spirochètémie est observée durant 14 jours, et le foie et la rate semblent être les organes contenant le plus de bactéries (Preac Mursic et al. 1990). L'infection entraîne chez cet animal des changements histologiques dans plusieurs organes. Au niveau cutané, l'infection entraîne l'apparition d'un infiltrat lymphohistiocytaire périvasculaire contenant également quelques plasmocytes et polynucléaires éosinophiles. Néanmoins, à la différence de l'humain, la gerbille développe également une atteinte pulmonaire et rénale (Preac Mursic et al. 1990).

Ce modèle a été utilisé pour tester l'activité de la roxithromycine *in vivo*, mais les résultats observés avec la gerbille se sont montrés différents de ceux observés chez l'humain⁷¹ (Hansen et al. 1992). Le modèle a également été utilisé pour la recherche de candidats vaccinaux (Preac-Mursic et al. 1992) et dans l'acquisition de *Borrelia* par « co-feeding » chez la tique *I. scapularis* (Patrican 1997).

La souris :

La souris est de loin le modèle animal le plus utilisé dans la recherche sur la borréliose de Lyme, car elle est le principal réservoir de la bactérie dans la nature (Levine et al. 1985). Plus de 1000 articles ont pour base ce modèle d'expérimentation. Pour des raisons de clarté, nous détaillerons ici le modèle dans ce qu'il a apporté comme informations sur les phases cutanées de la maladie.

Plusieurs souches de souris de laboratoire peuvent servir à l'étude de la maladie. Néanmoins, certaines souches sont plus sensibles que d'autres, et l'âge auquel les souris

⁷¹ La roxithromycine permet chez la gerbille de traiter l'infection, alors que des échecs thérapeutiques ont été observés chez l'homme

sont infectées est primordial dans l'établissement d'une infection disséminée. Parmi ces souris, les souches C3H/HeN et SWR sont les plus sensibles à *Borrelia* et développent plus fréquemment que les autres souches des manifestations disséminées, et ce d'autant plus qu'elles sont infectées jeunes (Schaible et al. 1989; Barthold et al. 1990).

Le modèle murin a permis en premier de comprendre que la peau est un site préférentiel dans l'infection par *Borrelia*. Il a été démontré très tôt que la voie intradermique était celle qui permettait d'obtenir une infection avec un inoculum le plus faible⁷², comparée à la voie intrapéritonéale, intragastrique ou intranasale (Barthold 1991). L'injection intradermique permet par ailleurs d'obtenir une réponse immunitaire beaucoup plus complexe⁷³ que celle obtenue par d'autres voies (Pachner et al. 1992). L'application de broyats de tiques positives sur la peau intacte de souris n'entraîne par ailleurs aucune infection, différenciant les *Borrelia* des *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes, et démontrant le rôle essentiel de la tique dans la transmission de la maladie (Crippa et al. 2002). Par la suite, des expérimentations employant l'ablation de la peau autour du site d'attachement de la tique infectée à différents temps postérieurs au repas sanguin ont démontré que la bactérie persistait d'abord dans la peau pendant quelques jours (2 jours) avant de disséminer par voie hématogène, les souris ayant bénéficié de cette ablation dans les deux premiers jours après la fin du repas sanguin ne développant ni maladie, ni séroconversion (Shih et al. 1992). Ce modèle a également démontré que le taux de transmission de la bactérie par la tique était directement lié à la durée du repas sanguin, et qu'un délai de 24 à 48h était nécessaire à l'injection du pathogène (Piesman et al. 1987, 1991; Shih and Spielman 1993; Crippa et al. 2002).

Les études sur la souris ont ensuite montré que la bactérie disséminait dans la peau à distance de l'inoculation aux environs du dixième jour, par voie hématogène, et que celle-ci pouvait être un site de persistance de l'infection, les bactéries étant cultivables à partir de biopsies cutanées un an après injection intradermique (Barthold et al. 1991b, 1993). Le rôle de la salive de la tique dans la transmission et la dissémination cutanée est de surcroît primordial, la bactérie disséminant plus

⁷² 2.10¹ spirochètes

⁷³ Les voies intrapéritonéales et intraveineuses entraînent une réponse anti-OspA majoritaire, alors que la voie intradermique n'entraîne pas de réponse anti-OspA importante, mais entraîne une forte réponse dirigée contre des protéines de *Borrelia* de différents poids moléculaires

rapidement et plus efficacement⁷⁴ chez les souris infectées par piqûre de tique que par injection intradermique (Shih and Liu 1996; Macháčková et al. 2006). La capacité de dissémination de la bactérie chez la souris dépend également de polymorphismes observés sur ses lipoprotéines, comme OspC, qui en fonction de sa capacité de liaison au fibrinogène d'une part, et par son effet anti-phagocytaire d'autre part, est plus ou moins invasive (Lagal et al. 2006; Carrasco et al. 2015).

A l'opposé, de la peau de l'hôte infectée vers la tique naïve, le modèle murin a démontré que la nymphe acquérait très rapidement le pathogène pendant le repas sanguin, dès 8 heures, et que le taux de transmission était plus élevé en utilisant des souris infectées depuis 2 mois par rapport à des souris infectées depuis 8 mois, suggérant ici encore une persistance cutanée de la bactérie à long terme, malgré une forte réponse immunitaire observée semblant en partie contrôler l'infection (Schwan et al. 1989; Shih et al. 1992, 1995; Gern et al. 1993). De plus, la piqûre de la tique sur des sites anatomiques différents ne modifie pas le taux de transmission, suggérant une dissémination du pathogène à l'ensemble du tissu cutané de la souris (Shih et al. 1995).

Les mécanismes de défense de l'hôte contre l'infection à *Borrelia* ont également été étudiés sur modèle murin. Le contrôle de l'infection au niveau cutané fait intervenir les lymphocytes T CD4+, les souris déplétées en T CD4+ possédant un nombre de bactéries deux fois plus important dans la peau que les souris contrôles (Keane-myers and Nickell 1995). De même, l'injection de lymphocytes T CD4+ spécifiques de *Borrelia* à des souris entraîne une forte réduction de l'inoculum bactérien dans les tissus (Pride et al. 1998). La salive de tique, comportant des molécules affectant la prolifération des cellules T et la réponse immunitaire innée de l'hôte, promeut une réponse inadaptée de type Th2 en inhibant la réponse Th1. Cette polarisation des lymphocytes est dépendante au moins en partie du recrutement des cellules de Langerhans au niveau cutané, et favorise l'infection par la bactérie (Wikel and Bergman 1997; Zeidner et al. 2008; Vesely et al. 2009; Kern et al. 2011b; Marchal et al. 2011). Les souris développant une symptomatologie clinique produisent de forts taux d'IL-1 α sanguin et local, corrélé avec la présence de bactéries dans la peau (Isogai et al. 1997). Enfin, la bactérie est capable d'induire la production d'IL-10 par les macrophages et les

⁷⁴ Le taux de culture de peaux de souris positive était plus important dans le groupe repas sanguin, et la dissémination vers des sites distants plus rapide

cellules dendritiques cutanés, qui en agissant sur un mode autocrine, diminue la production de cytokines pro-inflammatoire, supprimant en partie la phagocytose, essentielle dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Chung et al. 2013).

La peau de la souris est une niche immunitaire pour la bactérie à la phase disséminée de la maladie, la peau contenant un taux de spirochètes plus élevé que d'autres tissus, tels que le cœur ou la vessie (Liang et al. 2004a). La peau est un tissu riche en décorine. Grâce à ces multiples adhésines, dont DbpA et DbpB, protéines de liaison à la décorine (Coburn et al. 2013), la bactérie est en partie protégée du système immunitaire (Shi et al. 2008). L'utilisation de souris *Dcn*^{-/-}, n'exprimant pas la décorine, affecte le taux de bactéries présentes au niveau cutané pour le rendre égal aux autres tissus, ceci uniquement à la phase tardive, et en présence d'une réponse immunitaire⁷⁵. La surexpression par la bactérie de DbpA diminue d'ailleurs de 50% la dose infectieuse chez la souris (Xu et al. 2007b). La liaison de DbpA à la décorine masquerait cet antigène, le rendant inaccessible aux anticorps spécifiques anti-DbpA, qui sont majoritairement produits à la phase disséminée de la maladie (Hagman et al. 1998; Hanson et al. 1998; Liang et al. 2004a). Un mécanisme identique surviendrait pour BBK32, protéine de liaison à la fibronectine (Probert and Johnson 1998; Liang et al. 2002b). La bactérie est également capable de sous-exprimer dans la peau un certain nombre⁷⁶ de gènes codant des lipoprotéines durant la phase précoce de la maladie, telles qu' *OspA*, ou durant la phase disséminée de l'infection, telle qu' *OspC* (Liang et al. 2002a, 2002b). Vingt-quatre jours après l'infection, moins de 40 des 137 gènes codant des lipoprotéines sont exprimés par la bactérie (Liang et al. 2002b). A l'inverse, d'autres lipoprotéines sont surexprimées dans la peau de souris à la phase disséminée, telles que *VlsE*, protéine majeure responsable de l'échappement immunitaire de *Borrelia* (Coutte et al. 2009; Tilly et al. 2013). Ces changements moléculaires durant la phase disséminée n'interviennent que s'il existe une réponse immunitaire de l'hôte⁷⁷, suggérant que la bactérie est capable de produire de multiples phénotypes qui pourraient s'interconvertir lors des différentes phases de l'infection. Enfin, les souches de *Borrelia* ne sont pas identiques et la réponse immunitaire de l'hôte dépend de cette diversité (Kern et al. 2015).

⁷⁵ Chez la souris SCID, le taux de *Borrelia* est identique dans tous les tissus

⁷⁶ 21 lipoprotéines sous exprimées dans la peau à 10 jours d'infection

⁷⁷ Chez la souris SCID, les lipoprotéines sont sous-exprimées en moins grand nombre

Cette capacité de la bactérie à persister dans la peau des souris a été exploitée pour la recherche de candidats vaccinaux d'une part (Schnell et al. 2015a), et pour la recherche de marqueurs d'infection active par protéomique d'autre part (Schnell et al. 2015b). De manière très intéressante, ces études sur la souris ont pu être ensuite transposées à l'Homme, démontrant tout le potentiel d'étude de ce rongeur dans la borréliose de Lyme.

II. La peau

A. Structure et composants principaux

La peau humaine est l'enveloppe du corps. Elle représente un tiers du poids de l'organisme et possède une surface d'environ 2 m² chez un adulte. Les annexes cutanées comprennent les phanères (poils et ongles) ainsi que les glandes sébacées, les glandes sudoripares apocrines et eccrines. Elle est classiquement divisée en quatre régions superposées qui sont de la partie superficielle vers la partie la plus profonde : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme (Figure 14). Un de ses rôles les plus importants est de fournir une barrière physique (évitant une perte d'eau trop importante), chimique et biologique contre l'environnement extérieur (Grice and Segre 2011; Kasemsarn et al. 2016). En dehors de ce rôle, elle exerce également diverses fonctions métaboliques comme la biosynthèse de la vitamine D (Bikle 2011) et sa transformation en métabolite actif, la 1, 25 hydroxy-vitamine D, ou la synthèse de la mélatonine (Slominski et al. 2008) et participe à la régulation thermique de l'organisme. Enfin, la peau est un organe immunitaire à part entière.

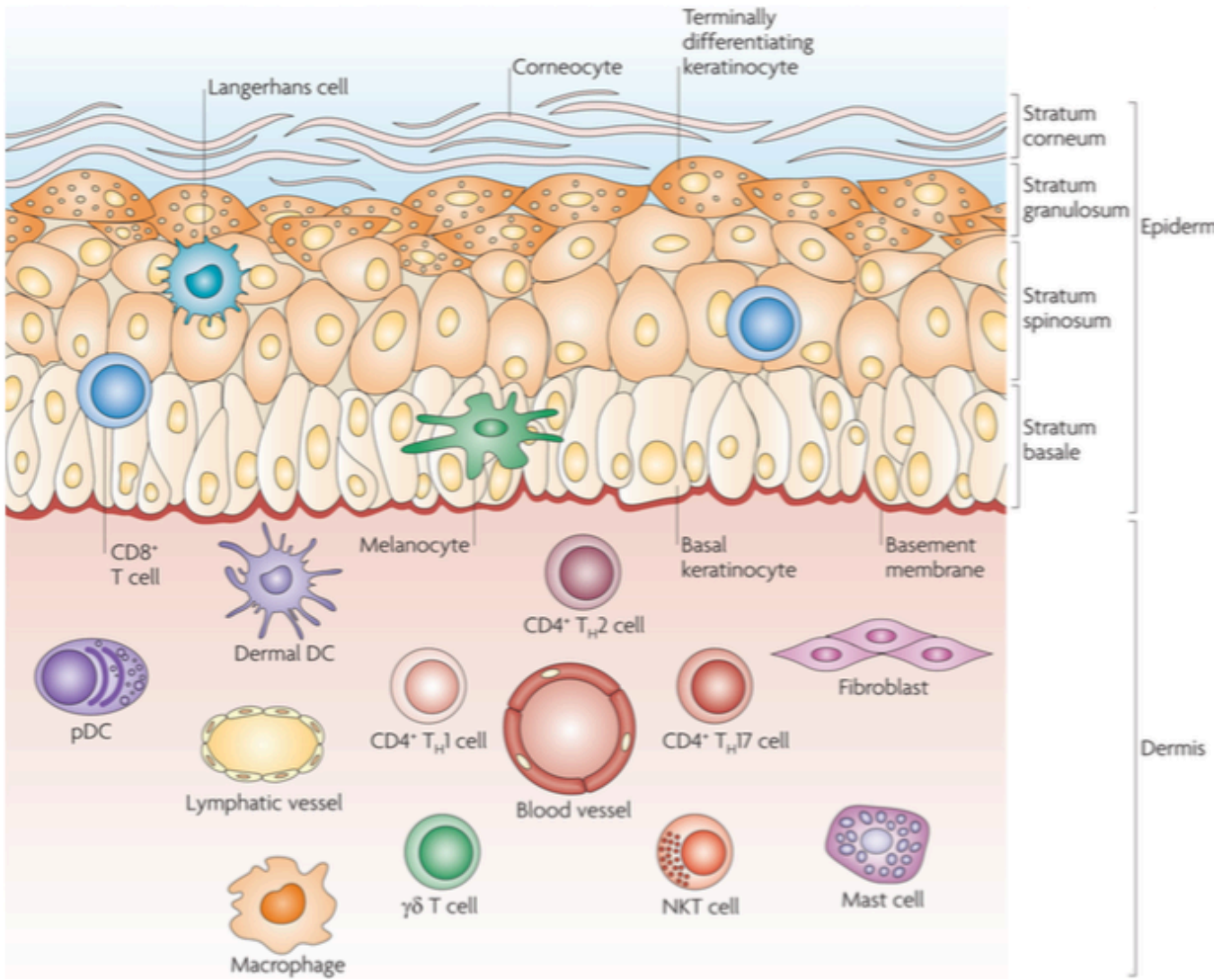


Figure 14 Structure générale de la peau d'après (Nestle et al. 2009)

1. L'épiderme et les kératinocytes

L'épiderme (Figure 15) est un épithélium malpighien d'origine ectodermique se renouvelant continuellement. Son épaisseur varie de 1 à 4 mm et varie histologiquement selon la partie du corps considérée (Kanitakis 2002; Fernandez-Flores 2015). Les kératinocytes y sont majoritaires (90-95%), arrangés en couches continues et successives, de la plus profonde à la plus superficielle : **couche basale** constituée d'une **monocouche** de kératinocytes non différenciés cylindriques, reliés entre eux et à la couche épineuse par des jonctions adhérentes de type desmosomes ainsi qu'à la lame basale par des héli-desmosomes. Les kératinocytes basaux phagocytent en grand nombre les mélanosomes de stade IV produit par les mélanocytes. Cette couche assure le renouvellement continu de l'épiderme par de nombreuses mitoses puis migration des cellules vers les couches supérieures ; **couche épineuse ou spineuse** composée de 5 à 15 couches de kératinocytes polygonaux. Leurs contours apparaissent hérissés d'épines (d'où le nom de cette couche), correspondant à autant de desmosomes accrochant les kératinocytes entre eux⁷⁸. La production de kératine y est plus intense et leur structure contient des faisceaux grossiers de tonofilaments (filaments intermédiaires des kératinocytes) ; **couche granuleuse**, formée par 2 à 3 rangées de cellules parallèles à la surface cutanée, accumulant des grains de kératohyaline et des kératinosomes⁷⁹, qui serviront au processus de desquamation ; **couche cornée** représentant la couche la plus superficielle de l'épiderme, barrière en contact direct avec le milieu extérieur (Proksch et al. 2008; Kasemsarn et al. 2016; Kezic and Jakasa 2016). Elle est composée de 5 à 10 couches de cellules mortes hydrophiles appelées cornéocytes. Ces cellules, dépourvues de noyau et d'organites intra-cellulaires, sont constituées principalement d'une matrice dense de kératine et de protéines réticulées⁸⁰ (Candi et al. 2005). Ces cellules agissent

⁷⁸ Ces desmosomes se transformeront en cornéodesmosomes avec une ligne dense très épaisse dans la couche cornée.

⁷⁹ Les grains de kératohyalines contiennent de la profilaggrine qui se transformera en filaggrine dans les cornéocytes, ainsi que de la kératine, tandis que les kératinosomes (également appelés corps de Odland) verseront leurs contenus (phospho et glycolipides) dans les espaces inter-cellulaires pour y former le ciment intercornéocytaire. Environ 50% des dermatites atopiques peuvent être attribuées à des mutations sur les gènes codant la filaggrine.

⁸⁰ Ces protéines sont l'involucrine, la loricine (70%), l'élafine, SPRR (small prolin rich-protein), cystatine S et filaggrine.

comme des « briques », tandis que le ciment lipophile intercellulaire joue le rôle de « mortier » (Proksch and Brasch 2012; Gittler et al. 2013). Les cornéocytes les plus superficiels se détachent après lyse du ciment intercellulaire et des desmosomes : c'est le processus de désquamation. C'est à ce niveau que la filaggrine est hydrolysée en acides aminés polaires libres⁸¹, constituant les « facteurs hydratants naturels » de la couche cornée.

En dehors des kératinocytes, l'épiderme contient également des mélanocytes, des cellules de Langerhans, des cellules de Merkel, des lymphocytes et des cellules de Toker⁸² (Kanitakis 2002; Hashemi et al. 2014).

Les **mélanocytes** sont des cellules dérivées des crêtes neurales et présentes dans l'épiderme et les follicules pileux. Dans la peau, on compte environ 1200 mélanocytes par mm², indépendamment de la couleur de la peau (Miot et al. 2009). Ces cellules sont ovales ou fusiformes, plus petites que les kératinocytes, et associées dans la couche basale aux kératinocytes, formant ainsi des unités épidermiques de mélanisation⁸³ (Cichorek et al. 2013). Les mélanines (eumélanine ou phaeomélanine) sont produites à partir de la tyrosine puis stockées dans les mélanosomes, qui vont ensuite mûrir⁸⁴. Les mélanosomes matures sont transportés vers les kératinocytes pour former un « parapluie » au dessus du noyau, le protégeant des effets néfastes des UV (Kanitakis 2002).

Les **cellules de Langerhans**, issues des organes hématopoïétiques, représentent 3% des cellules épidermiques chez l'adulte. Ce sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, transépithéliales. Elles migrent vers l'épiderme où elles vont capturer les antigènes, les transformer puis les exposer en surface avec les molécules de classe II du CMH. Elles vont ensuite rejoindre les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T CD4+ (Sparber 2014).

Les **cellules de Merkel** sont des cellules spécialisées dans la mécano-réception, permettant la sensation du toucher. Les cellules de Merkel matures résident en amas de cellules qui sont innervées par des fibres nerveuses somato-sensorielles afférentes à la

⁸¹ Acide urocanique et acide pyrrolidone carboxylique

⁸² Uniquement sur les mamelons. Ces cellules pourraient avoir un lien avec la maladie de Paget.

⁸³ Ces unités regroupent un mélanocyte pour 30 à 40 kératinocytes.

⁸⁴ Il existe 4 stades de maturation des mélanosomes. Les stades I et II correspondent à la synthèse de l'organite, qui contient la tyrosinase non active, le stade III à la synthèse des mélanines après activation de la tyrosinase et le stade IV à un mélanosome complètement mélanisé.

frontière dermo-épidermique dans des régions cutanées spécialisées (Tadeu and Horsley 2014).

L'épiderme ne contient ni vaisseaux sanguins ni vaisseaux lymphatiques et repose sur la jonction dermo-épidermique, qui la sépare du derme.

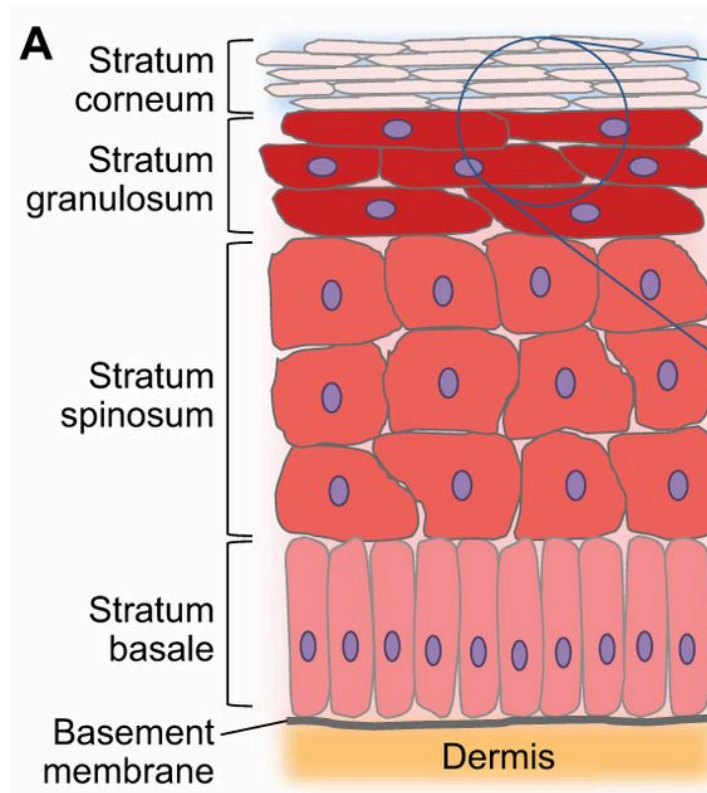


Figure 15 Organisation de l'épiderme et des kératinocytes d'après (Blaydon and Kelsell 2014)

2. La jonction dermo-épidermique

La jonction épidermique est synthétisée à la fois par les kératinocytes basaux et les fibroblastes du derme. Cette structure complexe joue un rôle fondamental comme support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et régule les échanges métaboliques entre ces deux compartiments (Kanitakis 2002). Elle intervient également dans le processus de cicatrisation après blessure, en servant de support à la migration des kératinocytes (Marionnet et al. 2006).

3. Le derme et l'hypoderme

Le derme est un tissu conjonctif d'origine mésodermique compressible et élastique, protégeant l'épiderme, les appendices cutanés ainsi que les vaisseaux sanguins et les plexus nerveux le traversant (Kanitakis 2002). Ce tissu est en renouvellement constant, résultant d'un équilibre entre synthèse et destruction des composants protéiques de la matrice extracellulaire. Son épaisseur varie considérablement selon la localisation anatomique⁸⁵ et sa structure varie selon la profondeur (derme papillaire superficiel, derme réticulaire profond). La surface du derme au contact de l'épiderme présente de nombreuses papilles dermiques qui s'imbriquent avec les crêtes épidermiques augmentant la surface d'échange entre les deux structures. A l'inverse de l'épiderme, le derme possède un vaste réseau vasculaire, impliqué dans la thermorégulation, la cicatrisation, les réactions immunitaires et le contrôle de la pression sanguine (Kanitakis 2002). Le derme papillaire et le derme réticulaire sont 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.

Les cellules majoritaires du derme sont les **fibroblastes**, impliqués dans la synthèse de la **matrice extra-cellulaire** ainsi que dans les processus de réparation de la peau après blessure (Tracy et al. 2016) (Figure 16). Il n'existe pas une mais plusieurs populations de fibroblastes, selon la localisation anatomique et selon leur profondeur dans le derme. Les différentes couches abritent diverses sous-populations de fibroblastes, avec des morphologies et des fonctions physiologiques uniques^{86,87} (Chipev

⁸⁵ De 0,6 mm pour les paupières à 3 mm pour les paumes, le dos et la plante des pieds

⁸⁶ Les fibroblastes des zones glabres (paumes, plante), sont plus petits que ceux trouvés dans des zones non glabres, possèdent moins de récepteurs au TGF- β 1 et possèdent une activité mitotique plus marquée.

and Simon 2002; Sorrell and Caplan 2004; Nolte et al. 2008). 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) (Tracy et al. 2016). 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 architectes du remodelage de la matrice extracellulaire.

En dehors des fibroblastes, le derme possède d'autres types cellulaires comme les cellules dendritiques dermiques, mastocytes, macrophages, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T $\gamma\delta$ et lymphocytes T Natural Killer.

Les composants majeurs de la matrice extracellulaire (Figure 18) sont représentés par les **fibres de collagène**, essentiellement les types I ($\approx 90\%$) et III ($\approx 10\%$)⁸⁸, responsables de la résistance mécanique de la peau (Tracy et al. 2016).

Le **collagène** compte pour environ 98% de la masse sèche du derme (Kanitakis 2002). Biochimiquement, "les fibres de collagène" sont principalement constituées de collagène I, III et V qui appartiennent au groupe des "collagènes fibrillaires à striation périodique" dans la grande famille des collagènes. Les fibrilles sont toujours hétérotypiques, c'est à dire constituées d'au moins 2 types différents de collagène. Elles contiennent aussi des collagènes du groupe des FACITS⁸⁹ (collagène XIV et XVI) qui sont impliqués dans l'assemblage des fibrilles entre elles.

Parallèlement, les fibres dites « de réticuline » sont constituées majoritairement de collagène III et sont retrouvées au niveau des lames basales de la jonction dermo-épidermique, des vaisseaux, des nerfs et des cellules adipeuses.

Les fibres élastiques d'**élastine** contribuent à la résistance et l'élasticité de la peau. Ces fibres sont recouvertes de microfibrilles, composées de fibrilline, associées à de petites molécules, les *microfibril-associated glycoproteins* (MFAP) (Mouw et al. 2014). Ces fibres élastiques sont imbriquées avec les fibres « rigides » de collagènes dans la matrice extracellulaire. En dehors de leur rôle structurel, les fibres d'élastine possèdent

⁸⁷ Pour une même localisation anatomique, les fibroblastes papillaires produisent moins de versicane, mais plus de décorine que les fibroblastes réticulaires. Le taux de synthèse des fibres de collagène de type I et III ne semblent par ailleurs pas différer.

⁸⁸ 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 .

⁸⁹ Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helixes

des effets bénéfiques dans le processus de cicatrisation. L'action des métalloprotéases (MMPs) libère ces fibres, entraînant une accélération de la prolifération des fibroblastes, de la production de collagène I et de tropyélastine⁹⁰ (Antonicelli et al. 2009).

Les **protéoglycanes** sont constitués de glycosaminoglycanes (GAG) (chaînes polysaccharidiques, non ramifiées, sulfatées ou non sulfatées), sur lesquelles se greffent de façon covalente une protéine. Parmi les mieux connus, nous pouvons citer l'acide hyaluronique possédant un rôle important dans le maintien de l'hydratation de la peau et de la balance osmotique ; les dermatane et chondroïtine sulfates qui sont les GAGs les plus fréquemment liés à des protéines ; la décorine qui est le protéoglycane le plus répandu dans la peau chez l'adulte (Tracy et al. 2016).

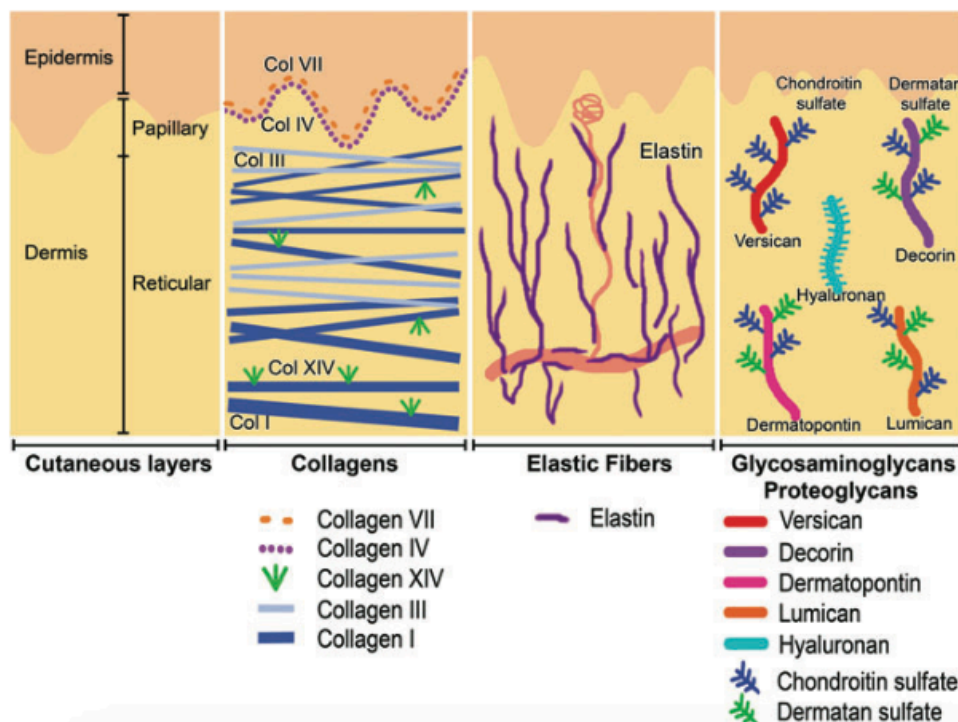


Figure 16 Composants de la matrice extracellulaire de la peau d'après (Tracy et al. 2016)

L'**hypoderme** est constitué de lobes eux-mêmes subdivisés en petits lobules graisseux de tissu adipeux blanc séparés par des septums interlobulaires conjonctivo-élastiques, servant de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme. L'unité cellulaire de l'hypoderme est l'adipocyte, dont l'abondance varie avec les habitudes alimentaires, la localisation anatomique et le sexe. L'hypoderme contient les récepteurs

⁹⁰ Précurseur soluble de l'élastine

à la pression de Vater-Pacini. Derme et hypoderme forment une entité anatomo-fonctionnelle. L'hypoderme possède un rôle important dans la thermorégulation, l'isolation, la provision énergétique et la protection contre les blessures (Kanitakis 2002).

B. Les défenses immunitaires de la peau

La peau humaine est constamment exposée à de nombreux microorganismes pathogènes ou non. Pour réagir adéquatement à ces signaux de danger, l'épiderme et les cellules immunitaires résidentes ou migrantes utilisent en général en premier le système immunitaire inné puis le système immunitaire adaptatif. 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, ou ont un effet bactéricide direct sur les germes pathogènes. Nous allons ici présenter les cellules impliquées dans l'immunité innée, puis celles reliant cette immunité innée à une immunité adaptative, et enfin celle intervenant dans l'immunité adaptative.

1. Les kératinocytes

Les kératinocytes représentent 90% des cellules de l'épiderme. En dehors de leur rôle de barrière physique et chimique, ils représentent également les premières cellules en contact avec les pathogènes. Ils sont capables d'exprimer des récepteurs détectant les micro-organismes, de se défendre directement contre ceux-ci par synthèse de molécules anti-microbiennes, de stimuler et de réguler la réponse immunitaire adaptative par la synthèse de nombreuses cytokines et chimiokines. Les kératinocytes apparaissent donc comme des cellules pluripotentes de l'immunité innée cutanée, souvent oubliés devant les cellules immunitaires plus spécialisées.

a. Les Pattern-Recognition-Receptors

Les kératinocytes et les fibroblastes forment une barrière physique efficace contre les agents infectieux extérieurs. Les kératinocytes peuvent détecter les micro-organismes et entraîner une réponse immunitaire adaptée en fonction des micro-organismes, commensaux ou pathogènes. Cette capacité à détecter les micro-

organismes passe par l'utilisation de récepteurs dédiés, appelés **PRRs**⁹¹ (Nestle et al. 2009). Ces PRRs, localisés à la surface cellulaire, dans les endosomes ou dans le cytoplasme, détectent des PAMPs⁹², ou des DAMPs⁹³ (Yazdi et al. 2016). L'interaction entre un PRR et un PAMP active les voies de signalisation intracellulaire, entraînant une réponse immunitaire innée et adaptative (Gallo and Hooper 2012).

Les PRRs peuvent être subdivisés en quatre groupes : les récepteurs **Toll** ou TLRs, les récepteurs **NOD** ou NLRs, les récepteurs **RIG-I-like** ou RLRs et les récepteurs **lectine de type C** ou CTLRs (Figure 19), comme nous l'avons présenté précédemment (p 30-31).

Les **TLRs** sont de loin les plus connus et les plus étudiés des PRRs. Ils possèdent une origine ancienne dans l'évolution⁹⁴. A l'heure actuelle, 9 TLRs ont été décrits chez l'homme, avec des localisations cellulaires différentes : TLR1, 2, 4, 5 et 6 au niveau de la membrane plasmique ; TLR3, 7, 8 et 9 au niveau de la membrane des lysosomes/endosomes⁹⁵ (Figure 17) (Kalali et al. 2008; Nestle et al. 2009). Les TLRs diffèrent entre eux par leur spécificité de ligand (Kawai and Akira 2010). Ces récepteurs sont capables d'interagir avec de nombreux composés microbiens, comme le LPS, le peptidoglycane, la flagelline ou des acides nucléiques (ADN ou ARN) (Yazdi et al. 2016). Ils sont constitués d'un ectodomaine en N-terminal, riche en Leucine (*leucine-rich repeats*, LRRs), qui reconnaît les PAMPs, et d'un domaine cytoplasmique TIR (Toll/IL-1-1R), entraînant la cascade réactionnelle. Le fonctionnement des TLRs repose sur un homo ou un hétéro-dimère de protéines transmembranaires, la partie extracellulaire liant l'antigène, les parties intracellulaires initiant les cascades réactionnelles (Figure 18).

La liaison des TLRs avec l'antigène est suivi par la mise en place d'une des deux voies d'activations majeures : la voie TIR-domain-containing-adaptor-inducing interferon- β (TRIF), ou la voie Myd88. Chacune de ses deux voies entraîne une cascade d'activation de protéines kinases, permettant l'activation de facteurs de

⁹¹ Pattern recognition receptors

⁹² Pathogen-associated molecular patterns

⁹³ Danger-associated molecular patterns

⁹⁴ Ils sont présents chez les espèces *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*

⁹⁵ Chez les kératinocytes, TLR 7 et 8 ne sont pas exprimés de manière constitutive. TLR7 peut être induit par l'activation de TLR3 via des ARNs double brin, rendant les kératinocytes sensibles aux agonistes de TLR7

transcription tel que NF- κ B, IRF-3 ou AP-1, entraînant une réponse immunitaire de type T_H-1 par la production d'interféron de type I⁹⁶ (Nestle et al. 2009).

Alors que les TLRs sont exposés essentiellement en surface, les **NLRs** sont leurs homologues intracellulaires, détectant les dangers intracellulaires. Ce sont des récepteurs cytoplasmiques ou mitochondriaux (NLRX1), capables de reconnaître des motifs conservés (Carneiro et al. 2008). A l'heure actuelle, 23 NLRs ont été décrits chez l'homme (Motta et al. 2014). Ces récepteurs peuvent être divisés en quatre familles selon le domaine présent au niveau de la partie N-terminale : Caspase Recruitment Domain (CARD), Pyrin Domain (PYD), Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat (BIR) et Transactivator Domain (AD). Les quatre famille portent alors un nom en rapport avec ce domaine : NLRC, NLRP, NLRB et NLRA. Les récepteurs NOD1 et NOD2 (famille NLRC), reconnaissent le peptidoglycane bactérien et déclenche une réponse de type NF- κ B et MAPK, alors que NOD5 est impliqué dans la régulation du CMH de classe I (Tattoli et al. 2007; Staehli et al. 2012). Les récepteurs les plus fréquents sont les récepteurs NLRP, qui via une protéine adaptatrice ASC⁹⁷ (apoptosis-adaptative speck-like protein) et la pro-caspase 1, forme un complexe protéique appelé inflammasome. L'assemblage de l'inflammasome entraîne l'activation de la caspase 1, qui clive le pro-IL-1- β ⁹⁸ et le pro-IL-18 en leurs formes actives (Nestle et al. 2009).

Les **RLRs** sont des hélicases cytoplasmiques, spécialisées dans la reconnaissance des ARN double brin. Leur activation déclenche la phosphorylation de IRF3, suivi d'une dimérisation de celui-ci. Après translocation dans le noyau, les dimères d'IRF3 se fixent sur les séquences (IFN-stimulated response element) et, en association avec le co-activateur CBP/P300, activent la transcription des gènes codant les IFNs (Kalali et al. 2008). D'autres classes de RLRs commencent à être décrites⁹⁹, spécifiques de l'ADN simple ou double brin, mais non encore décrits chez les kératinocytes (Takaoka et al. 2007; Kalali et al. 2008).

Enfin, les **CTLRs** sont des récepteurs capables de liés des carbohydrates de manière calcium-dépendante. Ces récepteurs, dont les plus connus sont NKGD2 et

⁹⁶ Les interférons de type I sont chez l'homme l'IFN- α , IFN- β et l'IFN- ω

⁹⁷ Sauf NLRP1 qui possède un domaine FIIND supplémentaire lui permettant d'activer directement la caspase 1.

⁹⁸ IL-1- β est une cytokine pyrogène et IL-18 est impliquée dans l'activation des macrophages.

⁹⁹ Par exemple DAI (DNA-dependant-activator of IFN-regulatory factors), AIM2 (absent in myeloma2), p202 ou encore LRRFIP1

CD69, sont codés par un complexe de gènes appelés NKC¹⁰⁰ (Spreu et al. 2010). Ces récepteurs membranaires sont caractérisés par un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) et sont capables de reconnaître par exemple des β -glucanes de la paroi des champignons ou le lipoarabinomannane de *Mycobacterium tuberculosis* (Plato et al. 2015; Kerscher et al. 2016). Les kératinocytes expriment un type très particulier de CTLRs appelé KACL¹⁰¹, qui stimule la cytotoxicité des cellules NK via un autre récepteur situé sur les cellules NK, NKp65¹⁰², augmentant leur production d'interféron- γ (Bauer et al. 2015).

¹⁰⁰ Natural Killer Complex. Ce complexe contient chez l'homme environ 30 gènes codant pour des CTLRs exprimés principalement par les cellules NK, les lymphocytes T, les cellules myéloïdes.

¹⁰¹ Keratinocytes Associated C-Type Lectin

¹⁰² Appartenant également à la famille des CTLRs

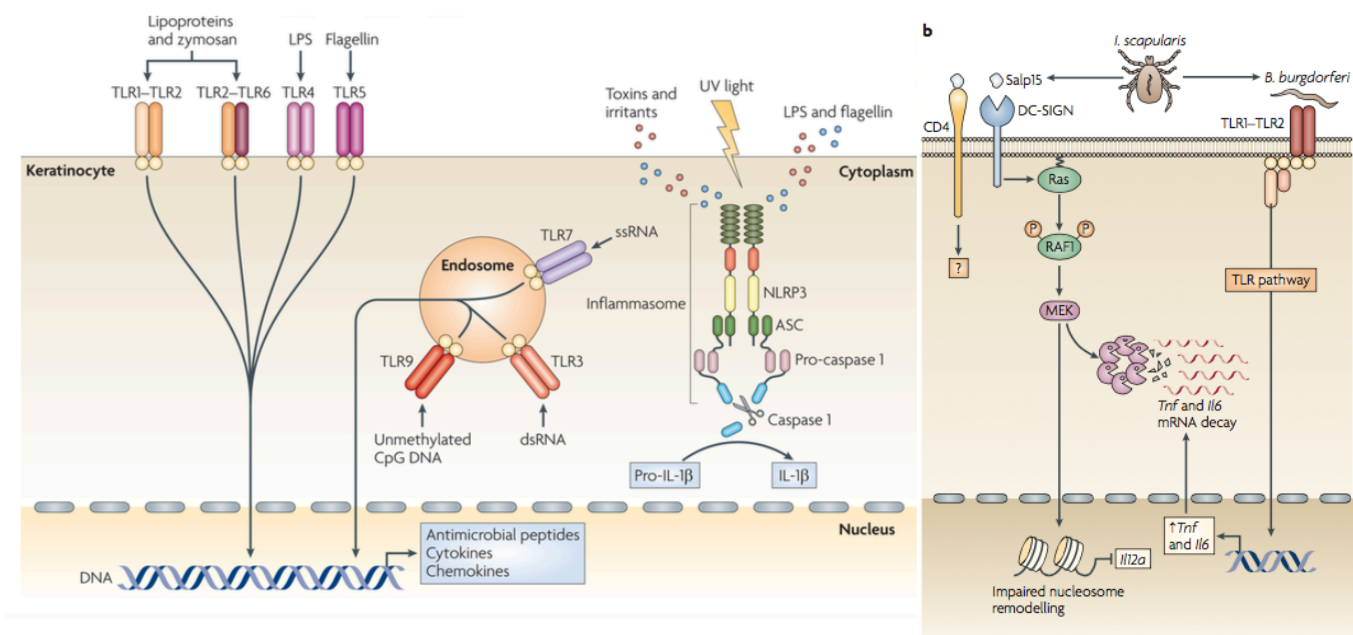


Figure 17 Principales actions des récepteurs de types Toll, NOD et Lectine de type C chez le kératinocyte d'après (Geijtenbeek and Gringhuis 2009; Nestle et al. 2009)

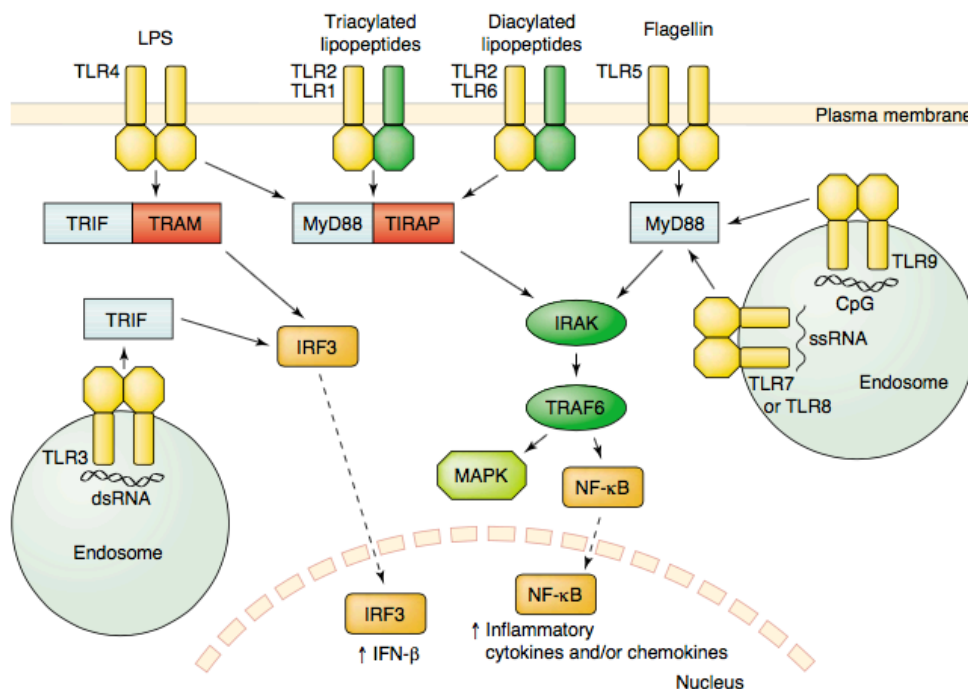


Figure 18 Voies d'activation associées aux TLRs d'après (Van Duin et al. 2006)

Après avoir détecté les pathogènes par l'intermédiaire de cette grande diversité de récepteurs, les kératinocytes vont y répondre par la production de **peptides anti-microbien (PAMs)**, de chimiokines et de cytokines.

b. Les Peptides antimicrobiens

Les **PAMs** sont des mécanismes de défenses conservés chez les cellules eucaryotes (Kościuczuk et al. 2012). Ils inhibent l'invasion microbienne par une action bactéricide directe vis-à-vis du pathogène, par le recrutement de cellules immunitaires et par induction de la production de cytokines (Lai and Gallo 2009). Les kératinocytes sont une source importante de PAMs cationiques, appelés **cathélicidines** et **β -défensines**. La production de ces dérivés peut être également augmentée via des cytokines produites par les lymphocytes T_H17, comme l'IL-17A et l'IL-22 (Liang et al. 2006; Weaver et al. 2007).

Chez l'homme, l'unique cathélicidine est **LL-37**¹⁰³ (Crack et al. 2012). En dehors des kératinocytes, LL-37 est également produite par une grande variété de cellules et de tissus, particulièrement au niveau de la peau, de la bouche, de l'œsophage ou du vagin (Murakami et al. 2002). Chez les kératinocytes, cette expression est inductible en présence d'une blessure ou de désordre inflammatoire (Frohm et al. 1997; Di Nardo et al. 2003). LL-37 est un peptide linéaire hélicoïdal amphiphile possédant un excès de résidus basiques¹⁰⁴, lui conférant à pH 7 une charge de +6. Cette configuration lui permet de se lier de manière électrostatique avec le LPS des bactéries à Gram négatif, aux acides techoïques contenus dans le peptidoglycane des bactéries à Gram positif ainsi qu'avec les phospholipides chargés négativement de la membrane plasmique bactérienne. Ces interactions conduisent à la formation de petites lésions destructurantes au niveau de la membrane plasmique ou à la formation lente de pores importants entraînant la mort de la bactérie (Figure 19) (Xhindoli et al. 2016). LL-37 possède une activité antimicrobienne large, ciblant des bactéries, virus, champignons et parasites (Guthmiller et al. 2001; López-García et al. 2005; Currie et al. 2013; Tripathi et al. 2015). LL-37 est active sur diverses bactéries à des concentrations de l'ordre de 0,5 à 20 μ M, mais semble peu active sur

¹⁰³ Pour être précis, le terme de cathélicidine correspond à la pro-forme inactive, alors que le peptide antimicrobien a proprement parlé est donné par sa séquence et sa taille. Par exemple, LL-37 est la forme active de hCAP18 (cathélicidine), avec deux Leucine et une taille de 37 acides aminés.

¹⁰⁴ 5 Arginines et 6 Lysines

Borrelia, avec une concentration minimale bactéricide de l'ordre de 450 mg/L (Sambri et al. 2002; Xhindoli et al. 2016). En dehors de ce rôle direct sur les bactéries, LL-37 stimule également le recrutement des polynucléaires neutrophiles, des monocytes/macrophages et des lymphocytes T et des mastocytes (Yamasaki and Gallo 2008).

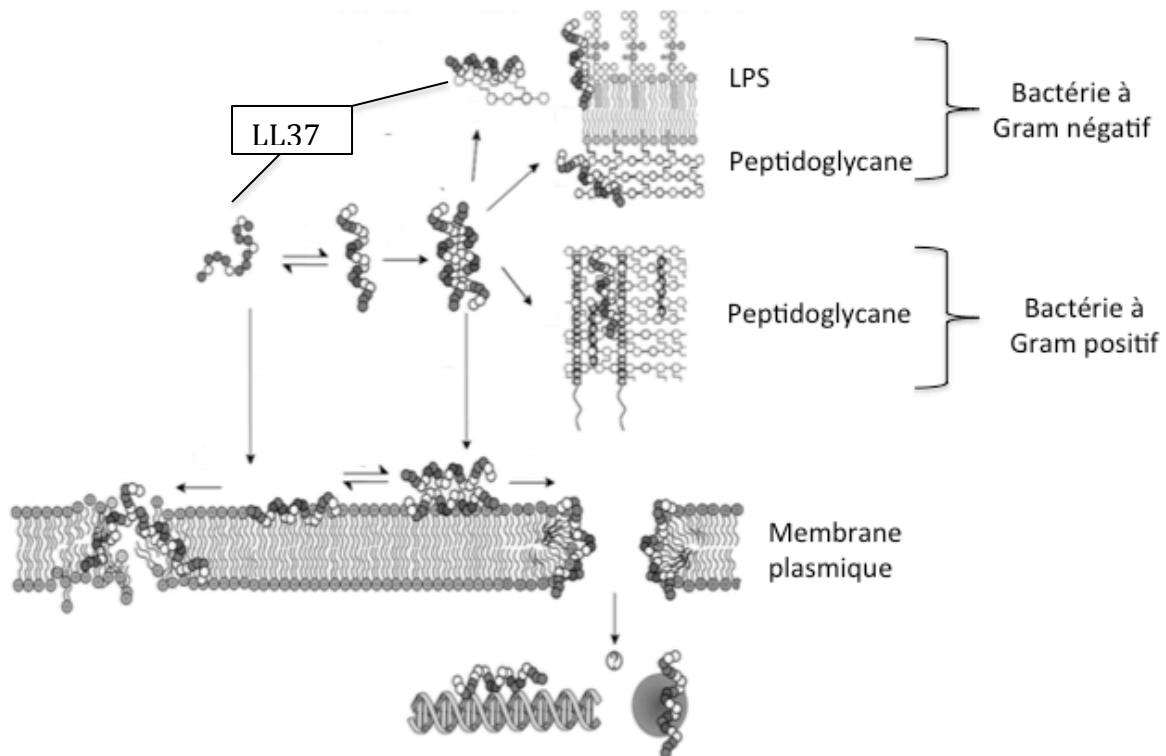


Figure 19 Mode d'action antibactérien de LL-37 d'après (Xhindoli et al. 2016)

Les **défensines** sont de petites molécules (4-6 kDa) cationiques sécrétées par de nombreuses cellules animales et végétales. Chez les kératinocytes, ce sont des β -défensines¹⁰⁵ qui sont sécrétées. Toutes les défensines humaines proviennent d'un pré-propeptide large¹⁰⁶, composé d'une extension N-terminale accolée au propeptide. Le propeptide est lui même composé d'un pro-domaine accolé à la séquence mature de la défensine (Suarez-Carmona et al. 2015). Un processus enzymatique permet ensuite de libérer le peptide mature et actif¹⁰⁷. Les défensines

¹⁰⁵ hBD-1, hBD-2 et hBD-3

¹⁰⁶ Environ 110 acides aminés

¹⁰⁷ Si le processus de maturation des α -défensines est bien connu, celui des β -défensines n'est pas encore élucidé.

agissent par interactions avec les charges négatives de la membrane des pathogènes. Elles s'accumulent ensuite dans la membrane plasmique, entraînant une dépolarisation de celle-ci, perturbant alors le métabolisme du micro-organisme. Elles utilisent en outre leur capacité à s'agréger pour former des pores, augmentant ainsi la perméabilité de la cellule (Suarez-Carmona et al. 2015). Elles possèdent également un rôle dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire innée¹⁰⁸ (Yang et al. 1999; Ferris et al. 2013). Enfin, ces défensines semblent également être impliquées dans les processus de néo-vascularisation après blessure¹⁰⁹ (Suarez-Carmona et al. 2015).

D'autres peptides antimicrobiens (non-défensines) peuvent également être synthétisés par les kératinocytes, comme la dermcidine, les protéines S100, la RNase7, le SLPI¹¹⁰, le lysosyme et l'adrénomoduline (Harder and Schroder 2005; Firat et al. 2014; Jia et al. 2014).

L'ensemble de ces peptides antimicrobiens, impliqués dans la défense immunitaire innée, joue également le rôle d'**alarmine**, en stimulant la prolifération et la production de cytokines par les kératinocytes (Oppenheim et al. 2007).

c. Les cytokines et chimiokines

En plus de ces PAMs, les kératinocytes vont sécréter de multiples cytokines, comme l'IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 et le TNF- α (Ansel et al. 1990; Nestle et al. 2009). Parmi les chimiokines, nous pouvons citer CXCL-1, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11 ou encore CCL20 (Nestle et al. 2009) (Tableau 1).

La sécrétion de l'ensemble de ces molécules va permettre la communication avec les cellules immunitaires présentes dans la peau (cellules de Langerhans, cellules dendritiques dermiques, mastocytes, macrophages et cellules NK) et l'attraction de nouvelles cellules (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes).

¹⁰⁸ hBD-2 active la migration des cellules dendritiques et des lymphocytes T. hBD-3 induit la production d'IFN par les lymphocytes et promeut une réponse de type T_H-1.

¹⁰⁹ Elles stimuleraient le recrutement des cellules endothéliales

¹¹⁰ Secretory leukoprotease inhibitor

Tableau 1 Principales cytokines et chimiokines produites par les kératinocytes

Molécules	Activités	Voie	Références
IL-1	Expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales Activation cellules TH et DCs expansion cellule B Production IFNs	NF-κB	(Feldmeyer et al. 2010)
IL-3	Prolifération de divers types cellulaires Régulation Mastocytes	multiple	(Danner and Luger 1987; Frenzl 1992)
IL-6	Maturation des cellules B Prolifération/Différentiation des KCs	NF- κB	(Sugawara et al. 2001; Hernández-Quintero et al. 2006)
IL-8/CXCL-8	Chimioattraction des neutrophiles		(Liu et al. 1997)
IL-10	Inhibition de l'inflammation	JAK-STAT	(Sabat et al. 2010)
IL-18	Idem IL-1	NF-κB MAPK	(Lee et al. 2015)
TNF-α	Chimioattraction des cellules immunitaires		(Bashir et al. 2009)
CXCL-1	Chimioattraction des neutrophiles		(Su and Richmond 2015)
CXCL-9	Chimioattraction des cellules T	IFN-γ	(Groom and Luster 2011)
CXCL-10	Chimioattraction des monocytes/ cellules T	IFN	(Su and Richmond 2015)
CXCL-11	Chimioattraction des cellules T	IFN	(Groom and Luster 2011)
CXCL-20	Chimioattraction des cellules de Langerhans	IL-1	(Wang et al. 2010)

d. Présentation des antigènes

Les kératinocytes sont capables d'exprimer des molécules du CMH de classe II, ce qui en fait des cellules présentatrices de l'antigène non spécialisées (Nestle et al. 2009). Cette expression serait dépendante de la sécrétion d'IFN-γ, qui en déclenche la surexpression chez les kératinocytes (Nickoloff and Turka 1994). En plus des molécules du CMH de classe II, les kératinocytes sont également capables d'exprimer des molécules d'adhésion comme ICAM-1¹¹¹ ou des co-stimulateurs comme le CD80¹¹² (Fan et al. 2003). Cette activité de cellule annexe présentatrice d'antigène serait impliquée

¹¹¹ ICAM-1 est une molécule d'adhésion permettant la diapédèse des leucocytes.

¹¹² Le CD80 est une protéine retrouvée majoritairement chez les cellules dendritiques, les cellules B et les monocytes, impliquée dans la co-stimulation des cellules T et nécessaire pour leur activation.

dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Les kératinocytes agiraient comme modulateurs de la réponse immunitaire adaptative car de nombreuses études ont montré que des délétions dans certaines voies de signalisation¹¹³ du kératinocyte entraîne de façon systématique une inflammation chronique et importante du tissu cutané (Nestle et al. 2009).

2. Les Fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules résidentes principales du derme. Elles sont responsables de la formation de la matrice extracellulaire et de son remaniement par production d'enzymes protéolytiques (métalloprotéases et sérine-protéases). Les fibroblastes interagissent avec les autres cellules du derme, et particulièrement avec les kératinocytes. Ainsi, la production d'IL-1 α par les kératinocytes induit la synthèse par les fibroblastes de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des kératinocytes¹¹⁴ (Maas-Szabowski et al. 2001).

Bien que les fibroblastes aient un rôle immunitaire moins important que celui des kératinocytes, ceux-ci sont impliqués dans les processus inflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires. Le TGF- β ¹¹⁵, l'IL-1 β et l'IL-6 sont des exemples de cytokines produites par les fibroblastes et actives sur ceux-ci par communication autocrine (Kendall and Feghali-Bostwick 2014). Ces cytokines vont entraîner une réponse de type pro-inflammatoire et pro-fibrotique. Par exemple, le TGF- β agit sur les fibroblastes et les myo-fibroblastes en augmentant leur prolifération, la production de matrice et la production de signaux chimiotactiques. Les fibroblastes sont par ailleurs sensibles à d'autres cytokines, comme l'IL-13 ou l'IL-6 (Feghali and Wright 1997; Scotton and Chambers 2007; Milovanovic et al. 2012), aux prostaglandines (Keerthisingam et al. 2001; Stratton et al. 2002; Maher et al. 2010) et aux leucotriènes (Eap et al. 2012). Les fibroblastes vont en retour produire et sécréter des cytokines comme le TGF- β , l'IL-1 β , IL-33, des chimiokines, ainsi que des radicaux libres oxygénés (Amara et al. 2010; Bondi et al. 2010; Kendall

¹¹³ Par exemple AP1 (facteur de transcription impliqué dans la synthèse de cytokines) ou encore NF- κ B et STAT3.

¹¹⁴ KGF-1 (Keratinocyte Growth Factor) et GM-CSF (granulocyte/macrophage Colony Stimulating Factor)

¹¹⁵ Transforming Growth Factor beta. Ce nom vient de la capacité du TGF- β à transformer les fibroblastes vers une voie tumorale.

and Feghali-Bostwick 2014). Toutes ces cytokines vont favoriser l'activation et le recrutement de cellules immunitaires résidentes telles que les macrophages ou induire la maturation des cellules dendritiques cutanées (Saalbach et al. 2007).

3. Cellules présentatrices de l'antigène, cellules dendritiques et macrophages

Les cellules précédemment citées (kératinocytes et fibroblastes), sont directement impliquées dans une réponse immunitaire dite « innée », en réponse aux signaux de danger. Cette immunité cesse normalement après la disparition de ces signaux et n'est pas transformée en une immunité médiée par les lymphocytes T. Cette transformation d'une immunité « innée » en une immunité « adaptative » est largement dépendante des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène, représentées au niveau cutané par les cellules dendritiques et les macrophages. Ces cellules constituent différentes populations exprimant des antigènes de surface ainsi que des éventails de cytokines différentes. Néanmoins, elles produisent ou expriment toutes de l'IFN, de l'IL-10, IL-12 et de l'IL-23 (Yazdi et al. 2016). Ce cocktail commun de cytokines serait impliqué dans la maturation et la différenciation de ces cellules. Parmi les populations majoritaires de cellules présentatrices cutanées de l'antigène, nous pouvons citer les **cellules de Langerhans** (LC) dans l'épiderme, les **cellules dendritiques conventionnelles** (cDC) ainsi que les **cellules dendritiques dermiques** (dDC) dans le derme, les **cellules dendritiques dérivées des monocytes** (mDC) et les **macrophages dermiques** (DM)¹¹⁶ (Yazdi et al. 2016).

a. Les cellules dendritiques

Au niveau de l'épiderme, les cellules dendritiques sont majoritairement représentées par les **cellules de Langerhans**¹¹⁷. Ces cellules migrent durant l'embryogénèse et nichent ensuite dans les couches supérieures de l'épiderme entre les kératinocytes. Ces cellules sont caractérisées par des organites spécifiques

¹¹⁶ Toutes ces cellules sont différenciables entre elles par marqueurs antigéniques de surfaces.

¹¹⁷ D'autres types de cellules dendritiques épidermiques existent, comme les cellules dendritiques épidermiques inflammatoires, trouvées chez les patients présentant une dermatite atopique.

appelés granules de Birbeck¹¹⁸. Ces cellules sont les premières à être en contact avec les antigènes microbiens. Elles sont capables de les internaliser puis de les présenter aux cellules T effectrices, en migrant vers les ganglions lymphatiques. Ces cellules semblent posséder divers rôles encore mal élucidés, allant de l'initiation de la réponse des lymphocytes T CD8 par une voie IL-15 dépendante, au contrôle de l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg), faisant de ces cellules des acteurs de l'homéostasie tissulaire (Seneschal et al. 2012; Pasparakis et al. 2014). Elles seraient par ailleurs impliquées dans la tolérance aux hypersensibilités de contact (Grabbe et al. 1995).

Les cDC ainsi que les dDC, retrouvées au niveau du derme, seraient les populations de cellules dendritiques majoritairement impliquées dans la présentation des antigènes vers les ganglions lymphatiques, où ils peuvent induire la tolérance des cellules T aussi bien que leur différenciation et leur maturation, selon le type de stimulus initial (Yazdi et al. 2016).

Enfin, la forme la plus mobile des cellules dendritiques qui se renouvelle sans cesse dans des conditions non pathogène est le mDC. Dans un tissu sain, ces cellules expriment de forts taux d'IL-10, et auraient donc un fort pouvoir immuno-modulateur (Yazdi et al. 2016).

Quelque soit le type de cellule dendritique, celle-ci doit exprimer trois composants majeurs pour activer les cellules T naïves : Les molécules du CMH¹¹⁹, le TCR¹²⁰ et les molécules de co-stimulations. Une fois l'interaction faite entre le complexe CMH-peptide-TCR, ces molécules de co-stimulation sont majoritairement responsables de la prolifération ou non des cellules T. La seconde tâche majeure des cellules dendritiques est de produire de très grande quantité de TNF, et, en partenariat avec les mastocytes, de contrôler le flux de polynucléaires neutrophiles (Biedermann et al. 2000; Yazdi et al. 2016).

¹¹⁸ Ces granules, typiquement en forme de raquette, seraient impliqués dans des mécanismes d'endocytoses

¹¹⁹ Complexe Majeur d'Histocompatibilité

¹²⁰ T Cell Receptor

b. Les macrophages

Les macrophages cutanés sont majoritairement des cellules peu mobiles mais peuvent tout de même migrer au niveau des ganglions lymphatiques lors de conditions inflammatoires (van Furth et al. 1985). Sur la base de leurs fonctionnalités, les macrophages cutanés sont divisés en trois grandes populations : les macrophages M1 possédant une activité pro-inflammatoire ; les macrophages M2 régulateurs ; et les macrophages réparateurs (Mosser and Edwards 2008). Les macrophages M1 sont caractérisés par leur capacité phagocytaire et leur forte expression de TNF, tandis que les macrophages M2 possèdent une activité angiogénique¹²¹ et anti-inflammatoire¹²². Les macrophages réparateurs auraient quant à eux la capacité d'activer la granulation du tissu cutané et l'épithélialisation (Pasparakis et al. 2014).

4. Les cellules T

Le tissu cutané possède en tout 2.10^{10} cellules T résidentes, ce qui est deux fois plus important que le nombre de cellules T circulant dans le sang. Ces cellules sont impliquées dans de nombreuses fonctions, allant de la réponse immunitaire contre les agents infectieux, aux allergènes et aux auto-antigènes. Cette grande diversité de fonctions implique une grande variété de phénotypes différents, dont la plupart sont des cellules T mémoire CD8+ $\alpha\beta$ (Bos et al. 1987) au niveau de l'épiderme, et des cellules T CD4+ et CD8+ au niveau du derme (Nestle et al. 2009). Pour ces cellules T, la vitamine D semble jouer un rôle particulier dans leur orientation via la surexpression du CCR10¹²³ (Sigmundsdottir and Butcher 2008). Lors d'un processus 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 de pathogènes, sont également présents dans la peau. Parmi les variétés les mieux décrites de lymphocytes auxiliaires, nous pouvons citer les cellules T CD4+ de types T_H1, T_H2, T_H9, T_H17 et T_H22. Des cellules T non conventionnelles, comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules NK¹²⁴,

¹²¹ Via la synthèse de VEGF

¹²² Via la production d'IL-10.

¹²³ C-C motif Receptor 10 est un récepteur aux cytokines CCL27 (IL-11) impliqué dans l'inflammation cutané

¹²⁴ Natural Killer

sont également présentes. Leur rôle serait d'être des cellules immunitaires sentinelles répondant aux stress des kératinocytes, et ainsi contrôler l'intégrité de ces cellules épithéliales, via la sécrétion de facteurs de croissance¹²⁵ (Toulon et al. 2009).

5. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules principalement associées aux phénomènes allergiques. Cependant, elles semblent posséder un rôle protecteur contre certaines infections bactériennes et parasitaires (Maurer et al. 2006; Siebenhaar et al. 2007; Metz et al. 2008). Leurs rôles immunitaires sont multiples, allant de la phagocytose des micro-organismes et de la synthèse de la cathélicidine, en passant par l'augmentation de la perméabilité capillaire et le recrutement de cellules immunitaires spécialisées, et enfin dans la présentation de l'antigène aux cellules T et la maturation des cellules dendritiques (Urb and Sheppard 2012).

C. Le microbiote cutané

Le microbiome¹²⁶ correspond aux génomes issus du microbiote, le terme de microbiote correspondant à la flore commensale résidente d'un tissu.

Historiquement, les analyses étant réalisées par des méthodes de cultures, le genre *Staphylococcus* et plus particulièrement *S. epidermidis* était décrit comme prépondérant. L'arrivée de nouvelles méthodes d'analyses, et en particulier le séquençage à haut débit (NGS¹²⁷), a révolutionné la vision que nous avons du microbiote. Celui-ci est composé de bactéries, de virus, de champignons et d'acariens (Blum 2017). De façon à simplifier la vision du microbiote cutané et de ses relations avec l'hôte, nous détaillerons ici principalement les espèces bactériennes, les autres micro-organismes n'étant pas en rapport direct avec nos études.

La colonisation initiale par les bactéries se fait chez le nouveau né et dépend directement du mode de délivrance. Les enfants nés par voie basse acquièrent les bactéries vaginales de leur mère, tandis que ceux nés par césarienne acquiert

¹²⁵ Comme le CTGF (Connective Tissue-GF), FGF9 (Fibroblast-GF9), KGF (Keratinocytes-GF) et IGF-1 (Insuline-like-GF1)

¹²⁶ Du Grec *micro*, petit et *bios*, la vie et du Sanskrit *Om*, la plénitude

¹²⁷ Next-Generation-Sequencing

principalement le microbiote cutané de la mère (Mueller et al. 2015). Le microbiote cutané va ensuite « éduquer » le système immunitaire. Lors de la puberté, ce microbiote va changer en profondeur, avec la disparition de certains taxons et la domination des bactéries lipophiles (Oh et al. 2012). Le microbiote est ensuite influencé par différents facteurs tels que le mode de vie, l'âge, l'alimentation, le système immunitaire de l'hôte ou encore l'utilisation d'antibiotiques (Dominguez-Bello et al. 2010; Capone et al. 2011; Oh et al. 2012; Schommer and Gallo 2013).

Le microbiote humain dépasse de 10 fois le nombre de cellules contenues dans le corps humain, et héberge un génome 100 fois plus grand que le nôtre¹²⁸. Il comprend plus de 40 000 espèces scindées en environ 1800 genres bactériens. Il n'existe en fait pas de microbiote humain mais **des microbiotes** selon les niches considérées, avec de très fortes disparités dans les genres rencontrés (Caporaso et al. 2011; Reid et al. 2011). Parmi les nombreux rôles connus du microbiome, nous pouvons citer la production de vitamines, d'acides aminés, la contribution pour environ 30% à notre métabolisme et un rôle de défense contre les agents infectieux (Dethlefsen et al. 2007). Il est maintenant admis que le microbiote possède une très grande variabilité inter-individuelle, mais également une stabilité relative dans le temps (Faust et al. 2012; Oh et al. 2016).

1. Composition du microbiote cutané

La composition du microbiote cutané est particulière, du fait des caractéristiques de la peau elle-même. La peau présente une température relativement faible et extrêmement variable d'une région à une autre comparativement au reste du corps humain. Ainsi, si la température moyenne des doigts de pied est d'environ 20-24°C, celle-ci grimpe vers 30-31°C au niveau du pli du coude pour atteindre 32-33°C au niveau de la face et enfin 35°C au niveau du front (Taylor et al. 2014). La peau est également un milieu acide (pH d'environ 5,5), pauvre en sucres¹²⁹ et exposée à l'environnement. Malgré ces caractéristiques communes, plusieurs niches peuvent être

¹²⁸ A ce jour, 3,3.10⁶ gènes non-redondants sont catalogués. Le ratio de 10 : 1 a été réévalué récemment à 1 : 1 dans une publication (Sender et al. 2016).

¹²⁹ Les principales sources nutritives de la peau sont représentées par les sécrétions corporelles, des acides aminés et quelques acides gras.

décrites, associées à des microbiotes uniques (Leeming et al. 1984). Ces zones sont généralement divisées en trois catégories : les zones humides, les zones sèches et les zones sébacées (Figure 20). En plus de cette limitation topographique, la composition phylogénique est, elle même, une conséquence de la limitation des sources nutritives disponibles à la surface ou dans les couches plus profondes de la peau (Figure 21) (Scharschmidt and Fischbach 2013). Enfin, il est désormais admis que les bactéries commensales cutanées sont aussi présentes dans des sites cutanés supposés stériles, comme le derme ou l'hypoderme (Nakatsuji et al. 2013).

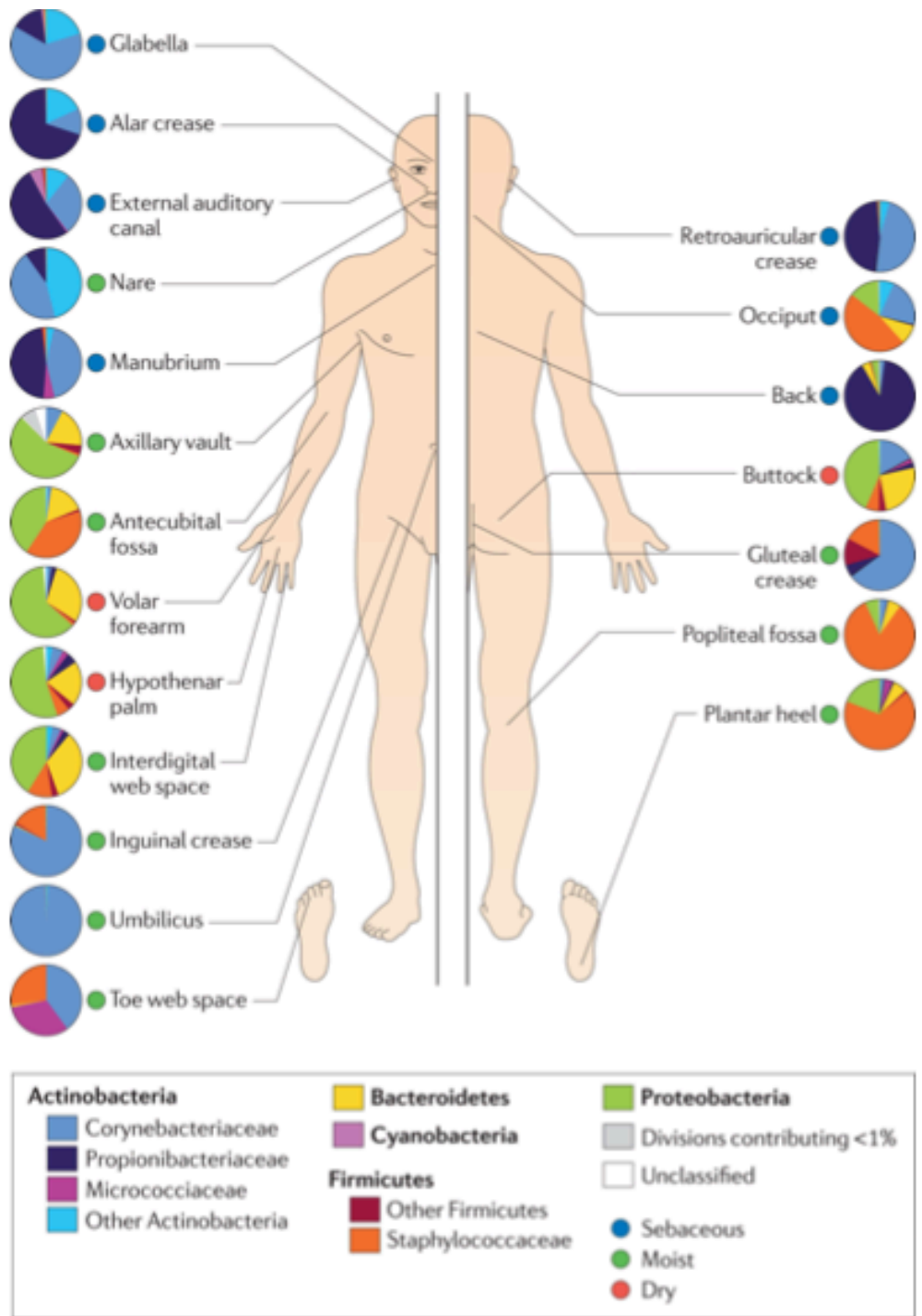


Figure 20 Distribution topographique des bactéries selon divers sites cutanés d'après (Grice and Segre 2011)

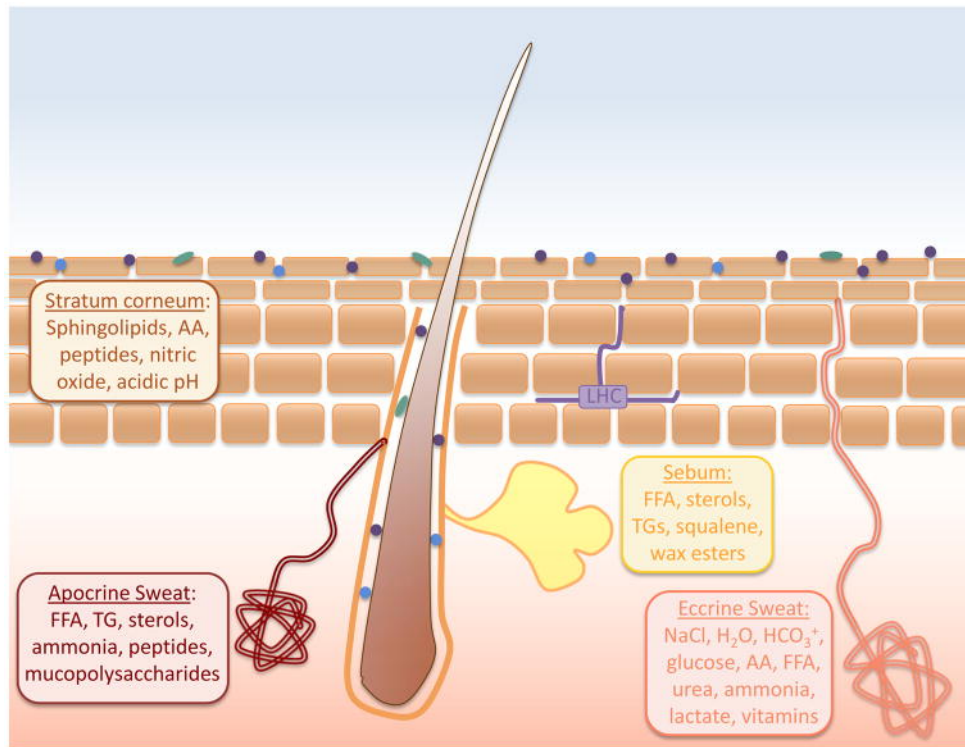


Figure 21 Sources principales de nutriments pour les bactéries sur le tissu cutané d'après (Scharschmidt and Fischbach 2013). AA : acides aminés ; FFA : Free fatty acid (acides gras libres) ; TG : Triglycérides

Les **zones humides** sont représentées par l'aîne, les creux axillaires ainsi que les doigts de pied. Ces zones, riches en glandes eccrines¹³⁰, sont impliquées dans la thermorégulation corporelle. Les glandes eccrines, par leurs sécrétions abondantes en eau et en électrolytes, contribuent à l'acidification de ces zones. Cette acidification cutanée prévient la multiplication de certains pathogènes, comme *S. aureus* ou *S. pyogenes*, tout en favorisant la multiplication de bactéries commensales, telles que les staphylocoques à coagulase négative ou les corynébactéries (Grice and Segre 2011). A l'intérieur même de ces zones humides, la présence de glandes apocrines¹³¹, produisant des sécrétions épaisses riches en cholestérol et en acides gras, permet à d'autres bactéries de se multiplier, formant alors de nouveaux microbiotes. Les genres bactériens prépondérants des zones humides sont les genres *Staphylococcus* et *Corynebacterium*.

¹³⁰ Les glandes eccrines, encore appelées glandes sudoripares, vivent enchâssées dans le derme. Elles produisent des sécrétions hypotoniques composées à 99% d'eau et d'électrolytes, comme le chlorure de sodium, mais également quelques acides organiques, majoritairement l'acide lactique.

¹³¹ Les glandes apocrines, ou faussement apocrines, en fait de type mérocrines, sont localisées uniquement dans les creux axillaires, autour des mamelons et la région génito-anale.

Les **zones sébacées** sont représentées par la glabelle¹³², le creux du nez, les canaux auditifs, l'occiput, le dos et le torse. Les glandes sébacées sont connectées aux follicules pileux, et sécrète une substance riche en lipides, appelé sébum. Le sébum forme une couche hydrophobe protégeant et lubrifiant la peau et les poils. Les glandes sébacées représentent une niche relativement anoxique¹³³, sélectionnant des espèces capables de vivre dans cet environnement particulier. Ces zones possèdent une très faible diversité bactérienne, avec comme genre prépondérant *Propionibacterium*, confirmant les études par cultures décrivant ce genre comme résident lipophile principal des zones pilo-sébacées.

Enfin, les **zones sèches** sont représentées par les fesses, les zones palmaires, les avant-bras et la jambe. Ces zones possèdent une quantité plus faible de bactéries que les autres zones, ainsi que des amplitudes thermiques plus importantes. Étonnamment, ces zones possèdent une très grande diversité bactérienne, avec la présence notable de bacilles à Gram négatif, que l'on pensait rarement présent sur la peau. Cette diversité est telle qu'elle égale celle retrouvée dans la bouche ou l'intestin pour un même individu (Costello et al. 2009).

2. Rôle du microbiote cutané sur l'immunité

L'abondance de bactéries au niveau cutané pose la question de leurs relations avec l'hôte colonisé. Pendant longtemps, il a été communément pensé que les germes commensaux exploitaient les ressources nutritives de l'hôte dans leur propre intérêt. Il est désormais admis que l'hôte bénéficie largement de cette colonisation dans la lutte contre les pathogènes. Cette protection passe par trois principaux mécanismes (Di Domizio et al. 2016) (Figure 22) : d'une part, les commensaux entrent en **compétition** avec les pathogènes pour les nutriments et l'espace disponible, et d'autre part, les commensaux peuvent produire directement des **bactériocines**, capables d'agir comme de véritables antibiotiques. Enfin, les germes commensaux **activent les cellules immunitaires cutanées**.

¹³² Espace de peau situé entre les deux yeux

¹³³ Pauvre en oxygène

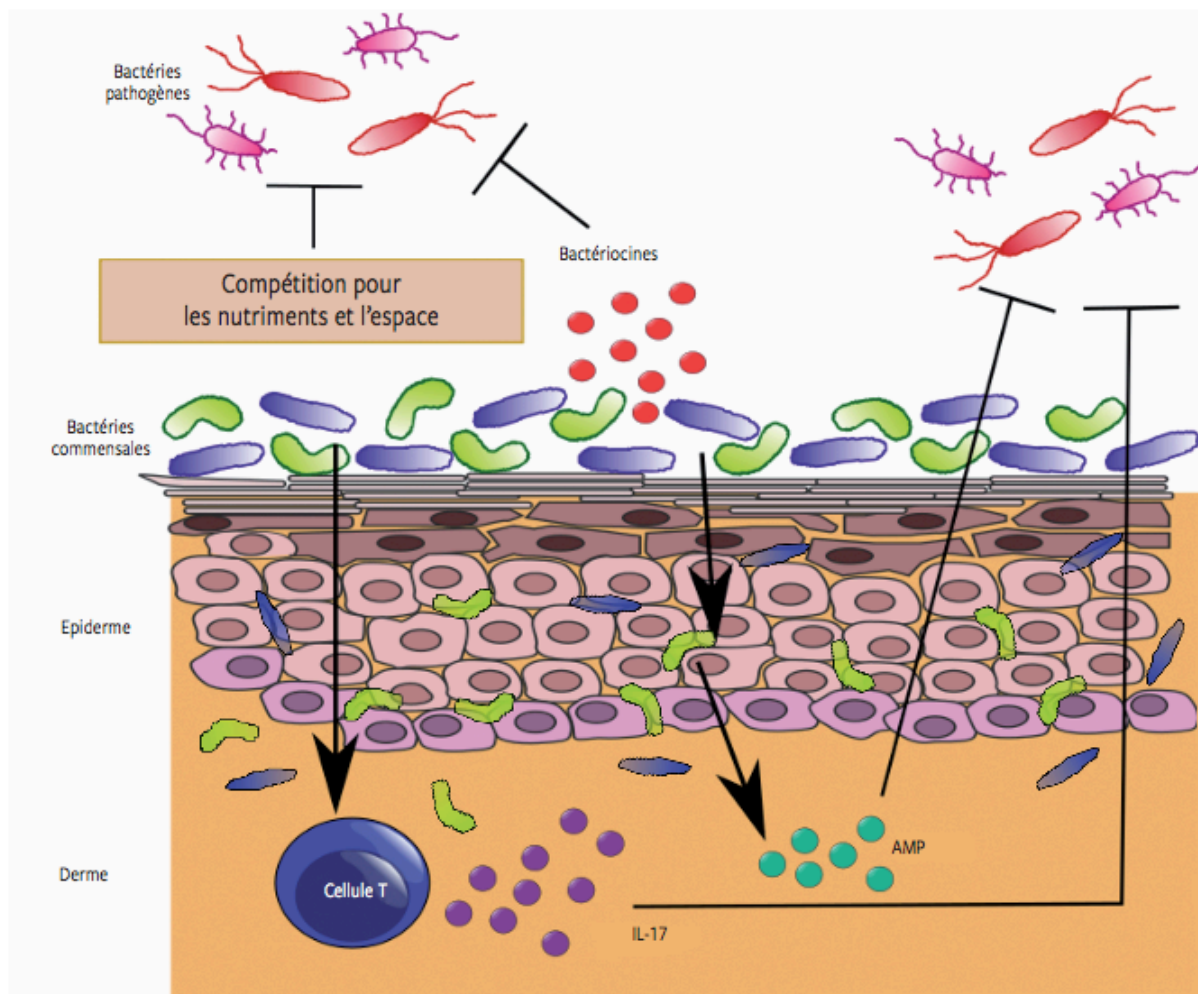


Figure 22 Mécanismes d'action de germes commensaux contre les bactéries pathogènes d'après (Di Domizio et al. 2016)

a. Bactériocines produites par les germes commensaux

Bien que certaines espèces de bactéries à Gram négatif soient capables de produire des bactériocines (Cladera-Olivera et al. 2004; Sassone-Corsi et al. 2016; Latham et al. 2017), la majorité des composés antibactériens retrouvés au niveau de la peau sont produits par les bactéries à Gram positif. Quelles que soient leurs provenances, ces bactériocines sont classées en 4 catégories selon leurs caractéristiques (Tableau 2).

Tableau 2 Classification des bactériocines d'après (Heng et al. 2007)

Classification	Caractéristiques	Sous-classes	Exemples
Classe I (lantibiotics)	Petits peptides < 5 kDa	Type A (linéaire)	Pep5, Epidermin, Nukacin ISK-1,
		Type B (sphérique)	Mersacidin,
		Type C (multiple)	Staphylococcin C55
		Iia (pediocin-like)	Pediocin PA-1
Classe II	Petits peptides <10 kDa	IIb (multiples)	Aureocin A-70, Lactacin F
		IIc (variés)	Aureocin A-53, Lactococcin A
Classe III	Longues, thermolabiles	IIIa (bacteriolysins)	Lysostaphine
		IIIb (non-lytiques)	Helveticin J
Classe IV	Cycliques		Enterocine AS-48

S. epidermidis, espèce dominante de la flore cutanée humaine, produit une large variété de bactériocines, encodées majoritairement sur des plasmides. Parmi les plus étudiés, nous pouvons citer l'Epidermine, Pep5 ou l'Epilancine K7 (Bastos et al. 2009). Ces peptides possèdent certains acides aminés particuliers, appelés lanthionine et/ou méthylanthionine, donnant à ces peptides antimicrobiens le nom de « lantibiotiques » (Gallo and Nakatsuji 2011). Ces amino-acides modifiés forment des structures cycliques, permettant la formation de pores dans les membranes bactériennes. Ce mécanisme d'action est très proche de celui observé avec les PAMs humains¹³⁴. En plus de ces peptides, *S. epidermidis* produit également des Modulines Solubles dans le Phénol (PSMs¹³⁵ des anglosaxons), et les PSM δ et PSM γ servent également de PAMs à la surface cutanée (Cogen et al. 2010). Leur structure est proche de la cathélicidine humaine LL-37, entraînant une action déstabilisatrice de la membrane bactérienne. Ces PSMs ont montré une action bactéricide contre des bactéries pathogènes comme *S. aureus*, *S. pyogenes* et *E. coli* (Gallo and Nakatsuji 2011). Cette action semble par ailleurs spécifique car ces molécules sont inactives contre *S. epidermidis*. La sérine protéase Esp sécrétée par *S. epidermidis* possède également une activité bactéricide et d'inhibition de la production de biofilm contre *S. aureus* lorsqu'elle est associée à hBD-2 (Iwase et al. 2010). Certaines souches de *S. epidermidis* produisent des thio-peptides, possédant un

¹³⁴ Cathélicidines et défensines (cf paragraphe dédié)

¹³⁵ Phenol-soluble modulins

pouvoir bactéricide en agissant sur la fonction ribosomiale¹³⁶ (Bennallack et al. 2014). Enfin, un peptide contenant une fonction thio-lactone est capable d'inhiber le système de quorum-sensing de *S. aureus agr*, inhibant ainsi la production par celui-ci de facteurs de virulence (Otto et al. 1999). Outre ces PAMs, des probiotiques impliqués dans l'élimination d'autres bactéries peuvent également être produits. Par exemple, *S. epidermidis* produit de l'acide succinique ainsi que des acides gras à chaînes courtes qui inhibent la croissance de *P. acnes in vitro* et *in vivo* (Wang et al. 2014).

P. acnes, espèce majoritaire des zones sébacées, produit également des peptides ayant une action bactéricide. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les enzymes protéolytiques, codé par un ensemble de gènes appelé le KPA génome¹³⁷ (Holland et al. 2010). Parmi ces enzymes, nous trouvons des muropeptidases, participant à la dégradation du peptidoglycane de *S. aureus* (Rau et al. 2001; Litzinger et al. 2010), et un lysozyme (Holland et al. 2010). Néanmoins, en plus de produire ses propres bactériocines, *P. acnes* semble surtout impliqué dans la surexpression des PAMs humains (Chronnell et al. 2001; Kim 2005; Nagy et al. 2005).

Bien d'autres bactéries composent le microbiote cutané et le faible nombre de bactériocines retrouvées chez celles-ci tient vraisemblablement plus du manque d'études s'y intéressant que de l'absence réelle de ces molécules.

b. Symbiose entre le microbiote cutané et le système immunitaire cutané (Figure 23)

Quand elle fonctionne de manière optimale, l'alliance microbiote-système immunitaire agit sur l'immunité innée et adaptative afin de préserver l'intégrité du tissu et/ou la réparation de celui-ci (Belkaid and Tamoutounour 2016).

Au niveau de l'immunité innée, les acides lipotéchoïques produits par *S. epidermidis* inhibent la réaction inflammatoire des kératinocytes via une voie TLR2-dépendante (Lai et al. 2009) et *P. acnes* permet la surexpression de PAMs par ces derniers (Nagy et al. 2005). Le microbiote agit également sur le complément (Chehoud et al. 2013) ainsi que sur le niveau d'expression de l'IL-1 α , initiateur de l'inflammation (Naik et al. 2012).

¹³⁶ Le mécanisme d'action est différent selon la taille du macrocycle. Ceux à 26 atomes se lient à la protéine ribosomiale L11 et à l'ARN23S, empêchant au facteur d'élongation de s'attacher. Ceux à 29 atomes se lie au facteur d'élongation Tu (EF-Tu anglosaxons).

¹³⁷ En référence à la souche de *P. acnes* KPA qui a servi de base à l'étude du sécrétome de celui-ci.

Le microbiote se présente comme modulateur du système immunitaire adaptatif (Di Domizio et al. 2016). La tolérance du système immunitaire vis-à-vis des germes commensaux, en particulier vis-à-vis de *S. epidermidis*, est dépendante des cellules T régulatrices (T_{reg}) et est acquise dès les premiers jours de vie (Scharschmidt et al. 2015). Cette tolérance se développe en absence complète d'inflammation locale et se définit comme une « homéostasie immunitaire » (Belkaid and Tamoutounour 2016). Cette régulation locale est médiée par la capacité du microbiote cutané à promouvoir la production d'IL-1 qui déclenche une production d'IL-17 et d'IFN γ par les cellules T (Naik et al. 2012). Cette production améliore la réponse immunitaire contre certains pathogènes comme *Leishmania major*¹³⁸ ou *Candida albicans*¹³⁹ (Naik et al. 2012, 2015). Le sécrétome¹⁴⁰ de *S. epidermidis* entraîne également une augmentation de la production d'IL-10 (anti-inflammatoire) par les cellules dendritiques dérivées des monocytes (Laborel-Préneron et al. 2015). Enfin, il semblerait que le dialogue entre les bactéries commensales et l'immunité cutanée soit germe-spécifique. Les cellules T résidentes spécifiques s'accumuleraient au cours des expositions répétées à de nouveaux commensaux ou à de nouveaux germes mutualistes (Belkaid and Tamoutounour 2016).

¹³⁸ Parasite flagellé, responsable de la Leishmaniose

¹³⁹ Levure commensale des muqueuses

¹⁴⁰ Ensemble des molécules sécrétées par la bactérie

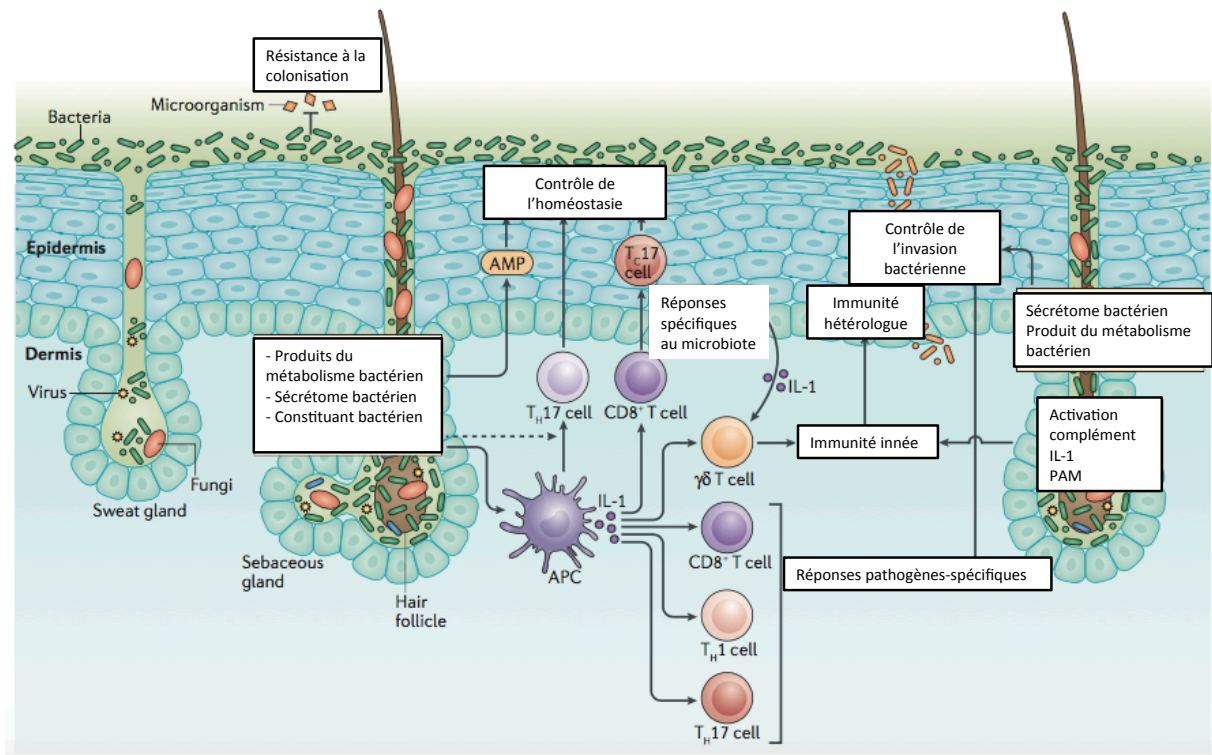


Figure 23 Composants cutanés et contrôle de l'immunité par les microorganismes commensaux d'après (Belkaid and Tamoutounour 2016)

III. Interactions peau et *Borrelia*

A. Interactions de *Borrelia* avec la peau de l'hôte vertébré

1 Les adhésines de *Borrelia*

La peau est un organe clef de la borréliose de Lyme. C'est à cet endroit que le pathogène, la tique et l'hôte, se rencontrent. Après injection de la bactérie dans la peau, celle-ci va se multiplier localement puis disséminer par voie hématogène vers ses organes cibles, dont la peau fait également partie (Kern et al. 2011). La bactérie entretient donc des liens étroits avec les cellules de l'hôte vertébré, en particulier grâce à la production de multiples adhésines (Tableau 3). Celles-ci peuvent être impliquées dans la phase précoce de l'infection par liaison aux molécules du complément de l'hôte, aux GAGs¹⁴¹, à la fibronectine, ou aux phases plus tardives, en permettant l'adhésion à la matrice extracellulaire de divers organes.

¹⁴¹ Glyco-Amino-Glycanes

Tableau 3 Activité *in vitro* et *in vivo* des adhésines de *Borrelia* (d'après Coburn et al. 2013)

Adhésines	Activité <i>in vitro</i>	Activité <i>in vivo</i>
Adhésion aux molécules du complément de l'hôte		
CRASP-1 (CspA)		
CRASP-2 (CspZ)	Liaison au facteur H et/ou au FHR-1 et/ou au FHL	
CRASP-3 (ErpP)	CspA se lie également aux collagènes, fibronectine,	Non déterminée
CRASP-4 (ErpC)	laminine, plasminogène	
CRASP-5 (ErpA)		
ErpA, ErpP, ErpC	Liaison au facteur H et/ou au FHR-1 et/ou au FHL	Mutants ErpA atténués chez la souris*
Adhésion à la matrice extracellulaire de l'hôte		
BBK32	Liaison au Fibrinogène, GAGs	Mutants atténués chez la souris* Rôle dans l'adhésion vasculaire
DbpA, DbpB	Liaison à la décorine, dermatane sulfate	Mutants atténués fortement à la phase précoce
Bgp	Liaison GAGs, activité nucléosidase	Mutants atténués chez la souris*
RevA	Liaison Fibrinogène	Mutants atténués chez la souris*
RevB	Liaison Fibrinogène	Faible atténuation chez la souris
BB0347	Liaison Fibrinogène prédite	Non déterminée
ErpX	Liaison Laminine	Non déterminée
Adhésion aux surfaces cellulaires		
P66	Liaison chaîne β 3 des intégrines	Essentielle dans l'infection chez la souris. Adhésion à l'endothélium
BBB07	Liaison chaîne β 1 des intégrines	Mutants atténués chez la souris
Adhésines candidates		
OspC	Liaison aux cellules de mammifères	Mutants avirulents. Adhésion à l'endothélium
VlsE	Liaison aux cellules de mammifères	Essentielle à la phase tardive de l'infection. Adhésion à l'endothélium
Lmp1	Non déterminée	Adhésion à l'endothélium
Famille Bmp	Non déterminée	Adhésion endothélium
Famille OspF	ErpK se lie aux cellules de mammifères	Adhésion à l'endothélium vasculaire

* mutants atténués : L'utilisation de souches mutantes déficitaires de ces gènes possèdent une virulence et/ou une dissémination diminuée par rapport à la souche native.

2. Relation avec le système immunitaire inné

Lorsqu'elle est injectée dans le sang par la tique, *Borrelia*, est sensible aux protéases produites par le système immunitaire (Kumru et al. 2011). Ainsi, la bactérie doit absolument produire des molécules immuno-modulatrices afin d'assurer sa survie chez l'hôte vertébré.

Activation/régulation du complément

Le système du complément est un composant important de l'immunité innée, capable de répondre en peu de temps à l'introduction d'un pathogène. Trois voies différentes existent : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. Chacune de ces voies peut être activée lors de l'infection par *Borrelia* (de Taeye et al. 2013). La voie classique est activée après liaison du facteur C1q à la surface du pathogène, déclenchant l'activation des facteurs C2 et C4. La voie des lectines est activée par liaison du MBL¹⁴² aux polysaccharides de surface de la bactérie et la voie alterne est activée par activation directe du facteur C3 par liaison à OspA et OspB (Garcia et al. 2005; de Taeye et al. 2013; Oosting et al. 2014). Les trois voies entraînent ensuite la formation des complexes C3 et C5-convertase, permettant la lyse bactérienne par le complexe d'attaque membranaire (Schuijt et al. 2011).

Les espèces de *Borrelia* diffèrent dans leur sensibilité au complément. La plupart des souches de *B. afzelii* sont résistantes à l'action du complément, tandis que la plupart des souches de *B. garinii* sont sensibles, et *B. burgdorferi* sensu stricto est généralement de sensibilité intermédiaire (Breitner-Ruddock et al. 1997; Van Dam et al. 1997; Kraiczy et al. 2001; de Taeye et al. 2013). Ces souches sont capables d'interférer avec les molécules du complément de manières différentes.

Les protéines de la famille des CRASP¹⁴³ (Tableau 1), sont capables de se lier au facteur H, au FHR-1¹⁴⁴ et au FHL¹⁴⁵, inhibant l'activation du complément¹⁴⁶ (Kraiczy et al. 2001; Siegel et al. 2010). CRASP-3, -4 et -5 (Hammerschmidt et al. 2012) et OspE (Kenedy and Akins 2011) sont également capables d'interférer avec l'activation du complément. *Borrelia* est également capable de se lier à la C4-binding-protein, un

¹⁴² Mannose binding lectin

¹⁴³ Complement regulator acquiring surface proteins

¹⁴⁴ Factor H related protein-1

¹⁴⁵ Factor H-like

¹⁴⁶ CRASP-1 et -2 confèrent une résistance à la lyse médiée par le complément (Kenedy et al. 2009)

inhibiteur du facteur C4b, empêchant la formation du complexe C4b2a (Pietikäinen et al. 2010). Enfin, *Borrelia* utilise à son avantage les protéines de la salive de la tique pour inhiber l'action du complément (Isac, Irac, Ixac, Salp20 par exemple) (Radolf et al. 2012a; Kazimírová and Stibrániová 2013; Simo et al. 2017).

Relation avec les PRRs

Plusieurs Pattern Recognition Receptors (PRRs) sont impliqués dans la reconnaissance de *Borrelia* et chaque PRR induit une réponse différente contre le spirochète (Figure 24).

Parmi les Toll-Like-Receptors (TLRs) impliqués, **TLR2** représente un récepteur clef dans la reconnaissance de la bactérie, par sa liaison aux lipopeptides (OspA, OspC par exemple) (Akira and Takeda 2004). Le blocage de TLR2 entraîne une abrogation de la réponse immunitaire induite par *Borrelia* sur les cellules humaines (Oosting et al. 2014). De plus, des variations dans le gène codant TLR2 semblent déclencher des symptomatologies cliniques d'intensité variable¹⁴⁷ (Wooten et al. 2002; Wang et al. 2008). TLR2 forme des hétérodimères avec TLR1, TLR6 et TLR8. Des mutations dans le gène codant TLR1 entraînent une diminution forte de la production de cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF- α) par les cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMCs des anglosaxons), tandis que des mutations dans le gène codant pour TLR6 n'affectent pas cette production (Oosting et al. 2011). L'expression de TLR6 est par ailleurs fortement diminuée après stimulation de monocytes humains par *Borrelia* (Salazar et al. 2009). TLR8 est un récepteur cytosolique, et l'hétérodimère TLR2/8 est requis pour la production d'IFN de type I chez la cellule mononuclée (Cervantes et al. 2011). Pour ce faire, la bactérie doit être phagocytée pour que ses ARNs soient reconnus par TLR8 (Cervantes et al. 2013).

TLR4 semble peu impliqué dans la reconnaissance du spirochète, mais son co-récepteur, CD14, est capable de reconnaître OspA (Cabral et al. 2006). Les souris déficientes en CD14 produisent plus de cytokines pro-inflammatoires après injection de *Borrelia* et développent des arthrites plus sévères et plus longues que les souris témoins (Sahay et al. 2009). Le CD14 activé est capable de réguler la production de cytokines comme IFN- γ et TNF- α , et diminue l'afflux de polynucléaires neutrophiles,

¹⁴⁷ Chez la souris TLR2-/-, les arthrites sont plus volumineuses et les épanchements plus importants

entraînant un nombre de bactéries plus important dans le liquide synovial (Sahay et al. 2011).

TLR5 reconnaît la flagelline, mais celle-ci, située au niveau du périplasme, est donc inaccessible à ce récepteur. Il ne joue pas de rôle important dans la pathologie (Radolf et al. 2012a).

Les rôles de TLR7 et TLR9 dans la borréliose de Lyme sont peu décrits à ce jour, mais ces récepteurs cytosoliques pourraient être impliqués dans la production d'IFN de type I (Petzke et al. 2009; Oosting et al. 2014).

Le rôle des Nod-Like-Receptors (**NLRs**) a été peu étudié dans la borréliose de Lyme. Il semble que NOD2 soit impliqué dans les arthrites, car les modèles murins NOD2-/- produisent moins de cytokines au niveau articulaires et cardiaques après exposition à *Borrelia* que les témoins (Petnicki-Ocwieja et al. 2011). Toutefois, les récepteurs NLRs, bien qu'impliqués dans la production d'IFN de type I, ne jouent pas de rôle majeurs dans le développement de l'inflammation déclenchée par *Borrelia* (Oosting et al. 2014).

De manière similaire, il semble que les C-Type-Lectin-Receptors (**CTLRs**) soient peu impliqués dans la réponse contre *Borrelia*. Bien que le spirochète n'exprime pas de beta-glucanes¹⁴⁸, il exprime certaines lectines comme le galactopyranoside, qui pourrait interagir avec ces récepteurs (Stübs et al. 2011). Le récepteur MR (Mannose-receptor), appartenant également à la famille des CTLRs, est capable de se lier avec *Borrelia*, mais son rôle est encore inconnu (Cinco et al. 2001).

Enfin, les récepteurs Rig-I-Like-Receptors (**RLRs**) n'ont pas encore été décrits comme impliqués dans la réponse anti-*Borrelia* de l'organisme.

¹⁴⁸ Les beta-glucanes sont les ligands de la dectine-1, membres importants des CTLRs

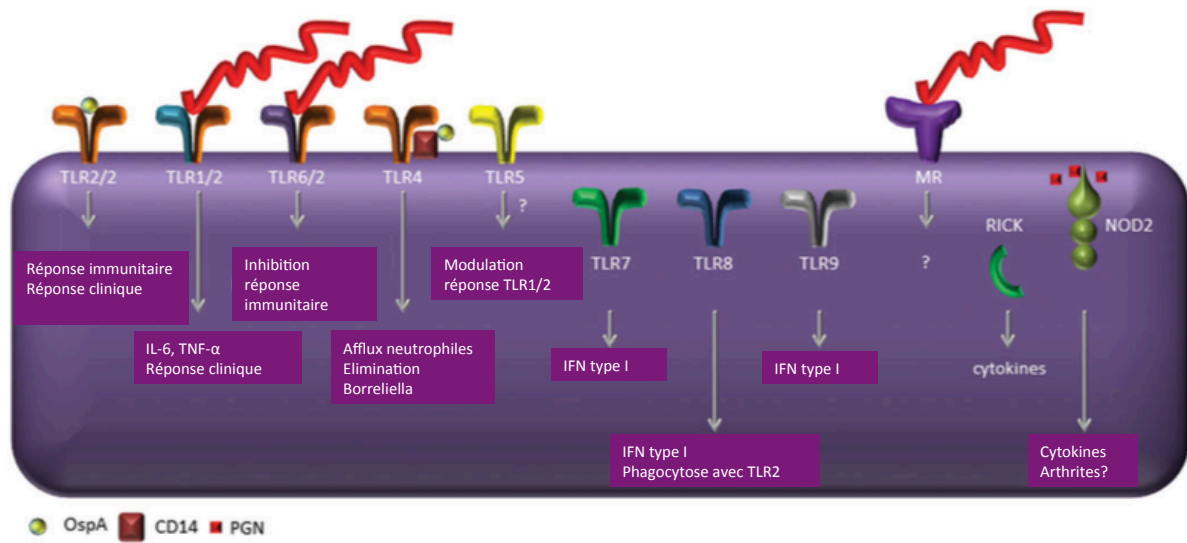


Figure 24 Reconnaissance et fonctions des Pattern Recognition Receptors dans la réponse anti-*Borrelia*. (d'après Oosting et al. 2014)

3. Relation avec les cellules immunitaires cutanées

Dès que *Borrelia* se retrouve au niveau de la peau, le système immunitaire répond rapidement à sa présence en activant de nombreuses cellules, notamment via la reconnaissance des protéines de surfaces de la bactérie par les PRRs. Cette réponse entraîne une inflammation locale, caractérisant la manifestation clinique type de la maladie, l'érythème migrant. Cela étant, le déclenchement de l'inflammation débute avant l'apparition de l'EM. Cette inflammation peut être au détriment ou au bénéfice de la bactérie. Après inoculation de la bactérie dans la peau de souris, diverses molécules telles que MCP-1, CXCL-1 ou le VEGF¹⁴⁹ sont surexprimées. L'augmentation du VEGF est dépendante de la présence de OspC et pourrait aider la bactérie à disséminer vers l'endothélium vasculaire en augmentant la perméabilité capillaire (Antonara et al. 2010). Enfin, différents types cellulaires présents dans la peau vont répondre à la présence de *Borrelia*.

Fibroblastes

Les fibroblastes vont répondre à la présence de *Borrelia* par la production de chimiokines (IL-8 et CXCL-1), de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) ou de métalloprotéases (MMP-1, -3, -9 et 12), probablement *via* l'activation de la voie NF- κ B (Ebnet et al. 1997; Zhao et al. 2007b; Schramm et al. 2012). La sécrétion de métalloprotéases pourrait aider la bactérie à disséminer, en dégradant la matrice extracellulaire. Dans les EM, la production de MMP-9 par les fibroblastes est sélectivement augmentée de 1900%, et cette surexpression implique celle du co-récepteur CD14 (Zhao et al. 2003, 2007a, 2007b). La bactérie est également capable d'adhérer, de pénétrer et d'envahir ces cellules par un mécanisme dépendant de la β 1 intégrine et la kinase Src (Klempner et al. 1993; Wu et al. 2011). Dans les fibroblastes de souris, l'attachement et l'entrée de *Borrelia* entraîne la formation de vacuoles, relarguées ensuite dans l'espace extracellulaire (Chmielewski and Tylewska-Wierzbanska 2010). Ces cellules pourraient également protéger la bactérie de l'activité de certains antibiotiques comme la ceftriaxone¹⁵⁰ (Georgilis et al. 1992).

¹⁴⁹ Vascular endothelial growth factor

¹⁵⁰ Données *in vitro*

Kératinocytes

Pendant la transmission de la bactérie par la tique, ces cellules sont dilacérées par ses pièces piqueuses. Les cellules vivantes attenantes à la blessure sont capables d'intervenir de manière active dans la réponse inflammatoire (Bernard et al. 2016). Elles vont sécréter de multiples cytokines (IL-8), chimiokines (MCP-1), métalloprotéases (MMP-9), ainsi que des peptides antimicrobiens (hBD-2 et hBD-3) (Gebbia et al. 2001; Marchal et al. 2011). Cependant, cette réponse inflammatoire, liée en partie à la reconnaissance d'OspC, est largement inhibée par la salive de la tique (Marchal et al. 2011). Cette inhibition par la salive pourrait aider la bactérie à disséminer en diminuant le chimiotactisme local.

Mastocytes

Les mastocytes sont bien représentés dans le tissu cutané. Leurs fonctions sont majoritairement associées aux événements allergiques. Néanmoins, quelques études ont exploré leur rôle dans les infections à *Borrelia*. Un grand nombre de mastocytes sont présents dans la peau de souris à la phase tardive de l'infection¹⁵¹ (Preac Mursic et al. 1990). Les *Borrelia* vivantes entraînent une dégranulation des mastocytes murins, libérant ainsi du TNF- α (Talkington and Nickell 1999) selon un mécanisme dépendant d'OspA et médié par la liaison au fragment Fc γ ¹⁵² (Talkington and Nickell 2001). Néanmoins, il n'a jamais été montré que ce phénomène existait chez les mastocytes humains ou sur un organisme entier. Enfin, les mastocytes pourraient jouer un rôle protecteur lors de nouvelles piqûres par le développement d'une hypersensibilité à la salive de la tique (Bernard et al. 2017).

Macrophages

Les macrophages sont des composants essentiels de la réponse immunitaire innée et sont présents dans divers tissus. Ils possèdent un rôle majeur dans l'élimination

¹⁵¹ à 6 mois post-infection pour cette étude

¹⁵² Les récepteurs Fc γ sont des récepteurs retrouvés sur la membrane de certaines cellules immunitaires capables de lier les anticorps

de *Borrelia*. Ils sont capables de phagocyter la bactérie via un mécanisme incluant le CR3-CD14 (Hawley et al. 2013). La phagocytose dépend également des formines¹⁵³ Daam1, mDia1 et FMNL-1, permettant la capture de la bactérie par la formation de filopodes (Naj et al. 2013; Hoffmann et al. 2014). Après la phagocytose, les macrophages sécrètent un large panel de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6) (Strle et al. 2009), de chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 et CXCL10) ainsi que des interférons de type I (Gautam et al. 2012). Cependant, lors de l'infection, *Borrelia* est capable d'entraîner une surexpression d'IL-10 qui supprime l'activation des macrophages murins (Lazarus et al. 2006, 2008). Cette surexpression d'IL-10 entraîne par ailleurs une inhibition de la phagocytose, de l'expression des médiateurs inflammatoires et de la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages (Chung et al. 2013). Le mécanisme est régi sur un mode autocrine, les macrophages produisant eux-mêmes une partie de l'IL-10 sécrétée.

Monocytes

Les monocytes sont rapidement recrutés après l'infection. Ils peuvent se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques, ou directement participer au processus inflammatoire (Swirski et al. 2009). La phagocytose de *Borrelia* peut se faire par les monocytes, entraînant la production de nombreuses molécules pro-inflammatoires, incluant le TNF- α , l'IL-6, IL-10, IL-18 et l'IL-1 β par un mécanisme impliquant le CD14 mais indépendant de TLR2 (Giambartolomei et al. 1999; Salazar et al. 2009). Parallèlement à cette synthèse, une production d'IFN a également lieu par activation de la voie TLR2/8-Myd88 après l'internalisation de la bactérie dans les phagolysosomes (Cervantes et al. 2011, 2013). L'activation de TLR2 entraîne une diminution de synthèse de TLR5, pouvant ainsi contribuer à un contrôle de l'inflammation, tout en étant bénéfique pour la bactérie (Cabral et al. 2006).

Borrelia induit également la production d'IL-22 mais pas d'IL-17 par les PBMCs incluant les monocytes via un mécanisme dépendant de l'IL-1 β et des caspases (Bachmann et al. 2010). Cette production d'IL-22 pourrait aider la bactérie à disséminer, cette molécule étant connue pour augmenter la perméabilité vasculaire et l'expression

¹⁵³ Les formines sont un groupe de molécules permettant la polymérisation de l'actine, entraînant la formation des filopodes

des métalloprotéases (Andoh et al. 2005; Kebir et al. 2007; Geboes et al. 2009; Mikami et al. 2009). Cependant, l'IL-22, spécialement en absence d'IL-17, est également connue pour ses propriétés anti-bactériennes et protectrices des tissus. Cette sécrétion pourrait alors ne pas favoriser le pathogène (Sonnenberg et al. 2010). Le manque de production d'IL-17 pourrait être responsable d'un recrutement insuffisant de polynucléaires neutrophiles et donc favoriser le pathogène. Enfin, la bactérie est capable d'induire l'apoptose des monocytes, ce qui pourrait là encore être bénéfique pour le pathogène, en lui permettant d'échapper au système immunitaire, mais également pour l'hôte, en limitant les dommages tissulaires liés à l'inflammation (Cruz et al. 2008).

Polynucléaires Neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont généralement les premières cellules attirées sur un site infectieux. Étonnamment, dans le cas de l'infection à *Borrelia*, la lésion contient peu de ces cellules (Salazar et al. 2003). Ceux-ci sont présents avec les polynucléaires basophiles et éosinophiles dès 6 heures après infection. Leur population va ensuite diminuer progressivement au profit des éosinophiles, puis la population cellulaire de l'infiltrat devient en majorité des monocytes-macrophages 16 heures après inoculation. Cependant, les polynucléaires neutrophiles semblent capables de contrôler l'infection lorsqu'ils sont stimulés¹⁵⁴ (Xu et al. 2007a). Ils sont capables de piéger les spirochètes par NETose¹⁵⁵. Cette formation de NETs ne serait pas affectée par la salive de la tique et est bactéricide pour les *Borrelia*, même si celles-ci pourraient survivre dans ces pièges en se transformant en « round bodies »¹⁵⁶ (Menten-Dedoyart et al. 2012). De plus, *Borrelia* est naturellement sensible à une large variété de composés produits par les neutrophiles, comme l'H₂O₂, l'élastase, ou la cathélicidine humaine LL-37¹⁵⁷ (Lusitani et al. 2002).

¹⁵⁴ Dans cette étude, une souche de *Borrelia* modifiée, synthétisant la chimiokine KC, attractive des neutrophiles, permettait un fort infiltrat à dominance de neutrophiles, et diminuait considérablement le taux d'infection.

¹⁵⁵ La NETose (Neutrophil Extracellular Trap), est une mort cellulaire par expulsion du contenu cytoplasmique et nucléaire, qui va piéger les bactéries.

¹⁵⁶ Les « round bodies » sont des images de *Borrelia* prenant une forme circulaire. Dans cette étude, les round-bodies étaient colorées comme cellules vivantes.

¹⁵⁷ Sur ce point, les diverses études ne sont pas en accord, certaines donnant *Borrelia* comme peu sensible à LL-37

A l'inverse de la production de NETs, les fonctions immunitaires des neutrophiles sont très affectées par la salive de tique. Celle-ci entraîne une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Menten-Dedoyart et al. 2012), ainsi qu'une diminution de la production des β 2-intégrines par les neutrophiles (Montgomery et al. 2004; Guo et al. 2009).

Borrelia possède également ses propres mécanismes d'échappement à l'action des neutrophiles. La lipoprotéine de surface OspB diminue la phagocytose de la bactérie par les neutrophiles, ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène. La bactérie est également capable d'inhiber le chimiotactisme spécifique des neutrophiles¹⁵⁸, par un mécanisme indépendant d'OspB (Hartiala et al. 2008).

Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont essentielles dans leur rôle de lien entre la réponse immunitaire innée et adaptative. Parmi celles-ci, les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques sont les plus abondantes dans les infiltrats post-infection à *Borrelia* (Hulinska et al. 1994; Salazar et al. 2003). Les DCs sont capables de reconnaître et de phagocyter les spirochètes, induisant l'activation des cellules T (Tel et al. 2010; Mason et al. 2014). Ces cellules sont sensibles à la présence du spirochète, qui possède sur elles un rôle chimio-attractant, via un mécanisme TLR2-dépendant (Mason et al. 2016).

Cependant, la bactérie a développé diverses stratégies de contrôle des DCs. Le spirochète entraîne la production par les DCs d'IDO¹⁵⁹, après reconnaissance par le TLR7, ainsi que la production d'interféron de type I et II. Cette production est associée à une tolérance immunitaire envers divers pathogènes¹⁶⁰, dont *Borrelia* (Love et al. 2015). La reconnaissance du spirochète par TLR2 présents sur les DCs n'entraîne pas l'induction de l'expression de CD38, habituelle dans la réponse aux bactéries à Gram négatif. Une faible expression du CD38, impliquée dans la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques, pourrait aider *Borrelia* à avoir un contrôle négatif sur le développement de la réponse adaptative (Hartiala et al. 2010). *Borrelia* atténue

¹⁵⁸ Voie FMLP (Formyl-Methionine-Leucine-phénylalanine). Ce peptide est le chimioattractant le plus puissant des neutrophiles.

¹⁵⁹ Indoleamine 2,3 dioxygénase

¹⁶⁰ *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium leprae*

l'expression des molécules du CMH de type II par les cellules de Langerhans, améliorant ainsi sa survie au stade précoce et tardif de la maladie (Silberer et al. 2000). Cette régulation négative pourrait être liée à la sécrétion d'IL-10 durant l'infection.

Ici encore, la salive de la tique joue un rôle important. Elle inhibe la maturation des DCs, la phagocytose et la production de cytokines¹⁶¹ (Slámová et al. 2011; Lieskovská and Kopecký 2012). La production de TNF- α serait diminuée par une inhibition des voies Erk1/2¹⁶², NF- κ B et Akt (Lieskovská and Kopecký 2012). L'inhibition de la sécrétion de TNF- α , mais aussi d'IL-6 et d'IL-12 serait également médiée par une protéine de la salive de la tique, Salp15, en se liant à DC-SIGN¹⁶³, ce qui active une cascade de réaction incluant la sérine/thréonine kinase Raf-1 (Hovius et al. 2008). La salive interfère avec les voies d'activation de l'IFN- β , via l'action de la Sialostatine L2, en diminuant la phosphorylation de la voie JAK/STAT, nécessaire à la production d'INF (Lieskovská and Kopecký 2012; Lieskovská et al. 2015). Enfin, il a été montré que les cellules de Langerhans dirigent la réponse des cellules T vers une réponse de type Th2 dans le contexte de la piqûre de tique. Ce mécanisme est médié par la prostaglandine E2, mais n'existerait qu'en absence de la bactérie, au moins chez les souris mâle utilisées dans cette étude (Vesely et al. 2009).

Lymphocytes T/B

In vivo, la participation des **lymphocytes T** dans la réponse immunitaire dirigée contre *Borrelia* a été démontrée dans plusieurs modèles expérimentaux murins (Pachner et al. 1991; Keane-Myers et al. 1995).

Chez l'Homme, la réactivité des lymphocytes T vis-à-vis d'antigènes de *Borrelia* a été mise en évidence, essentiellement dans les formes tardives de la maladie (Dattwyler et al. 1988; Yoshinari et al. 1991; Kalish et al. 2003). *Borrelia* est capable d'activer les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ (Knigge et al. 1996). La balance de polarisation des lymphocytes T CD4⁺ (balance Th1-Th2) sur l'évolution de la maladie est sujette à controverse. Chez l'homme, le contrôle de l'infection à *Borrelia* est essentiellement lié

¹⁶¹ IL-6 et TNF- α

¹⁶² Extracellular matrix-regulated kinase

¹⁶³ Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin également dénommée CD 209. Il s'agit d'un récepteur de type lectine-C

à une réponse de type **Th1** (Strle et al. 2017). Cependant, la synthèse d'IL-12¹⁶⁴, et une forte réponse de type Th1 ont été corrélées à une symptomatologie clinique plus sévère chez l'Homme (Gross et al. 1998; Widhe et al. 2004) et la souris (Matyniak and Reiner 1995; Anguita et al. 1996). Une réponse de type **Th2**, à l'inverse, serait protectrice et corrélée avec une évolution favorable de la maladie (Matyniak and Reiner 1995; Gross et al. 1998; Widhe et al. 2004). D'autres études ont trouvé un rôle protecteur de la réponse de type Th1 en favorisant la résolution de l'infection chez l'animal¹⁶⁵ (Bockenstedt et al. 2001) et l'homme (Sjowall et al. 2005), en particulier à la phase initiale de la pathologie (Sjowall et al. 2011).

Le rôle d'une réponse de type **Th17** est moins clair. Dans la phase précoce de la maladie (EM), une forte réponse en médiateurs Th1 et Th17¹⁶⁶ est retrouvée, suggérant un rôle bénéfique à ce stade (Strle et al. 2017). A la phase tardive de la maladie¹⁶⁷, la réponse de type Th17 est variable, mais fortement corrélée avec la présence d'autoanticorps contre les cellules endothéliales (ECGF¹⁶⁸), MMP-10 et l'ApoB100, chez les patients ayant une arthrite réfractaire aux antibiotiques (Strle et al. 2017).

Borrelia est également capable d'activer les cellules **NKT**, qui reconnaissent un diacyglycérol de la bactérie, présenté par les cellules présentatrices de l'antigène, via le CD1d¹⁶⁹ (Kinjo et al. 2006). Chez le modèle murin, les cellules NKT en collaboration avec les cellules de Küpffer, activent la clairance vasculaire de la bactérie, limitant ainsi la propagation de celle-ci (Lee et al. 2010). Les cellules NKT contribuent également à la limitation de la sévérité des atteintes articulaires (Tupin et al. 2008) et cardiaques (Olson et al. 2009). Dans les arthrites, la faible proportion de cellules iNKT¹⁷⁰ serait corrélée avec les phénotypes de résistance au traitement antibiotique (Katchar et al. 2013).

Le spirochète stimule une autre sous-population spécifique de ces lymphocytes, les **lymphocytes T $\gamma\delta$** . La stimulation de ces lymphocytes par *Borrelia* induit leur prolifération *in vitro* et *in vivo*, par un mécanisme dépendant de TLR-2 (Vincent et al.

¹⁶⁴ L'IL-12 est un fort inducteur de la réponse Th1

¹⁶⁵ Cardites à *Borrelia*

¹⁶⁶ La réponse Th17 était dans cette étude reliée à de fort taux en IL-23, IL-27, IL-25, IL-22, IL-17F, IL-21, et IL-17A

¹⁶⁷ Arthrite dans cette étude

¹⁶⁸ endothelial-cell-growth-factor

¹⁶⁹ Les cellules NKT ne reconnaissent pas de peptides présentés par les molécules du CMH, mais des antigènes lipidiques présentés par le CD1d.

¹⁷⁰ invariant Natural Killer T cells, aux propriétés immunomodulatrice

1996; Collins et al. 2008; Shi et al. 2011). La stimulation de ces lymphocytes induit la maturation des cellules dendritiques *in vitro* (Collins et al. 2005), et participent *in vivo* à l'élaboration d'une réponse immunitaire adaptative contre *Borrelia*, les souris déficientes en lymphocytes T $\gamma\delta$ ayant une expansion lymphocytaire et une production d'anticorps anti-*Borrelia* diminuée (Shi et al. 2011).

Enfin, *Borrelia* est capable d'activer les **lymphocytes B**, entraînant une forte production d'anticorps spécifiques. Néanmoins, cette réponse anticorps est d'efficacité faible, avec des anticorps à courte durée de vie (Elsner et al. 2015). Au cours de la pathologie, la réponse anticorps se fait de manière asynchrone et indépendante contre les diverses cibles antigéniques de *Borrelia*. Bien que les antigènes de *Borrelia* soient très immunogènes, les épitopes sont souvent inaccessibles sur les spirochètes intacts, expliquant en partie leur faible pouvoir protecteur¹⁷¹ (Jacek et al. 2016). Cette réponse immunitaire reste néanmoins essentielle pour le diagnostic biologique de la maladie, aux phases disséminées tardives.

L'ensemble des phénomènes intervenant dans la transmission de *Borrelia* dans la peau est résumé dans la figure 25.

¹⁷¹ Dans cette étude, les anticorps anti-VlsE étaient suivis au cours du temps. Une forte production d'anticorps avec des épitopes différents a été observée, mais aucune protection efficace n'était cependant produite.

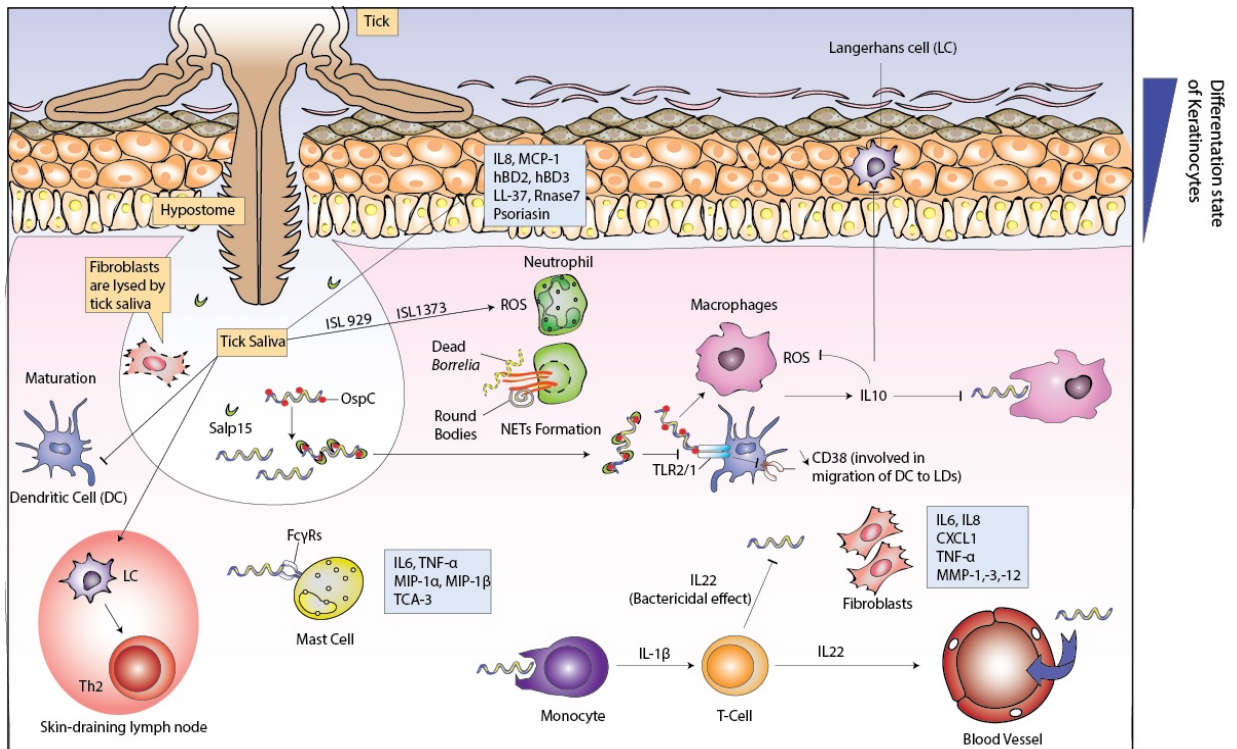


Figure 25 Relation hypothétique entre les cellules immunitaires et *Borrelia* lors de la transmission de *Borrelia* (crédit schéma Q. Bernard)

B. Mécanismes d'échappement immunitaire de *Borrelia*

Comme vu précédemment, la borréliose de Lyme peut se développer sur plusieurs années. La bactérie a donc dû développer différents systèmes pour éviter d'être détruite par le système immunitaire de l'hôte vertébré.

Les différentes stratégies de la bactérie pourraient être résumées de cette sorte (Berndtson 2013) :

- Exploitation de la salive de la tique comme immuno-modulateur de la réponse innée
- Masquage des antigènes inhibant les voies du complément
- Usurpation des voies d'activation du plasminogène de l'hôte
- Variation ininterrompue des antigènes de surface permettant l'échappement à la réponse anticorps
- Translocation rapide dans les tissus par ses capacités de mobilité unique
- Capacité d'adhésion lui permettant de s'ancrer dans des « niches immunitaires »
- Implication probable de la bactérie dans des systèmes de quorum-sensing
- Formation de formes atypiques en réponse aux conditions défavorables
- Invasion de cellules (fibroblastes) permettant de se « cacher » du système immunitaire

Présentation des travaux de Thèse

La borréliose de Lyme est une zoonose transmise à l'Homme par la piqûre d'une tique du genre *Ixodes* et causée par une bactérie appartenant au phylum des spirochètes et du genre *Borrelia*. Les réservoirs naturels de cette bactérie sont représentés principalement par des rongeurs et des oiseaux. Chez l'homme, hôte accidentel de la bactérie, de nombreuses formes cliniques de la maladie sont décrites: cutanées, neurologiques, articulaires et cardiaques. Certaines formes cliniques posent un véritable problème diagnostique et/ou thérapeutique. La bactérie pourrait être capable de rester à l'état latent en absence de traitement dans les tissus, expliquant ainsi des symptomatologies tardives.

La peau joue un rôle majeur dans les pathologies à transmission vectorielle et pourrait être un site de persistance de la bactérie de par son immunité particulière (Frischknecht 2007; Naik et al. 2012; Bernard et al. 2014). Les pathogènes vectorisés sont inoculés en même temps que la salive de l'arthropode aux propriétés pharmacologiques et immuno-modulatrices (Kazimírová and Stibrániová 2013). Plusieurs études ont ainsi montré la capacité de *Borrelia*, d'abord à se multiplier, puis à persister dans la peau tout en conservant sa viabilité (Liang et al. 2004a; Kern et al. 2015). La peau est enfin suspectée de jouer un rôle de filtre pour la bactérie en sélectionnant des clones virulents qui ensuite vont disséminer vers les organes cibles (Brisson et al. 2011; Rego et al. 2014).

Le travail de cette thèse a consisté à **étudier le rôle de la peau dans la persistance de *Borrelia*, à évaluer de nouvelles approches diagnostiques utilisant le tissu cutané** et à analyser les **relations entre *Borrelia* et le microbiote cutané**.

I. Etude de la latence cutanée de *B. burgdorferi* et impact sur la physiopathologie de la maladie

Afin de mettre en évidence ce phénomène de latence, nous avons établi un **modèle murin** de transmission de l'hôte infecté vers les tiques non infectées. Nous avons ainsi mis en évidence qu'après inoculation intradermique de *Borrelia burgdorferi* N40 à la seringue et développement de la maladie pendant environ 40 jours, les tiques naïves déposées sur ces souris infectées contractent le pathogène en moins de

8 heures en absence de bactériémie. Le prélèvement à J+40 des différents organes cibles (cœur, peau, articulations) étaient positifs en culture alors que le sang, positif juste après l'inoculation, restait négatif lors d'une réactivation. L'application topique d'un **dermocorticoïde** (clobetasol) pendant 48h, à la différence d'un repas sanguin de tiques, entraîne un **phénomène de réactivation locale** des bactéries, probablement lié à l'effet immunosuppresseur de la molécule. Nous avons ainsi observé une forte multiplication bactérienne cutanée au site de l'application. Ce résultat montre que les spirochètes persistent dans le tissu cutané, et que des changements locaux dans l'immunité cutanée peuvent amener la bactérie à s'y multiplier.

Pour approfondir le rôle de la peau dans ce processus de latence, nous avons ensuite inoculé des bactéries par voie **intrapéritonéale**, afin de confirmer le tropisme cutané de *Borrelia*, puis d'étudier la réactivation éventuelle de la bactérie après dissémination.

Toutes les biopsies de peau 40 jours après l'inoculation intrapéritonéale étaient positives en culture et en PCR, signe que le pathogène est capable de disséminer à partir de cette voie non naturelle, de manière identique à la voie intradermique, confirmant le tropisme de *Borrelia* pour le tissu cutané. De même que pour l'inoculation intradermique, les tiques naïves posées à J+40 sur ces souris infectées contractaient le pathogène rapidement (dès 8 heures), mais ce repas sanguin n'entraînait à nouveau aucune réactivation visible de la bactérie au niveau cutané.

L'application topique d'un dermocorticoïde pendant 48h entraîne là encore un phénomène de réactivation et nous avons observé une forte multiplication bactérienne cutanée. Cette réactivation, comme pour la voie intradermique, semble uniquement locale, car *Borrelia* n'est pas détectée dans le sang par culture pendant tout le temps de la réactivation.

Ces expérimentations nous ont permis de prouver (1) que *Borrelia* possède bien un **tropisme pour le tissu cutané**, (2) que les bactéries présentes dans la peau à J+40 sont viables et capables de se multiplier activement sous l'action d'un immunosuppresseur topique, et (3) que ces bactéries sont alors infectantes pour l'hôte invertébré. La peau est donc bien, sur modèle murin, un organe cible et un organe clef dans la latence de *Borrelia*.

Pour mieux comprendre ce phénomène de latence/réactivation, et tester de nouvelles techniques de mise en évidence des bactéries, nous avons ensuite cherché à

détecter dans la peau de souris infectées des protéines bactériennes d'intérêt, marquant la présence de *Borrelia* viables et métaboliquement actives dans les tissus. Pour cela, en collaboration avec l'IPHC de Cronenbourg (Pr. Laurence Sabatier), nous avons analysé des biopsies cutanées de souris à J+40 après infection disséminée par *B. burgdorferi* par protéomique non ciblée (**Ge-LC-MS-MS**: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse). Cela nous a permis d'identifier dans la peau 25 protéines de *Borrelia*. Quatre de ces protéines représentent des protéines majeures lors de l'infection de l'hôte vertébré et pourraient constituer des **candidats pour un diagnostic d'infection active chez des patients atteints de borréliose de Lyme disséminée**. Il s'agit de (i) La **flagelline**, protéine permettant la mobilité de la bactérie à travers les tissus infectés ; (ii) la **GAPDH**, protéine essentielle de la glycolyse ; (iii) **VlsE**, lipoprotéine impliquée dans la dissémination et le maintien de l'infection ; (iv) **DbpA**, protéine d'adhésion elle aussi impliquée dans la dissémination de la bactérie.

L'analyse par **SRM-MS** (technique de protéomique ciblée), nous a permis de quantifier nos protéines candidates (de 4 à 94 fmol/mg de peau) dans des peaux de souris infectées par *B. burgdorferi* ss, mais aussi infectées par *B. afzelii*, autre espèce bactérienne très présente en France et en Europe, et pour laquelle le rongeur est réservoir.

L'application de la détection de protéines en diagnostic précoce étant déjà établie par notre équipe et en cours de validation chez l'Homme, la détection de ces protéines pour un **diagnostic à la phase disséminée** de la maladie va être étudiée chez l'Homme. Cette méthode de diagnostic pourrait donc être universelle pour les différentes espèces responsables de la borréliose de Lyme, et à terme, pour la recherche d'autres pathogènes transmis par la piqûre de tique (bactéries, virus, parasites), et pour lesquels une persistance cutanée serait à démontrer.

II. Interaction entre le microbiome cutané et *B. burgdorferi* si dans la physiopathologie de la maladie

Les **bactéries commensales** de la peau ont été décrites comme jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire cutanée lors d'une blessure, dans l'éducation du système immunitaire cutané, dans la défense de l'hôte vis-à-vis de bactéries pathogènes et comme attractives par leur métabolome vis-à-vis de certains

arthropodes-vecteurs (Verhulst et al. 2011; Belkaid and Tamoutounour 2016; Di Domizio et al. 2016). *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* et *Corynebacterium striatum* font partie des espèces majeures de ce microbiote cutané (Grice and Segre 2011).

Chez l'hôte, les cellules résidentes cutanées, **kératinocytes et fibroblastes**, représentent la première ligne de défense et de détection des pathogènes. Ces cellules, via l'activation de récepteurs spécifiques, les Toll Like receptors (TLRs) notamment, sécrètent en réponse aux stimuli bactériens, des molécules pro-inflammatoires qui pourraient, dans le cas de la borréliose de Lyme, être soit facilitatrices soit inhibitrices de la multiplication locale et de la dissémination du spirochète.

En analysant les relations entre le **sécrétome** (ensemble des molécules sécrétées) de *S. epidermidis*, *P. acnes* et *C. striatum* et les kératinocytes/fibroblastes en présence ou non de *Borrelia*, nous avons montré que les différentes molécules contenues dans le sécrétome de ces bactéries commensales semblent posséder des activités variables sur l'inflammation.

Ces 3 différents sécrétomes bactériens entraînent, chez ces cellules résidentes du derme, une production importante d'IL-8, chimiokine responsable de l'attraction des polynucléaires neutrophiles, et la présence de *Borrelia* agit de manière **synergique** avec ces sécrétomes, en augmentant la production d'IL-8. Cette réponse inflammatoire serait en défaveur de la bactérie pathogène. Sur les kératinocytes, l'activité des différents sécrétomes s'est montrée variable sur la production d'autres molécules inflammatoires, comme hBD-2 et CXCL-1. Ainsi, si le sécrétome de *S. epidermidis* semble avoir un effet pro-inflammatoire discret, les sécrétomes de *P. acnes* et *C. striatum* inhibent fortement la production de ces deux molécules, et la présence de *Borrelia* augmente cet effet. Les voies moléculaires mises en jeu semblent donc différentes selon les bactéries commensales présentes au niveau cutané et pourraient avoir un effet facilitateur ou retardateur dans la transmission/dissémination du pathogène.

Une étude plus fine, en utilisant les fractions de ces différents sécrétomes est en cours. Les résultats préliminaires montrent qu'il existe bien plusieurs molécules responsables des diverses activités observées. L'identification de ces molécules et leur impact dans la transmission/dissémination du pathogène nous permettra de mieux comprendre les interactions entre *Borrelia* et le tissu cutané de l'hôte vertébré et pourrait permettre, à terme, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ces deux approches, l'une sur la persistance de *Borrelia* et l'autre sur le microbiome permettent de mieux appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires qui s'opèrent au niveau de la peau lors de cette maladie à transmission vectorielle.

Résultats

Les résultats sont présentés sous formes d'articles

Etude de la latence cutanée de *Borrelia* et impact sur la physiopathologie de la maladie

Identification of *Borrelia* protein candidates in mouse skin for potential diagnosis of disseminated Lyme borreliosis

Antoine Grillon¹, Benoît Westermann², Paola Cantero², Laurence Ehret-Sabatier², Benoît Jaulhac¹, Maarten J. Voordouw³, Delphine Kapps¹, Elody Collin¹, Cathy Barthel¹, Nathalie Boulanger^{1*}

¹ EA7290, Virulence bactérienne précoce, groupe Borréliose de Lyme, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France.

² Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

³ Laboratory of Ecology and Evolution of Parasites, Institute of Biology, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland.

Article accepté dans Scientific Reports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of *Borrelia* protein candidates in mouse skin for potential diagnosis of disseminated Lyme borreliosis

Received: 26 June 2017

Accepted: 16 November 2017

Antoine Grillon¹, Benoît Westermann², Paola Cantero², Benoît Jaulhac¹, Maarten J. Voordouw³, Delphine Kapps¹, Elody Collin¹, Cathy Barthel¹, Laurence Ehret-Sabatier² & Nathalie Boulanger¹

In vector-borne diseases, the skin plays an essential role in the transmission of vector-borne pathogens between the vertebrate host and blood-feeding arthropods and in pathogen persistence. *Borrelia burgdorferi sensu lato* is a tick-borne bacterium that causes Lyme borreliosis (LB) in humans. This pathogen may establish a long-lasting infection in its natural vertebrate host where it can persist in the skin and some other organs. Using a mouse model, we demonstrate that *Borrelia* targets the skin regardless of the route of inoculation, and can persist there at low densities that are difficult to detect via qPCR, but that were infective for blood-feeding ticks. Application of immunosuppressive dermocorticoids at 40 days post-infection (PI) significantly enhanced the *Borrelia* population size in the mouse skin. We used non-targeted (Ge-LC-MS/MS) and targeted (SRM-MS) proteomics to detect several *Borrelia*-specific proteins in the mouse skin at 40 days PI. Detected *Borrelia* proteins included flagellin, VlsE and GAPDH. An important problem in LB is the lack of diagnosis methods capable of detecting active infection in humans suffering from disseminated LB. The identification of *Borrelia* proteins in skin biopsies may provide new approaches for assessing active infection in disseminated manifestations.

Lyme borreliosis (LB) is the most common vector-borne disease in the Northern Hemisphere¹. The spirochete bacteria that cause LB, *Borrelia burgdorferi sensu lato* (sl), are transmitted by hard ticks belonging to the genus *Ixodes*². In Europe, the three most frequent LB pathogens are *B. burgdorferi sensu stricto* (ss), *B. afzelii* and *B. garinii*. In North America, *B. burgdorferi sensu stricto* causes the vast majority of Lyme disease cases with just a few cases caused by *B. mayonii*³. *Ixodes* ticks have three blood-feeding stages: larva, nymph, and adult. The larval and nymph ticks acquire *Borrelia* pathogens from infected hosts and subsequently develop into infected nymphs and female respectively, that transmit the pathogen to naive hosts the following year⁴.

The skin of the vertebrate host plays a critical role in the biology of LB. *Ixodes* ticks use their mouthparts to cut through the skin of their vertebrate host, and blood feeding can take 3 to 10 days depending on the stage⁵. During the blood meal, *Borreliae* migrate from the tick midgut to the tick salivary glands⁶ and are inoculated with the tick saliva into the skin of the vertebrate host⁷. At the site of the tick bite, *Borrelia* pathogens multiply in the skin with a peak abundance at 5 to 15 days^{8,9}. They subsequently migrate through the extracellular matrix, enter capillaries, and disseminate to distant tissues¹⁰. In competent reservoir hosts, *Borrelia* pathogens establish a chronic infection in the skin and other organs such as the heart, bladder, and joints¹¹. A study on the kinetics of infection with *B. burgdorferi* ss in laboratory mice showed that live spirochetes can be cultured from mouse skin up to one year post-infection¹¹. Transmission of *Borrelia* from infected rodent hosts to feeding *Ixodes* ticks is highly efficient over the duration of the infection^{12,13}. Studies on *B. afzelii* in wild and laboratory rodents have shown that the spirochete density in the skin determines the success of host-to-tick transmission^{14–16}. Taken together, these

¹EA7290, Virulence bactérienne précoce, groupe Borréliose de Lyme, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, F-67000, Strasbourg, France. ²Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000, Strasbourg, France. ³Laboratory of Ecology and Evolution of Parasites, Institute of Biology, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland. Antoine Grillon, Benoît Westermann, Laurence Ehret-Sabatier and Nathalie Boulanger contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.B. (email: nboulanger@unistra.fr)

Inoculation route	Mouse organ tested				
	Blood	Heart	Joint	Ear skin	Serology
Intradermal	0% (0/13)	62% (8/13)	92% (12/13)	92% (12/13)	100% (13/13)
Intraperitoneal	0% (0/9)	66% (6/9)	100% (9/9)	100% (9/9)	100% (9/9)

Table 1. *Borrelia burgdorferi* ss N40 is present in organs but not in blood of C3H/HeN mice at 40 days after intradermal or intraperitoneal inoculation. *Borrelia* spirochetes were detected by culturing sub-samples of tissue biopsies in BSK media. Tissue biopsies that tested negative using the culture method were re-tested using qPCR.

observations suggest that the skin of the vertebrate reservoir host plays a critical role in receiving, hosting, and transmitting the *Borrelia* pathogens.

The skin also plays an important role in human LB. The migration of the spirochetes through the human skin is believed to cause the most reliable diagnostic symptom of early LB, the erythema migrans, which is typically an expanding rash that occurs shortly after the infected tick bite¹. Patients with late LB can suffer from a skin disorder known as acrodermatitis chronica atrophicans. Other symptoms of disseminated LB include arthritis, and neurological problems¹. There is currently much interest in the processes that occur in disseminated and late LB and in the mechanisms that allow the spirochetes to persist or not in the vertebrate host¹⁷. In this context, the role of the skin in the physiopathology of LB remains poorly investigated. Moreover, little is known about how *Borreliae* are acquired by naïve ticks. Spirochetes present in the host skin are either passively acquired during the tick blood meal or they actively migrate to the tick mouthparts in response to chemo-attractants^{18,19}.

To better understand the role of the skin and of tick saliva in LB and more specifically in disseminated infections, we inoculated *Borrelia* in laboratory mice by three different routes: (1) intradermal syringe inoculation, (2) intraperitoneal syringe inoculation, and (3) infected ticks. We studied whether feeding the mice by naïve ticks and the immunosuppressive effects of tick saliva enhanced the abundance of spirochetes in the host skin. To also demonstrate the presence of live *Borreliae* in the skin, we applied an immunosuppressive dermocorticoid. This approach allowed us to detect an increase in the number of bacteria in the skin as shown by qPCR. To identify bacterial proteins in the mouse skin, we conducted a proteomic analysis using gel electrophoresis followed by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (Ge-LC-MS/MS). We have recently shown that this method is efficient at detecting *Borrelia* in mouse skin shortly after tick-to-host transmission²⁰. Detection of *Borrelia* proteins in the skin is of great interest as a potential diagnostic tool of active infection in patients with disseminated and late LB.

The diagnosis of LB is often difficult, especially at the late stages of the disease, due to the variety of clinical symptoms. Currently available diagnostic tests include serology and detection of spirochetes in tissue biopsies using PCR and/or culture²¹. Limitations exist for both of these diagnostic approaches. The sensitivity of serological methods ranges from 50 to 99% depending on the stage of the disease²². Furthermore, serology can indicate exposure to the pathogen but cannot prove the existence of an active infection. With respect to tissue biopsies in late LB, the sensitivity of the PCR can vary greatly depending on the type of tissue. For example, in European patients with untreated Lyme borreliosis, the sensitivity of PCR is high for ACA (50–70%) and synovial fluid (50%) and much lower in cerebrospinal fluid (15–30%) and rarely positive in serum²³. New diagnostic approaches are therefore required to prove active infection in individuals with late or chronic LB. One promising diagnostic method is selected reaction monitoring mass spectrometry (SRM-MS). This mass spectrometry-based technique is highly efficient for biomarker identification and validation in a diversity of biological fluids such as blood, plasma, and urine^{24–31}. As the skin is an organ where *Borrelia* persists in mice³² and dogs³³, we used a mouse model to test skin tissue to identify *Borrelia* proteins as markers of disseminated infection. These proteins could be potential candidates for the diagnosis of disseminated and late LB in humans.

Results

***B. burgdorferi* ss N40 disseminates and infects the mouse skin regardless of the mode of inoculation.** To demonstrate the role of the skin as a homing and persistence organ for *Borrelia* pathogens in disseminated infections, mice were infected with *B. burgdorferi* ss strain N40 using two inoculation routes: intradermal and intraperitoneal. We selected the time point of 40 days post-infection (PI), because previous works have shown that all distant organs are positive at day 15 PI^{11,34}. Different mouse tissues (blood, heart, joints, and ear for distant skin) were tested for the presence of *Borrelia* using culture. All tissue biopsies that gave spirochete-negative cultures were re-tested using PCR targeting the *flagellin* gene (Table 1). In the disseminated phase of the disease (40 days PI), the heart, joints, and ears were the sites of spirochete persistence, whereas the blood cultures were negative (Table 1). The results were the same regardless of the route of inoculation ($p > 0.05$). Interestingly, despite being bypassed by the intraperitoneal inoculation, the ear skin was strongly positive for *Borrelia* after dissemination. This result demonstrates that strain N40 of *B. burgdorferi* ss establishes a persistent infection in the skin after its dissemination to the distant organs in our C3H/HeN mouse model as shown previously¹¹.

Live *Borrelia burgdorferi* ss N40 can achieve transmission from the mouse skin to naïve *Ixodes ricinus* nymphs during disseminated infection. To demonstrate the ability of persistent bacteria in the skin to infect ticks, we fed naïve *I. ricinus* nymphs on mice previously infected via intradermal or intraperitoneal inoculation with *B. burgdorferi* ss strain N40. Interestingly, mouse-to-tick transmission of the bacteria occurred as early as 5–8 hours following nymphal infestation (Table 2). For the mice in the intradermal group, nymphs acquired *B. burgdorferi* ss strain N40 at high efficiency (80.0%) at 8 hours following attachment (Table 2). In

Time of feeding duration	Intradermal		Intraperitoneal	
	Infected ticks/total ticks (%)	Number of mice	Infected ticks/total ticks (%)	Number of mice
5 h	2/9 (22.2)	4 [0–3]*	0/12 (0.0)	5 [1–5]*
8 h	12/15 (80.0)	7 [0–3]	1/16 (6.3)	4 [2–5]
24 h	13/18 (72.2)	7 [1–3]	1/16 (6.3)	5 [2–5]
3 d	14/28 (50.0)	9 [1–3]	1/21 (50.0)	7 [2–5]
5 d	11/11 (100.0)	4 [2–3]	7/10 (70.0)	5 [1–4]
7 d	6/7 (85.7)	4 [1–3]	5/7 (71.4)	5 [1–3]

Table 2. The percentage of *Ixodes ricinus* nymphs that acquired *Borrelia burgdorferi* ss N40 increases over the duration of tick feeding on infected mice. Mice had been infected 40 days before the nymphal infestation via either intradermal or intraperitoneal inoculation. *In brackets, number of ticks attached on mice or, fed and detached from mice.

contrast, for the mice in the intraperitoneal group, nymphs acquired strain N40 at high efficiency (70.0%) at 5 days following attachment (Table 2). These data suggest that efficient mouse-to-tick transmission occurred much earlier when the spirochetes were inoculated directly into the skin.

Reactivation of *B. burgdorferi* ss N40 in the mouse skin by tick blood feeding. The number of bacteria in the skin did not significantly increase after tick feeding at the site of the tick bite in the back of the mouse (Fig. 1A,B), regardless of the route of inoculation. The blood remained spirochete-free during the blood meal of the uninfected nymphs. This observation suggests that feeding by *I. ricinus* nymphs on the mice did not reactivate growth of *B. burgdorferi* ss strain N40 in the skin or the distant organs: heart, joint and ear skin. This result also suggests that the naïve nymphs acquired the spirochetes exclusively from the skin and not from the blood (Fig. 1C,D). The low resident spirochete load was sufficient to ensure efficient transmission to naïve ticks.

Reactivation of *Borrelia burgdorferi* ss N40 in mouse skin after dermocorticoid application. Corticosteroids administered orally can suppress the immune system and boost *Borrelia* infection³³. To induce local immunosuppression and demonstrate that *B. burgdorferi* ss N40 can thus multiply in the mouse skin, we applied the dermocorticoid clobetasol to the mouse skin. The clobetasol treatment reactivated spirochete growth and increased the spirochete load in the mouse skin (Fig. 2A,B). In the intradermal group, spirochete load increased significantly at day 3 after the clobetasol treatment, spirochete abundance peaked at day 5, and then decreased to undetectable levels at day 7 (Fig. 2A). A similar pattern was observed in the intraperitoneal group (Fig. 2B). Reactivation was higher in the intraperitoneal group than the intradermal group at day 5 ($p = 0.009$). The dermocorticoid reactivated the *Borrelia* population in the skin, but the blood remained spirochete-negative in the intradermal group and mostly negative in the intraperitoneal group (Fig. 2C,D). Moreover, of the 81 mouse skin samples tested by PCR ($n = 45$ for intradermal and $n = 36$ for intraperitoneal), 92.6% (75/81) had live spirochetes in BSK culture. Altogether, these results demonstrate that after dissemination to distant organs, live *Borrelia* spirochetes persist in the skin of mice and can be reactivated locally by a dermocorticoid.

Identification of *Borrelia burgdorferi* ss N40 proteins in mouse skin by Ge-LC/MS-MS during disseminated infection after intraperitoneal inoculation. We have shown previously that Ge-LC-MS/MS is an efficient approach to identify *Borrelia* proteins in the skin of infected mice shortly after spirochete transmission and during the peak of spirochete multiplication at day 7²⁰. In mice infected intradermally with *B. burgdorferi* ss N40 and not treated with clobetasol, the spirochete density was very low in the skin (≤ 2 flagellin/ 10^4 gapdh) after disseminated infection. Flagellin was the only *Borrelia* protein identified by Ge-LC/MS-MS with confidence in one of five mice analyzed (data not shown).

To analyze proteins present in the skin of the mice, we selected a sub-sample of six mice for which the density of spirochetes in the skin was high (90 to 259 *fla*/ 10^4 *gapdh*). These mice had been inoculated via the intraperitoneal route and treated with clobetasol at 40 days PI to reactivate the *Borrelia* infection in the mouse skin. As expected, we identified mostly mouse proteins (3077 to 3761 different mouse proteins). However, we also detected up to eight *Borrelia* proteins including flagellin, VlsE cassette 2, VlsE cassette 13, DbpA, GAPDH and hypothetical protein BbuN40_0563 (Table 3). *Borrelia* proteins were more likely to be found in mouse tissue samples with high spirochete loads (as estimated by the *fla* qPCR). For example, seven *Borrelia* proteins were detected in the skin of mouse 6, which had the highest spirochete density in this sub-sample (259 *fla*/ 10^4 *gapdh*).

Identification of *Borrelia* proteins in mouse skin during disseminated infection after intradermal inoculation by Ge-LC/MS-MS. In the natural life cycle, *Borrelia* is inoculated into the dermis by the tick mouthparts, which cut the host skin. Intradermal inoculation more closely resembles an infected tick bite than intraperitoneal inoculation. We therefore used the intradermal route to infect mice with strains of the three most common LB pathogens in humans: *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* and *B. garinii*. After clobetasol reactivation, we excised the skin surrounding the inoculation site and estimated the spirochete load using qPCR (between 14 and 24 mice were tested for each *Borrelia* species; Table S1 in the supplementary data). The species that multiplied most efficiently in the mouse skin after clobetasol treatment was *B. afzelii* (Table 4 and Table S1 in the supplementary data). Before clobetasol application, the PCR data range between 1.63 and 4.44 (Data not shown). For proteomic studies, we selected the mouse skin biopsies with the highest spirochete loads and some with lower

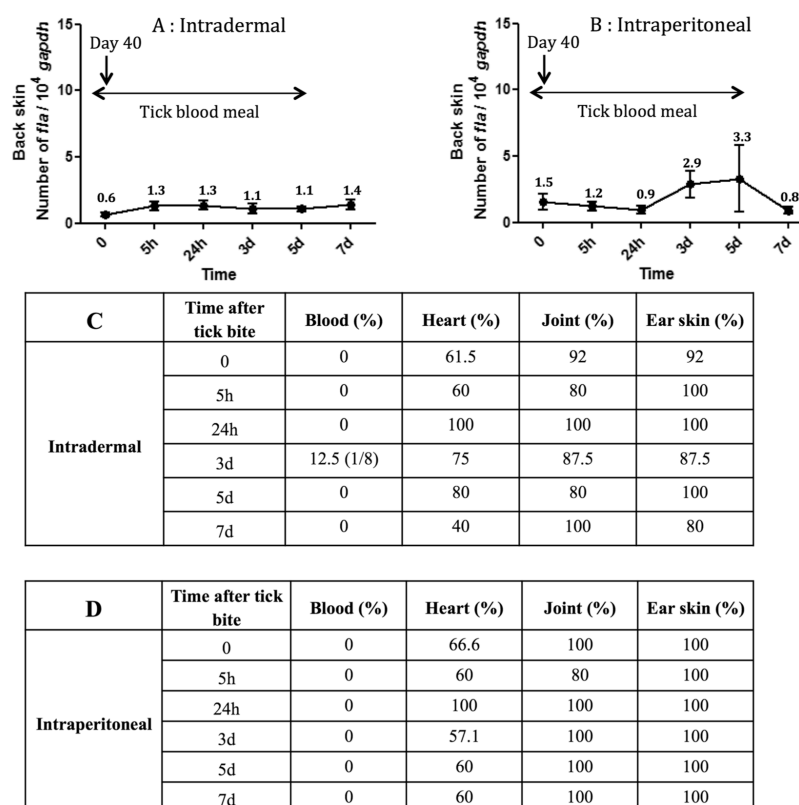


Figure 1. Feeding of uninfected *Ixodes ricinus* nymphs on chronically infected mice does not affect the *Borrelia burgdorferi* spirochete load in the mouse skin surrounding the tick feeding lesion. Mice were infected with *Borrelia burgdorferi* ss strain N40 via (A) intradermal or (B) intraperitoneal inoculation. At 40 days post-infection, the mice were infested with 5 to 10 uninfected *I. ricinus* nymphs. At different time points during nymphal attachment (5 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d), the mice were sacrificed and the mouse skin surrounding the tick feeding lesions was excised. The *Borrelia* load in the mouse skin was estimated using qPCR. Different mouse organs were tested by culture for seven days to determine the presence of *Borrelia*. Tissue biopsies that yield spirochete-negative cultures were retested using qPCR. The blood remained spirochete-negative over the duration of the tick blood meal, with the exception of one mouse at day 3 that had been inoculated intradermally.

spirochete loads (Table 4). We detected more than 3000 mouse proteins and 3 *Borrelia* proteins: VlsE, flagellin and GAPDH. Compared to *B. afzelii*, the two other *Borrelia* species multiplied less efficiently in the mouse skin.

Identification of *Borrelia afzelii* proteins in mouse skin after infectious tick bite. We have previously shown that infected nymphs inoculate a very small number of spirochetes into the rodent host during the blood meal⁹. Since *B. afzelii* multiplies more efficiently than the two other *Borrelia* species, we used this species to analyse *Borrelia* proteins present in the mouse skin after a tick bite. We infected mice with 10 *B. afzelii*-infected *I. ricinus* nymphs (mean of 80% of infected nymphs) and *Borreliae* were reactivated with clobetasol at 40 days post-infection to ensure an efficient detection of bacterial proteins in the skin. After PCR quantification, the 4 mice presented a very high density of *fla**gapdh*. The detection of a panel of *Borrelia* proteins in the skin samples of these mice was very good since 36 *Borrelia* proteins were identified, and 10 with at least 3 different peptides (Table 5). Three *Borrelia* proteins were also recovered from the mice that had been infected via needle inoculation: flagellin, VlsE and GAPDH. Seven other *Borrelia* proteins were unique to the mice infected via tick bite: flagellar filament outer layer, L-lactate dehydrogenase, enolase, oligopeptide ABC transporter, neutrophil activating protein, and 2,3-biphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase.

We also analyzed mouse skin biopsies after infesting each mouse with 5 *B. afzelii*-infected nymphs (mean of 80% of infected nymphs). The skin infection rate was lower (Supplementary data – Table 2) and no proteins were

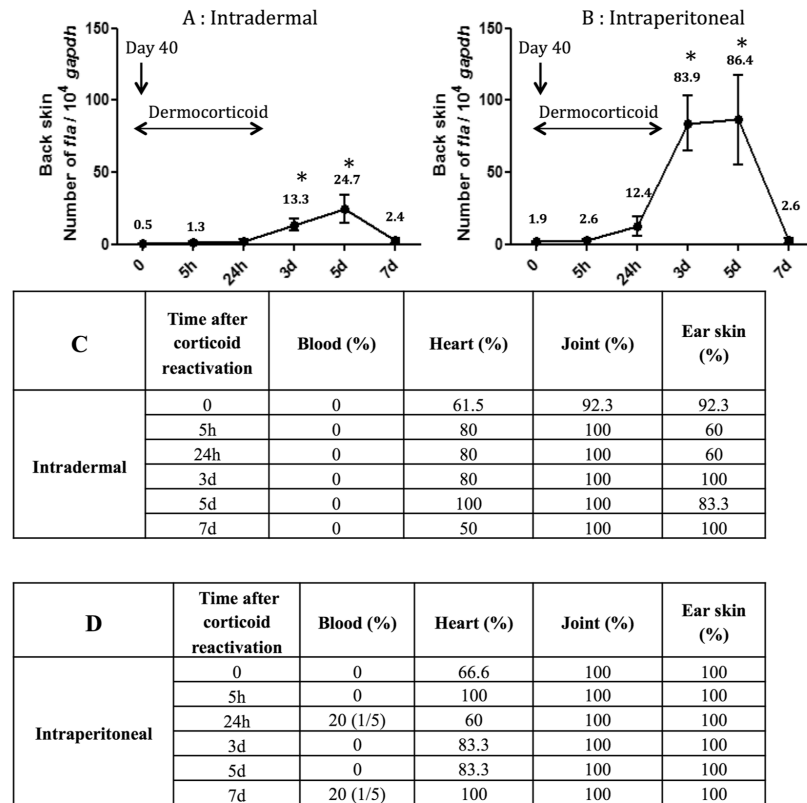


Figure 2. Application of the dermocorticosteroid clobetasol to the skin of chronically infected mice increased the *Borrelia* spirochete abundance in the mouse skin. Mice were infected with *Borrelia burgdorferi* ss strain N40 via (A) intradermal or (B) intraperitoneal inoculation. At 40 days post-infection, the mice were treated with clobetasol for two days. At different time points following the clobetasol treatment (5 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d), the mice were sacrificed and the mouse skin where the dermocorticosteroid had been applied was excised. The *Borrelia* load in the mouse skin was estimated using qPCR for seven days. Different mouse organs were tested by culture for seven days to determine the presence of *Borrelia*. Tissue biopsies that yield spirochete-negative cultures were retested using qPCR. The blood remained spirochete-negative over the duration of the tick blood meal, with the exception of two mice in the intraperitoneal group. The asterisk (*) indicates time points where the spirochete load is significantly higher ($p < 0.05$) than the base line ($t = 0$).

identified using both Mascot and OMSSA algorithms. Some proteins were identified by a single algorithm only (data not shown) but were not different from the ones identified previously.

Detection of specific *Borrelia* proteins in infected mouse skin by targeted proteomics (Ge-LC-SRM).

We used targeted proteomics to improve detection and quantification of *Borrelia* proteins in mouse skin. Among all *Borrelia* proteins identified by Ge-LC-MS/MS analyses, 14 proteins were selected for a targeted Ge-LC-SRM assay. The method monitored 544 transitions corresponding to 67 peptides. To consider sequence variation in *Borrelia* proteins, the selection of proteotypic peptides included a large selection of protein variants, especially for flagellin and VlsE. The specificity and sensitivity of Ge-LC-SRM allowed the detection of *Borrelia* proteins in mouse skin biopsies with lower spirochete densities than by Ge-LC-MS/MS. To assess our Ge-LC-SRM detection method, we examined two mouse skin biopsies with high spirochete densities of either *B. burgdorferi* ss N40 (mouse 1: 259 *fla*/10⁴ *gapdh*) or *B. afzelii* NE4049 (mouse 5: 304 *fla*/10⁴ *gapdh*). After extraction, 75 µg of protein extract was loaded onto the gel (16 bands) and analysed by LC-SRM. The specific detection of each peptide was validated as we observed (1) the co-elution for all transitions, (2) the co-elution between heavy labelled and the endogenous peptide, (3) a consistent ratio between peptide transitions for endogenous and heavy labelled peptides, and (4) a signal greater than 3 times the signal to noise ratio. Several *Borrelia* proteins/peptides were

Mouse ID #	1	2	3	4	5	6
Spirochete density (<i>fla</i> /10 ⁴ <i>gapdh</i>)	119	103	203	90	99	259
Mouse proteins^a	3733	3761	3723	3552	3077	3373
Flagellin	X (5)	X (1)	X (5)		X (2)	X (4)
VlsE	X (3)	X (4)	X (6)		X (1)	X (6)
DbpA	X (1)	X (1)				
GAPDH		X (1)				X (1)
BbuN40_0563 ^b						X (1)
Lipoprotein gj 256055301						X (1)
Chaperonin GroEL						X (1)
Elongation factor Tu						X (1)

Table 3. Identification of *Borrelia* proteins by Ge-LC-MS/MS in mouse skin infected with *Borrelia burgdorferi* ss N40. Mice were inoculated intraperitoneally and the *Borrelia* infection was reactivated with clobetasol at 40 days post-infection. Proteins were identified using both Mascot and OMSSA algorithms. The numbers of identified peptides are in brackets. ^aNumber of identified mouse proteins. ^bHypothetical protein BbuN40_0563.

Mouse ID #	<i>B. burgdorferi</i> ss N40			<i>B. afzelii</i> NE4049							<i>B. garinii</i> PBi		
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3
Spirochete density <i>fla</i> /10 ⁴ <i>gapdh</i>	24	10	43	304	151	3	69	92	38	112	14	30	19
Mouse proteins	3302	3458	3482	3440	3147	3580	3513	3009	2979	3077	3381	3374	3279
Flagellin				X (4)			X (3)						
VlsE			X (3)	X (1)				X (1)		X (1)			
GAPDH				X (2)									

Table 4. Identification of *Borrelia* proteins by Ge-LC-MS/MS in mouse skin infected with one of three different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Mice were inoculated intradermally and the *Borrelia* infection was reactivated with clobetasol at 40 days post-infection. Proteins were identified using both Mascot and OMSSA algorithms. The numbers of identified peptides are in brackets.

Mouse ID #	1	2	3	4
Spirochete density <i>fla</i> /10 ⁴ <i>gapdh</i>	876	602	1231	723
Mouse proteins	4489	4156	3961	4372
Flagellin	X (11)	X (8)	X (8)	X (10)
Flagellar filament outer layer	X (1)	X (4)	X (1)	X (6)
VlsE	X (3)	X (2)	X (2)	X (2)
L-lactate dehydrogenase	X (3)	X (5)		X (4)
GAPDH	X (4)	X (5)	X (7)	X (6)
Enolase	X (3)	X (1)		X (2)
Oligopeptide ABC transporter gj 111115153	X (3)	X (2)	X (1)	X (6)
Neutrophil activating protein	X (3)	X (1)		
2,3-biphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	X (2)	X (1)	X (2)	X (3)
Elongation factor Tu	X (3)	X (7)	X (2)	X (9)

Table 5. Identification of *Borrelia* proteins by Ge-LC-MS/MS in mouse skin infected with *Borrelia afzelii* isolate NE4049. Mice were infected via tick bite (10 nymphs) and the *Borrelia* infection was reactivated with clobetasol at 40 days post-infection. Proteins were identified using both Mascot and OMSSA algorithms. The numbers of identified peptides are in brackets. Of the 36 proteins identified, only those identified with at least 3 different peptides in at least one biopsy are listed.

identified in both two biopsies using Ge-LC-SRM (Table 6). This result proves the feasibility of using LC-SRM to detect specific *Borrelia* proteins in infected mouse skin at the disseminated stage of LB (40 days post-infection).

We further assessed the sensitivity of our method by studying the skin biopsies of six additional mice with lower spirochete densities: three infected with *B. burgdorferi* ss N40 (mice 2, 3, and 4 in Table 6) and three with *B. afzelii* NE4049 (mice 6, 7, 8 in Table 6). These biopsies were analysed with the same Ge-LC-SRM approach (50 µg loaded onto the gel, 11 bands). After analysis, we detected *Borrelia* flagellin and VlsE proteins in 3 of these 6

Detected proteins	Infection Mode	<i>B. burgdorferi</i> ss N40				<i>B. afzelii</i> NE4049			
		IP	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
		Spirochete density <i>fla</i> /10 ⁴ <i>gapdh</i>	259	43	15	10	304	69	10
	Sequence of SRM-monitored peptides	Mouse 1	Mouse 2	Mouse 3	Mouse 4	Mouse 5	Mouse 6	Mouse 7	Mouse 8
DbpA	DITDEIDAIK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	GVNFDAFK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	TTANGIEIVK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	TVTDAAEQHPTTAEGLIEIAK	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	VSENFLEAK	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
Flagellin	ANLGAQNR	Q (45)	Q (5)	N.d.	N.d.	Q (36)	Q (4)	N.d.	N.d.
	AINFIQTTEGNLNEVEK	Q (94)	N.d.	N.d.	N.d.	Q (52)	N.d.	N.d.	N.d.
	INTPASLSGSGQASWTLR	Q (88)	Q (14)	N.d.	N.d.	Q (77)	N.d.	N.d.	N.d.
	ASDDAAGMGVSGK	D	D	N.d.	N.d.	D	N.d.	N.d.	N.d.
	ELAVQSGNGTYSDSDR	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	GSIQIEIQLTDEINR	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	IADQAQYNQMHLMSNK	D	D	N.d.	N.d.	D	N.d.	N.d.	N.d.
	MIINHNTSAINASR	D	D	N.d.	N.d.	D	N.d.	N.d.	N.d.
	NNAINAANLSK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	D	D	N.d.	N.d.
	NNGINAANLSK	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	NSTFYAIENLK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	D	N.d.	N.d.	N.d.
	TAEELGMQPAK	D	D	N.d.	N.d.	D	N.d.	N.d.	N.d.
	HP BAPKO_0593	LPLALNLAVSR	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	D	N.d.	N.d.
Lipoprotein gj 365823350	EFFDWLSK	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	GEALSLFFQK	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	SLTEIDSGNGIPLVSDVVK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	VLTESESNNELK	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
Vls13	AAAVSSVSGEQILK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	AVSSVSGEQILK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	GIVDAAGTAAGK	D	D	D	N.d.	D	N.d.	N.d.	N.d.
	GIVDAAGTAAGKK	D	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	IGESADNGAAADADSVK	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
Vls2	VAAALVLR	D	D	N.d.	N.d.	D	N.d.	N.d.	N.d.
	AAEAVSSVSGEQILK	D	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	AAEEAIVGATGDGTK	D	D	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
	<i>Borrelia</i> species typing	YES	YES	YES	NO	YES	YES	NO	NO

Table 6. Targeted detection of bacterial proteins by LC-SRM in mouse skin infected with *Borrelia burgdorferi* ss N40 or *Borrelia afzelii* NE4049. Growth of spirochetes was reactivated with clobetasol at 40 days after intraperitoneal (IP) or intradermal (ID) inoculation. N.d. = Not detected, D = Detected, Q = Detected and quantified. Quantifications are in brackets (fmol/mg skin).

biopsies. By using AQUA[®] peptide, we estimated the quantity of flagellin protein in two biopsies. A VlsE peptide (GIVDAAGTAAGK) was even detected in a mouse skin biopsy with a very low spirochete density (mouse 3: 15 *fla*/10⁴ *gapdh*). It is noteworthy that we observed a good correlation between our estimates of flagellin protein content (either absolute quantification or total number of detected peptides) and the spirochete density estimated by PCR. Finally, the detection of proteotypic peptides of each *Borrelia* species/strain allowed us to do bacterial species determination when the initial spirochete density was ≥ 15 *fla*/10⁴ *gapdh*.

For non targeted proteomics, the biopsy infected with *B. burgdorferi* ss N40, a maximum of 18 peptides corresponding to 4 proteins (flagellin, VlsE, DbpA and lipoprotein gj|365823350) were detected. With targeted proteomics, flagellin was detected in this skin biopsy with 8 targeted peptides, and 4 of these peptides had been previously identified by Ge-LC-MS/MS (Table 3). A similar result was observed with the second skin biopsy infected with *B. afzelii*: 9 flagellin peptides were detected by Ge-LC-SRM, of which 4 peptides had been previously identified by Ge-LC-MS/MS (Table 3). Thus, the targeted LC-SRM method detects more peptides than Ge-LC-MS/MS. By using AQUA[®] peptides, we estimated the quantity of 3 different flagellin peptides in each biopsy (Table 6).

Detection of specific *Borrelia* proteins in infected mouse skin by Ge-LC-SRM after antibiotic treatment. We wanted to determine the persistence or not of *Borrelia* (live bacteria, DNA and proteins) in the skin after antibiotic treatment of infected mice (n = 29) by culture, PCR and Ge-LC-MS/MS. After two days of antibiotic treatment (Day 1), all cultures in BSK-H medium were still positive but spirochete quantification was significantly reduced in the mouse skin by PCR, ranging from 0.067 to 0.158 *flagellin* /10⁴ *gapdh*, (Supplementary

data – Table 3). No *Borrelia* proteins were identified by Ge-LC-MS/MS. After 2 days of antibiotic treatment (Day 2), all cultures and *Borrelia* PCR assays were negative (Supplementary data – Table 3). Protein detections were not possible (data not shown).

Discussion

The goal of this study was to identify *Borrelia* proteins in the skin of mice with disseminated infections and use these proteins as candidate markers for disseminated and late diagnosis of Lyme borreliosis. First, we demonstrated that *Borrelia* establishes a persistent infection in the skin of our mouse model C3H/HeN at 40 days post-infection to mimic the disseminated phase of LB whatever the route of inoculation as previously demonstrated^{10,34,35}. Interestingly, the skin appears to be a homing site for *Borrelia*, since the pathogen was found in the skin regardless of whether the mice were infected via intradermal or intraperitoneal inoculation. A previous study had found that live spirochetes of *B. burgdorferi* ss strain N40 could be cultured from the skin of laboratory mice as late as 360 days post-infection¹¹. We showed that treatment with an immunosuppressive dexamethasone (clobetasol) greatly enhanced growth of *B. burgdorferi* ss strain N40 in the mouse skin. Previous studies on mice with severe combined immunodeficiency have shown that the acquired immune system plays a critical role in controlling the abundance of *Borrelia* spirochetes in the mouse tissues including the skin^{36–39}. The present study shows that the local immune response in the mouse skin plays an important role in controlling the spirochete population.

We also showed that *I. ricinus* nymphs feeding at 40 days post-infection could acquire *B. burgdorferi* ss N40 from infected mice. Previous studies have shown that mouse-to-tick transmission of *Borrelia* pathogens can occur over a duration of months and even years^{12,13}. The minimal time necessary for *I. ricinus* nymphs to acquire *B. burgdorferi* ss N40 from infected mice was very fast. Already 5 hours after the beginning of the blood meal, the ticks already fixed were positive by PCR (22%) and the rate of infectivity increased rapidly at 8 hours with 80% of infected ticks, especially after intradermal inoculation. This result was similar to an earlier study on *B. burgdorferi* ss in *I. scapularis* where nymphal ticks acquired spirochetes at 8 hours post-attachment³². The fast mouse-to-tick transmission suggests that ticks acquire *Borrelia* spirochetes directly from the skin and not by migration of spirochetes from distant organs. This local transmission hypothesis was further supported by our observation that the mouse blood remained spirochete-negative during mouse-to-tick transmission. We found that efficient mouse-to-tick transmission ($\geq 70\%$) of *B. burgdorferi* ss N40 to *I. ricinus* nymphs occurred 15 times faster in the intradermal group (8 hours) than in the intraperitoneal group (5 days). A possible explanation is that mouse-to-tick transmission was faster in the intradermal group because the spirochetes were inoculated directly into the skin, which is the key organ for mouse-to-tick transmission. Indeed, after intradermal inoculation or nymph infection, we and others have shown that *Borrelia* multiplies intensively in the skin at day 7 and day 15 respectively, whatever the species and the strain [9,10,36]. It is likely that the *Borrelia* population persisting in the skin is different after intradermal inoculation versus intraperitoneal inoculation. Indeed, the skin operates as a filter for *Borrelia* population, constituted of different clones^{16,40}, only some of the clones disseminate to the target organs, “while others persist in the skin.” With IP inoculation, the skin did not have an effect on the *Borrelia* population during the inoculation process.

Tick saliva contains a diversity of molecules with anti-hemostatic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties, which facilitates the uptake of the blood meal that is essential for tick survival^{41–43}. In the present study, we had originally intended to use tick feeding and tick saliva-induced local immunosuppression to boost the local spirochete population in the mouse skin to enhance the probability of detecting *Borrelia* proteins in the skin. We therefore expected that the immunosuppressive properties of tick salivary gland extract (SGE) would have a similar effect to the clobetasol treatment. However, we found no evidence that feeding by *I. ricinus* nymphs enhanced the density of *B. burgdorferi* ss N40 spirochetes in the mouse skin surrounding the feeding lesion. A number of studies have shown that tick saliva enhances *Borrelia* growth *in vitro*^{44,45} and abundance and *in vivo*^{46,47}. These studies provide evidence that *Borrelia* spirochetes respond to the tick SGE of the tick vector species with which they have co-evolved. In the present study, we found that feeding by *I. ricinus* nymphs did not enhance the density of *B. burgdorferi* ss N40 in the mouse skin. One explanation is that *B. burgdorferi* ss N40 is not stimulated by the tick SGE of *I. ricinus* nymphs as previously shown by Zeidner *et al.*⁴⁶. Another explanation is that the spirochete population in the infected skin surrounding the tick-feeding lesion is likely to be highly dynamic. Future studies on the dynamics of the spirochete population in the host skin during host-to-tick transmission should investigate other combinations of *Borrelia* species and *Ixodes* ticks.

In the present study, we successfully used clobetasol to locally boost *Borrelia* and to detect protein markers of disseminated infection in the mouse skin. We had previously shown that proteomics can be used to detect *Borrelia* in the skin at 7 days after intradermal inoculation when the bacteria multiply rapidly in the mouse skin⁴⁸. In the present study, the two main *Borrelia* proteins that we detected were flagellin and VlsE. VlsE is a well-known *Borrelia* protein that is expressed during disseminated infection and that helps the spirochete to evade the host antibody response^{49,50}. This protein is used in commercial ELISA assays for the diagnosis of disseminated LB²¹. For the proteomics study, the mice had been infected with all three *Borrelia* species via intradermal inoculation followed by dexamethasone reactivation as well as via tick bite (only *B. afzelii* isolate NE4049) followed by dexamethasone reactivation. For these mice, we got a large panel of *Borrelia* proteins including flagellin and VlsE, but also L-lactate dehydrogenase, neutrophil activating protein (Nap), enolase, oligopeptide ABC transporter, and Elongation factor Tu. Elongation factor Tu is a highly immunogenic protein which is primarily found in the protoplasmic cylinder of spirochetes and is not on the surface of *B. burgdorferi*⁵¹. Nap is one of the main *Borrelia* proteins involved in the pathogenesis of the early stages of Lyme arthritis. This protein orchestrates the recruitment of inflammatory cells into the joint cavity⁵². The role of Nap in disseminated stages of LB is unknown and its presence in the mouse skin was unexpected. Peptide ABC transporters may play a major role in nutrition and virulence of spirochetes^{53,54}. Several identified proteins like GroEL, oligopeptide ABC transporter, enolase, and GAPDH are known to be expressed in virulence vesicles in *Borrelia*⁵⁵.

Of the three *Borrelia* species investigated in the proteomics part of the study, *B. afzelii* NE4049 was found to persist and multiply the best in the skin of the mice. In nature, the different *Borrelia* species are associated with different reservoir hosts: *B. afzelii* with rodents, *B. garinii* with birds, whereas *B. burgdorferi* ss is ubiquitous⁵⁶. This host specificity could explain the efficient persistence and multiplication of some *B. afzelii* strains in mouse skin compared to *B. garinii* strains. Previous studies have shown that *B. afzelii* isolate NE4049 establishes a high spirochete load in the skin of laboratory mice compared to another *B. afzelii* isolate E61¹⁴. *B. afzelii* NE4049 also has high mouse-to-tick transmission over a duration of 4 months suggesting that it is highly competent at establishing a persistent infection in laboratory mice¹³. Finally, this *B. afzelii* strain is also highly competent at co-feeding transmission^{57,58} which occurs when spirochetes are transmitted between infected and uninfected ticks that feed in close proximity to each other on the same host at the same time⁵⁹. Co-feeding transmission can occur before the establishment of a systemic infection and probably requires the *Borrelia* pathogen to establish a fast-growing spirochete population at the site of the tick-feeding lesion⁵⁹. In summary, our proteomics approach was most successful at detecting *B. afzelii* in mouse skin because this *Borrelia* species is best adapted to live in rodent reservoir hosts.

As *Borrelia* proteins detected after reactivation in mice are present in disseminated infections, we suggest that these proteins could be interesting markers of disseminated LB in human patients. We have shown that our approach is feasible for the diagnosis of early LB²⁰. We are currently validating this approach in more patients and we are comparing its efficiency and sensitivity to PCR detection and *Borrelia* culture (personal communication). The skin remains spirochete-positive for months in mice¹¹ and also in dogs⁶⁰. The ability of spirochetes to persist in human skin is not known. However, tick bites remain visible for several months in some patients and skin biopsies could be sampled from the site of the tick bite to perform diagnostics. Alternatively, proteomics might be used on other biological fluids such as synovial fluid or cerebrospinal fluid. In addition, we showed that after only two days of antibiotic treatment of *Borrelia*-infected mice, no live bacteria, DNA or proteins were detected. Diagnosis relying on proteomics could help clinicians to distinguish disseminated stage LB efficiently treated with antibiotics from persistent infections or reinfections.

Late disseminated LB is a real problem in humans^{1,61}. In some cases, like acrodermatitis chronica atrophicans, it is well established that the disease is linked to the presence of live bacteria². In other cases, clinical symptoms are linked to an inflammatory process that persists in patients, while the bacteria have been killed by an efficient antibiotic treatment⁶². As proteomics detects proteins indicating the presence of metabolically active organisms, this approach could be used in patients with long-lasting symptoms to check for the real persistence of *Borrelia* in their tissues. Thus, the approach presented in this study might offer new diagnostic tools for disseminated and late LB in humans.

Materials and Methods

Animals, *Borrelia* and *Ixodes ricinus* ticks. Pathogen-free male or female C3H/HeN mice were purchased from Charles River Laboratories. Three different strains belonging to the 3 main *Borrelia* species were used for the infection experiment: *B. burgdorferi* ss strain N40, *B. afzelii* strain NE4049, and *B. garinii* strain PBI. These three LB strains were cultured in BSK-H complete medium (Sigma) at 33 °C and used at passage ≤7 for mouse infections. *Ixodes ricinus* ticks were obtained from the pathogen-free tick colony at the University of Strasbourg (France). Nymphal ticks were used to demonstrate transmission of *Borrelia* from infected mice to ticks.

Infections of mice with *Borrelia burgdorferi* sl. Mice (3–4 weeks old) were infected via syringe inoculation with each of the three *Borrelia* strains or via tick bite with *B. afzelii* strain NE4049 only (Average infection rate = 80%). For syringe inoculation, mice were inoculated intradermally in the dorsal thoracic area (n = 73 mice) or intraperitoneally (n = 63 mice) with 1000 spirochetes in 100 µL of BSK-H. For infection via tick bite, *I. ricinus* nymphs infected with *B. afzelii* strain NE4049 were generated according to a previously described protocol^{14,58}. Each mouse was subsequently infected with 5 or 10 nymphs⁶³. After 2 to 3 weeks, the presence of *Borrelia*-specific IgG antibodies in the mouse sera was tested by ELISA⁶⁴.

Transmission of *B. burgdorferi* ss N40 from infected mice to naïve *I. ricinus* nymphs. Transmission of *B. burgdorferi* ss N40 from infected mice to *I. ricinus* nymphs was studied using xenodiagnosis. For this experiment, 35 and 31 mice were inoculated via the intradermal and intraperitoneal route, respectively. The details of the protocol of transmission of *Borrelia* from infected mice to naïve *I. ricinus* nymphs were as follows (see also⁶³). Forty days after the initial *Borrelia* inoculation, a plastic capsule was attached to the shaved back of each mouse with wax. The nymphs (5) were placed inside the plastic capsule. At each time point of the time series, the mice were killed and the nymphs removed and counted. In our experience, 40% to 80% of the nymphs in the capsule attach to the mouse. Of the nymphs that attach, ~50% are attached at 8 hours. These engorged nymphs were then tested by PCR to detect *Borrelia*. This PCR protocol amplifies a conservative part of the *Borrelia flagellin (fla)* gene⁶⁴. DNA was extracted from the ticks on a MagNA Pure apparatus as described previously³⁴.

Reactivation of *B. burgdorferi* ss N40 in the mouse skin by tick blood meal. Ticks might reactivate *Borrelia* in the skin by their saliva. At the different time points during tick blood meal, mice were sacrificed with Forene[®] inhalation (isoflurane) and a 1-cm² area of dorsal thoracic skin was removed at the site of the tick feeding. Distant organs (heart, joint and ear skin) and the blood were collected. Dorsal and ear skin and blood were tested by culture for the presence of *Borrelia*. Dorsal skin was tested with quantitative PCR to determine whether the feeding of nymphal ticks reactivated spirochetes in the skin. PCR was used to check for the presence of *Borrelia* in the heart and in the joint as described above. Skin samples with the highest spirochete loads at day 3 or 5 were used for proteomics analyses.

Reactivation of *B. burgdorferi* ss N40 in the mouse skin by dexamethasone application. *Borrelia burgdorferi* ss N40 spirochetes were reactivated in mouse skin by applying dexamethasone. For this experiment we used 32 and 27 mice inoculated via the intradermal and intraperitoneal route, respectively. At ~40 days PI, ~10 mg of Dermoval® (0.05% clobetasol) was applied to the dorsal thoracic area of the mice, twice a day for 2 days. To determine the temporal dynamics of spirochete reactivation, mice were sacrificed at different times following clobetasol treatment: 0 h, 5 h, 24 h, 3 d, 5 d and 7 d from the first application. Mice were sacrificed by Forene® inhalation (isoflurane). A 1-cm² area of dorsal thoracic skin was removed for quantitative PCR, at the site of dexamethasone application. In addition, for each mouse at each time point, four organs were collected: heart, joints, dorsal thoracic skin, and cardiac blood. A minimum of 5 mice was used at each time point (maximum 13). Skin samples with the highest spirochete loads at day 3 or 5 were used for proteomics analyses.

***Borrelia*-infected animals reactivated with dexamethasone application then treated with antibiotics.** Mice were infected with *B. burgdorferi* ss N40 via intradermal inoculation (n = 29). Forty days post-infection, the mice were treated with clobetasol, twice a day for 2 days to reactivate the spirochetes, as described above. Mice were subsequently treated with antibiotics (ceftriaxone 16 mg/kg) intradermally, twice a day for 5 days⁶⁵. The mice were sacrificed at different times following the end of antibiotic treatment: 1, 2, 3, and 7 days. For each mouse, the skin at the site of intradermal inoculation was collected and cultured for *Borrelia*, and frozen at -80°C for PCR quantification and proteomics analyses. For controls, infected animals were treated with clobetasol, and subsequently inoculated twice a day for 5 days with saline solution instead of antibiotics.

Proteomics analysis. For the proteomics part of the study, we used skin samples from the mice from the experiments described above, which had been infected with *B. burgdorferi* ss strain N40 via the intradermal route (n = 3) and the intraperitoneal route (n = 6) and treated with clobetasol. We also inoculated mice via the intradermal route with *B. afzelii* strain NE4049 (n = 7) and with *B. garinii* strain PBI (n = 3). Finally, we infected mice via nymphal tick bite with *B. afzelii* strain NE4049 (n = 4). For infection via tick bite, *I. ricinus* nymphs infected with *B. afzelii* strain NE4049 were created according to a previously described protocol⁶⁸. Each mouse was subsequently infested with 5 or 10 nymphs as described previously⁶³. After 2 to 3 weeks, the presence of *Borrelia*-specific IgG antibodies in the mouse sera was tested by ELISA as described previously⁶⁴.

Culture of *B. burgdorferi* sensu lato from organs or blood. For detection of *B. burgdorferi* sl by culture, the different mouse organs were dissected aseptically. Collected organs and blood (3 drops) were placed in 6 ml of BSK-IH medium containing 30 µg of rifampicin (BioRad). The tubes were maintained at 33°C and examined weekly for the presence of spirochetes by dark-field microscopy as described previously⁹. For each organ and blood sample, the tissue material was divided into two parts: the first part was tested for live *Borrelia* spirochetes using culture, if the culture tested negative, the second part was tested for *Borrelia* DNA using qPCR. For all the skin samples, culture and quantitative PCR were performed.

Estimation of *Borrelia* load in mouse skin by quantitative PCR. Mouse tissue samples were tested for infection with *B. burgdorferi* using quantitative PCR that targeted the *fla* gene, as described previously⁶⁶. DNA was extracted from the skin of individual mice on a MagNA Pure apparatus. Quantification of the *B. burgdorferi*-specific *fla* gene was performed on a LightCycler system (Roche Diagnostics). Quantification of the mouse-specific *gapdh* gene was performed on an ABI Prism 7500 instrument (Applied Biosystem), using a commercial kit (TaqMan rodent GAPDH control reagent; Applied Biosystem). The number of *B. burgdorferi* spirochetes in tissue samples was standardized to 10⁴ *gapdh* gene copies³⁴.

Ge-LC-MS/MS analyses. For non-targeted proteomics, samples (5 mg) of mouse skin biopsies were manually extracted by Laemmli buffer and proteins (50 µg) were pre-fractionated onto 12% SDS-PAGE as described²⁰. Gel bands (10 ± 1 bands) of 2 mm were excised manually. After reduction, alkylation and trypsin digestion, the peptides were extracted using 80% ACN and 0.1% HCOOH for 90 min at room temperature. After evaporation, the peptides were suspended in 50 µL of 0.1% HCOOH prior to mass spectrometry analyses. LC-MS/MS analyses were performed on a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC system hyphenated to a Q-Exactive Plus mass spectrometer as described⁶⁷. Data analysis was performed as described²⁰ against an in-house database containing all protein sequences of *Borrelia* and mouse extracted from NCBI nr and UniProtKB-SwissProt, respectively. For the bacteria, four different reference databases were used depending on the strain analysed: *B. burgdorferi* ss B31 (1758 entries at May 07, 2013), *B. burgdorferi* ss N40 (1480 entries at January 30, 2015), *B. afzelii* Pko (2180 entries at October 16, 2014), and *B. garinii* Pbi (1410 entries at April 08, 2015). For MS² data, parent and fragment mass tolerance was 5 ppm and 0.07 Da and a maximum of 1 missed cleavage was allowed. The Mascot and OMSSA results were independently loaded into the Proline software (Proline Studio Release 1.0). All spectra leading to an identification exceeding a minimum set threshold (Mascot Ion Score > 25, OMSSA -log(e-value) > 7, peptide length > 6 amino acids) and having a pretty rank as defined by Mascot equal to 1 were kept. Resulting spectra were then filtered to obtain a protein false discovery rate of less than 1%⁶⁸.

Ge-LC-SRM analyses. For targeted proteomics, protein fractionation and *in gel* digestion was achieved as previously described for Ge-LC-MS/MS analyses with the following modifications. First, two different protein quantities, 100 µg and 75 µg, were electrophoresed onto SDS-PAGE to obtain respectively 16 and 11 bands. Second, after protein digestion, extraction and evaporation, the peptides (average of 6.25 µg of proteins per gel band) were suspended in 6 µL of a mixture of diluted heavy labelled peptides (Thermo Fisher) prior to mass spectrometry.

For each band, the totality of the suspended peptide mixture (6 µL) was injected. For LC-SRM assay, 67 proteotypic peptides were selected for 14 targeted proteins (DbpA, enolase, flagellin, GAPDH, HSP90, BB0081, BBP42, BAPKO0593, BAPKO4515, lipoprotein gij365823350, VlsE, RNA polymerase, histidine kinase, hypothetical protein gij500023077) and isotopically labelled equivalent peptides were purchased (64 crude PEPotecs peptides and three high purity AQUA® flagellin peptides). Four transitions per peptide corresponding to the most abundant y or b mono- or doubly charged ions were selected for both endogenous and heavy labelled peptides. For each transition, the collision energy was optimized experimentally by testing six values centred on the reference value. The reference value is calculated using the equation given by the supplier. A total of 544 transitions corresponding to 136 precursors were monitored. For the SRM analyses, 6 µL of a mixture of diluted heavy labelled peptides was added to suspend an average of 6.25 µg peptides (100 µg of proteins/16 gel bands or 75 µg of proteins/11 gel bands).

All separations were carried out on Agilent 1100 Series HPLC system (Agilent Technologies). For each analysis, the sample was loaded into a trapping column ZORBAX 300SB-C18 MicroBore Guard 5 µm, 1.0 × 17 mm (Agilent Technologies) at 50 µL/min with an aqueous solution containing 0.1% HCOOH and 2% ACN (solvent A). After 3 min of trapping, the column was put on-line with a ZORBAX 300SB-C18 3.5 µm, 0.3 × 150 mm column (Agilent Technologies). Peptide elution was performed at 5 µL/min using a gradient from 5–45% solvent B (ACN in 0.1% HCOOH) over 57 min. The isolation width for both Q1 and Q3 was set to 0.7 m/z unit. Time-scheduled SRM method targeted the pairs of isotopically labelled peptides/endogenous peptides in ±3 min retention time windows (6 min in total) within a cycle time of 3000 ms. Mass data collected during LC-SRM were processed with the Skyline open-source software package 3.5.9.

Statistical analyses. For the different kinetics, generally between 4 and 10 mice were used for each time point. For proteomics analyses, for the different infection protocols, between 10 and 22 mice were inoculated. Statistical analyses between the different groups were made with a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's correction.

Ethics statement. The protocols carried out in this study were approved by the Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS - Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Strasbourg). Name of the ethics statement / N° CREMEAS 2015062210282757 and APAFIS # 887. The protocols performed on animals follow the European guidelines: "directive 2010/63/EU".

References

1. Stanek, G., Wormser, G., Gray, J. & Strle, F. Lyme borreliosis. *Lancet* **379**, 461–73 (2012).
2. Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B. & Hu, L. T. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 87–99 (2012).
3. Pritt, B. S. *et al.* Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetemia: A descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 556–564 (2016).
4. Lane, R. S., Piesman, J. & Burgdorfer, W. C. N.-2123. Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Ann. Rev. Entomol.* **36**, 587–609 (1991).
5. Pérez-Eid, C. *Les tiques: identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Monographies de microbiologie* (2007).
6. Ohnishi, J., Piesman, J. & de Silva, A. M. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 670–675 (2001).
7. Dunham-Ems, S. M. *et al.* Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *J. Clin. Invest.* **119**, 3652–3665 (2009).
8. Shih, C. M., Pollack, R. J., Telford, S. R. & Spielman, A. Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice. *J. Infect. Dis.* **166**, 827–31 (1992).
9. Kern, A. *et al.* Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of Lyme disease. *Vector borne zoonotic Dis. Larchmont NY* **11**, 1343–50 (2011).
10. Barthold, S. W., Persing, D., Armstrong, A. & Peebles, R. Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am. J. Pathol.* **139**, 263–273 (1991).
11. Barthold, S., de Souza, M., Janotka, J., Smith, A. & Persing, D. Chronic Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *Am J Pathol.* **143**, 959–71 (1993).
12. Gern, L. *et al.* *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): Duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur. J. Epidemiol.* **10**, 75–80 (1994).
13. Jacquet, M., Margos, G., Fingerle, V. & Voordouw, M. Comparison of the lifetime host-to-tick transmission between two strains of the Lyme disease pathogen *Borrelia afzelii*. **9**, 645 (2016).
14. Jacquet, M., Durand, J., Rais, O. & Voordouw, M. Cross-reactive acquired immunity influences transmission success of the Lyme disease pathogen, *Borrelia afzelii*. *Infect. Genet. Evol.* **36**, 131–140 (2015).
15. Råberg, L. Infection intensity and infectivity of the tick-borne pathogen *Borrelia afzelii*. *J. Evol. Biol.* **25**, 1448–1453 (2012).
16. Rego, R. O. M., Bestor, A., Štefka, J. & Rosa, P. A. Population bottlenecks during the infectious cycle of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* **9** (2014).
17. Tracy, K. E. & Baumgarth, N. *Borrelia burgdorferi* manipulates innate and adaptive immunity to establish persistence in rodent reservoir hosts. *Front. Immunol.* **8** (2017).
18. Moriarty, T. *et al.* Real-time high resolution 3D imaging of the Lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathog.* **4**, e1000090 (2008).
19. Shih, C. M., Chao, L. & Yu, C. Chemotactic migration of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) to salivary gland extracts of vector ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**, 616–621 (2002).
20. Schnell, G. *et al.* Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies: a promising work toward an early diagnosis of Lyme disease. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 1254–64 (2015).
21. Aguero-Rosenfeld, M., Wang, G., Schwartz, I. & Wormser, G. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* **18**, 484–509 (2005).
22. Leeflang, M. M. G. *et al.* The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **16**, 140 (2016).
23. Stanek, G. *et al.* Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **17**, 69–79 (2011).

24. Kuhn, E. *et al.* Interlaboratory Evaluation of Automated, Multiplexed Peptide Immunoaffinity Enrichment Coupled to Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry for Quantifying Proteins in Plasma. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.013854–M111.013854 (2012).
25. Rifai, N., Gillette, M. A. & Carr, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **24**, 971–983 (2006).
26. Huttenhain, R. *et al.* Reproducible Quantification of Cancer-Associated Proteins in Body Fluids Using Targeted Proteomics. *Sci. Transl. Med.* **4**, 142ra94–142ra94 (2012).
27. Percy, A. J., Chambers, A. G., Yang, J. & Borchers, C. H. Multiplexed MRM-based quantitation of candidate cancer biomarker proteins in undepleted and non-enriched human plasma. *Proteomics* **13**, 2202–2215 (2013).
28. Kennedy, J. J. *et al.* Demonstrating the feasibility of large-scale development of standardized assays to quantify human proteins. *Nat. Methods* **11**, 149–55 (2014).
29. Domon, B. & Gallien, S. Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *Proteomics Clin Appl.* **3–4**, 423–31 (2015).
30. Percy, A. *et al.* Protocol for Standardizing High-to-Moderate Abundance Protein Biomarker Assessments Through an MRM-with-Standard-Peptides Quantitative Approach. *Adv. Exp. Med. Biol.* **919**, 515–530 (2016).
31. Kruh-Garcia, N. *et al.* Detection of Mycobacterium tuberculosis peptides in the exosomes of patients with active and latent M. tuberculosis infection using MRM-MS. *PLoS One.* **31**, e103811 (2014).
32. Shih, C., Liu, L. & Spielman, A. Differential spirochetal infectivities to vector ticks of mice chronically infected by the agent of Lyme disease. *J. Microbiol.* **33**, 3164–8 (1995).
33. Straubinger, R., Straubinger, A., Summers, B. & RH, J. Status of Borrelia burgdorferi infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. *J. Infect. Dis.* **181**, 1069–81 (2000).
34. Kern, A. *et al.* Heterogeneity of Borrelia burgdorferi Sensu Stricto Population and Its Involvement in Borrelia Pathogenicity: Study on Murine Model with Specific Emphasis on the Skin Interface. *PLoS One.* **10**, e0133195 (2015).
35. Tuomi, J., Rantamäki, L. K. & Tanskanen, R. Experimental infection of laboratory mice and rabbits with several isolates of Borrelia burgdorferi sensu lato; comparison of antigens from different genospecies in serological measurement of immune responses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(01\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(01)00027-3) (2002).
36. Barthold, S. W., Hodzic, E., Tunev, S. & Feng, S. Antibody-mediated disease remission in the mouse model of Lyme borreliosis. *Infect. Immun.* **74**, 4817–4825 (2006).
37. Hodzic, E., Feng, S., Freet, K. J. & Barthold, S. W. Borrelia burgdorferi Population Dynamics and Prototype Gene Expression during Infection of Immunocompetent and Immunodeficient Mice. **71**, 5042–5055 (2003).
38. Liang, F. T. *et al.* Borrelia burgdorferi changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infect. Immun.* **72**, 5759–5767 (2004).
39. Liang, F. T., Brown, E. L., Wang, T., Iozzo, R. V. & Fikrig, E. Protective niche for Borrelia burgdorferi to evade humoral immunity. *Am. J. Pathol.* **165**, 977–985 (2004).
40. Brisson, D., Baxamusa, N., Schwartz, I. & Wormser, G. P. Biodiversity of Borrelia burgdorferi strains in tissues of Lyme disease patients. *PLoS One* **6**, e22926 (2011).
41. Francischetti, I. M. B., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M. & Ribeiro, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **14**, 2051–88 (2009).
42. Kazimirová, M. & Stibrániová, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **3**, 1–17 (2013).
43. Titus, R. G., Bishop, J. V. & Mejia, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.* **28**, 131–41 (2006).
44. Rudolf, I., Šikutová, S., Kopecký, J. & Hubálek, Z. Salivary gland extract from engorged ixodes ricinus (acari: Ixodidae) stimulates *in vitro* growth of borrelia burgdorferi sensu lato. *J. Basic Microbiol.* **50**, 294–298 (2010).
45. Rudolf, I. & Hubálek, Z. Effect of the salivary gland and midgut extracts from Ixodes ricinus and Dermacentor reticulatus (Acari: Ixodidae) on the growth of Borrelia garinii *in vitro*. *Folia Parasitol. (Praha)*. **50**, 159–160 (2003).
46. Zeidner, N., Gern, L., Piesman, J., Schneider, B. & Nuncio, M. Coinoculation of Borrelia spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J. Parasitol.* **88**, 1276–1278 (2002).
47. Pechová, J. *et al.* Tick salivary gland extract-activated transmission of Borrelia afzelii spirochaetes. *Folia Parasitol.* **49**, 153–159 (2002).
48. Schnell, G. *et al.* Proteomic analysis of three Borrelia burgdorferi sensu lato native species and disseminating clones: Relevance for Lyme vaccine design. *Proteomics*, <https://doi.org/10.1002/pmic.201400177> (2014).
49. Liang, F. *et al.* Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of Borrelia burgdorferi SL. *J. Infect. Dis.* **182**, 1455662 (2000).
50. Jacek, E. *et al.* Epitope-Specific Evolution of Human B Cell Responses to Borrelia burgdorferi VlsE Protein from Early to Late Stages of Lyme Disease. *J. Immunol.* **196**, 1036–43 (2016).
51. Carrasco, S. E. *et al.* Borrelia burgdorferi elongation factor EF-Tu is an immunogenic protein during Lyme borreliosis. *Emerg. Microbes Infect.* **4**, e54 (2015).
52. Codolo, G. *et al.* Orchestration of inflammation and adaptive immunity in borrelia burgdorferi-induced arthritis by neutrophil-activating protein A. *Arthritis Rheum.* **65**, 1232–1242 (2013).
53. Garmory, H. & Titball, R. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect Immun.* **72**, 6757–63 (2004).
54. Lin, B., Short, S., Eskildsen, M., Klempler, M. & Hu, L. Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of Borrelia burgdorferi: a complementation model in opp(–) Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta.* **1499**, 222–31 (2001).
55. Toledo, A., Coleman, J., Kuhlrow, C., Crowley, J. & Benach, J. The enolase of Borrelia burgdorferi is a plasminogen receptor released in outer membrane vesicles. *Infect Immun.* **80**, 359–68 (2012).
56. Humair, P. & Gern, L. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect.* **2**, 915–22 (2000).
57. Jacquet, M., Durand, J., Rais, O. & Voordouw, M. J. Strain-specific antibodies reduce co-feeding transmission of the Lyme disease pathogen, Borrelia afzelii. *Environ. Microbiol.* **18**, 833–845 (2016).
58. Tonetti, N., Voordouw, M., Durand, J., Monnier, S. & Gern, L. Genetic variation in transmission success of the Lyme borreliosis pathogen Borrelia afzelii. *Tick Borne Dis.* **6**, 334–43 (2015).
59. Voordouw, M. J. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* **142**, 290–302 (2015).
60. Krupka, I. & Straubinger, R. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with Borrelia burgdorferi sensu stricto. *Vet Clin North Am Small Anim Pr.* **40**, 1103–19 (2010).
61. Wormser, G. P. *et al.* The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1089–134 (2006).
62. Steere, A. C., Gross, D., Meyer, A. L. & Huber, B. T. Autoimmune Mechanisms in Antibiotic Treatment-Resistant Lyme Arthritis. *J. Autoimmun.* **16**, 263–268 (2001).
63. Mbow, M., Christe, M., Rutti, B. & Brossard, M. Absence of acquired resistance to nymphal Ixodes ricinus ticks in BALB/c mice developing cutaneous reactions. *J. Parasitol.* **80**, 81–7 (1994).
64. Kern, A. *et al.* Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of Lyme disease. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**, 1343–50 (2011).

65. Bockenstedt, L. K., Gonzalez, D. G., Haberman, A. M. & Belperron, A. A. Spirochete antigens persist near cartilage after murine Lyme borreliosis therapy. *122* (2012).
66. Hidri, N. *et al.* Lyme endocarditis. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, E531–2 (2012).
67. Muller, L., Fornecker, L., Van Dorsselaer, A., Cianféroni, S. & Carapito, C. Benchmarking sample preparation/digestion protocols reveals tube-gel being a fast and repeatable method for quantitative proteomics. *Proteomics* **16**, 2953–2961 (2016).
68. Elias, J. E. & Gygi, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in 797 large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* **4**, 207–214 798 (2007).

Acknowledgements

We thank the Centre National Reference Center *Borrelia* for its technical support.

Author Contributions

A.G., B.W., L.E.S., N.B. conceived the experiments and analyzed results. A.G., B.W., P.C., D.K., E.C. and C.B. conducted experiments. B.J., N.B. and L.E.S. got financial support. M.V., N.B. and L.E.S. wrote the paper and M.V. edited the english.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16749-9>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

***S. epidermidis*, *P. acnes* and *C. striatum* secretomes can modulate cutaneous innate immunity against *Borrelia burgdorferi* ss**

Antoine Grillon¹, Paola Cantero², Laurence Ehret-Sabatier², Benoit Jaulhac¹, Nathalie Boulanger¹

¹ EA7290, Virulence bactérienne précoce, groupe Borréliose de Lyme, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France.

² Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

Article en préparation

***S. epidermidis*, *P. acnes* and *C. striatum* secretomes can modulate cutaneous innate immunity against *Borrelia burgdorferi* ss**

Antoine Grillon¹, Paola Cantero², Laurence Ehret-Sabatier², Benoit Jaulhac¹, Nathalie Boulanger¹

¹EA7290, Virulence bactérienne précoce, groupe Borréliose de Lyme, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France.

²Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

Abstract

Skin is a strategic organ in the transmission of *Borrelia*. There, spirochetes meet the resident cells of the epidermis and the dermis, and the host skin microbiota. Nothing is known about how skin microbiota is involved in *Borrelia* dissemination in the skin, and if it helps or not the bacterial transmission or dissemination. Here, we tested by ELISA and qRT-PCR the activity of different secretomes from skin bacteria, *S. epidermidis*, *P. acnes* and *C. striatum* on resident skin cells, keratinocytes and fibroblasts, in the presence or absence of *Borrelia*. All bacterial secretomes had a synergistic activity on IL-8 production by keratinocytes and fibroblasts when co-incubated with *Borrelia*. For keratinocytes, hBD-2 and CXCL-1 production was increased in the presence of *S. epidermidis* secretome, and inhibited in the presence of *P. acnes* and *C. striatum* secretomes. For fibroblasts, all secretomes increased the production of CXCL-1 and SOD-2, and this effect was additive in the presence of *Borrelia*. No effect on LL37, MCP-1 or MMPs production was observed. Each commensal bacteria secretome seems to present a specific activity in the presence of *Borrelia* when co-incubated with resident skin cells. This might interfere with *Borrelia* transmission and/or dissemination.

Introduction

Lyme borreliosis (LB) is the most common vector-borne disease in the Northern Hemisphere (Stanek et al. 2012). The spirochete bacteria that cause LB, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), are transmitted by hard ticks belonging to the genus *Ixodes* (Radolf et al. 2012). In Europe, the three most frequent LB pathogens are *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *B. afzelii* and *B. garinii*, whereas *B. burgdorferi* ss is the most frequent LB pathogen in North America. *Ixodes* ticks have three blood-feeding stages: larva, nymph, and adult. The larval or nymphal ticks acquire *Borrelia* pathogens from infected hosts and subsequently develop into infected nymphs that transmit the pathogen to naive hosts the following year (Lane et al. 1991). In arthropod-borne diseases, the skin of the vertebrate host plays a key role as the first interface encountered by pathogens. There, arthropod saliva and pathogens are co-inoculated and interact with resident skin cells, keratinocytes (KCs), fibroblasts (FBs) and immune cells (Frischknecht 2007; Bernard et al. 2014). Then, the spirochaete induces a multisystemic disorder typically characterized first by a skin inflammation, the erythema migrans (EM), at the site of *Borrelia* inoculation in Human. In mouse model, skin has been showed to be a multiplication site before disseminating to target organs (Barthold et al. 1993; Kern et al. 2011). Despite many studies on the mechanisms involved in *Borrelia* evasion from the immune system, little is known about interactions between *Borrelia*, skin microbiota and skin cells during the transmission process.

The skin is the human body's largest organ. It is constituted of different and unique ecological niches, which contain many commensal bacteria. Moreover, despite being a uniquely inhospitable environment, each square centimeter of our skin is home to approximately 10^6 bacteria (Grice et al. 2008). For years, these microorganisms have been considered to take advantage of the human host for nutrients. However, recent findings indicate that the skin microbiota is directly involved in the host immune response to fight invading pathogens. The commensal bacteria have direct antimicrobial capacity and provide factors which contribute to a protective immune responses in the skin (Di Domizio et al. 2016; Cogen et al. 2010). Host colonization is driven by the ecology of the skin surface, which is highly variable depending on topographical location, endogenous host factors and exogenous environmental factors (Grice and Segre 2011). Community composition is determined primarily by body habitat. Within habitats, interpersonal variability is high, whereas an individual exhibits minimal

temporal variability. Several skin locations harbor more diverse communities than the gut and mouth, and skin locations differ largely in microbiota composition (Costello et al. 2009). Some regions of the skin are partially occluded, such as the groin, axillary vault and toe web. These regions are warmer and wetter than the others, which facilitate the growth of microorganisms that thrive in moist conditions (for example, Gram-negative bacilli, coryneforms and *S. aureus*). The density of sebaceous glands is another factor that influences the skin microbiota, depending on the region. Areas with a high density of sebaceous glands, such as the face, chest and back, promote the growth of lipophilic microorganisms (for example, the bacterium *Propionibacterium* spp. and the yeast *Malassezia* spp.). Compared with other skin sites, arm and leg skin is relatively desiccated and experiences large fluctuations in surface temperature, and have fewer organisms than moist areas (Grice and Segre 2011).

Despite this great diversity, three genera seems to be key players in skin microbiota: *Staphylococcus* spp., *Propionibacterium* spp. and *Corynebacterium* spp. (Scharschmidt and Fischbach 2013). Staphylococci are Gram-positive cocci belonging to the Firmicutes and have long been recognized as members of the skin flora since they grow easily on laboratory culture plates. *S. epidermidis* is the most prevalent skin strain but many others including *S. hominis*, *S. capitis*, and *S. saprophyticus* are also present.

S. epidermidis is known to secrete many bacteriocins, such as Epilancin K7, Pep5 or Epidermin (Bastos et al. 2009), PSMs (Cogen et al. 2010) or Esp (Iwase et al. 2010). *P. acnes* is the best known member of this genus of Gram-positive anaerobic bacilli, since it is involved in *Acne vulgaris*. *P. acnes* tends to localize to hair follicles where oxygen content is low but can be cultured from the skin surface. *P. acnes* also produce antimicrobial peptides, like muropeptidases and lysosyme (Holland et al. 2010; Litzinger et al. 2010) but it seems that *P. acnes* is more specialized in increasing AMPs production by host's cells than producing its own antimicrobial molecules (Chronnell et al. 2001; Kim 2005; Nagy et al. 2005). Finally, *Corynebacterium* spp. is Gram-positive aerobes belonging to the Actinobacteria and are lipophilic bacteria. Not coincidentally, both sebum and the stratum corneum are rich in lipid components. Corynebacteria utilize them for nutrients as well as to generate corynomycolic acids that coat their cell surface (Scharschmidt and Fischbach 2013). *Corynebacterium* spp. secretes enzymes which lead to cytokines production by the host (Seo et al. 2016).

The aim of this study is to analyse the role of the microbiota on the inflammation induced by *Borrelia* in resident skin cells. To this end, we analyse the effect of the secretomes of *S. epidermidis*, *P. acnes* and *C. striatum* coincubated with *Borrelia* on KCs or FBs, to determine their potential role in the innate immune response against the pathogen. We tested by ELISA or qRT-PCR the induction of pro-inflammatory molecules secreted by resident skin cells and discussed the different pathways potentially involved in these responses.

Materials and methods

Cell cultures and stimulations

Human primary dermal fibroblasts (NHDF P4, Promocell GmbH) and Human primary keratinocytes from human foreskin (Paediatric Surgery service, Strasbourg Hospital), were maintained at 37°C in 75 cm² culture cell flasks with growing-cell culture media FGM2 (Promocell) or KGM-gold (Lonza), respectively. To stimulate the cells, fibroblasts and keratinocytes were used at passage 3 to 5 and seeded at 7,5 10⁴ per well in a 24-well plate. For fibroblasts stimulation, at confluence and one day before activation, FGM2 medium was replaced by FGM medium without foetal calf serum. For keratinocytes stimulation, cells were used at 80% confluence. Fibroblasts and keratinocytes were stimulated first by *S. epidermidis*, *P. acnes* or *C. striatum* secretomes at different concentrations (1 to 15 µg/L), diluted in the appropriate culture media (FGM or KBM-gold), for 6 and 24 hours. They were also stimulated by *B. burgdorferi* strain N40 alone at MOI of 100: 1 for 6 and 24 hours. Finally, FBs and KCs were co-stimulated by *B. burgdorferi* N40 and *S. epidermidis* or *P. acnes* or *C. striatum* secretomes at each concentration for 6 and 24 hours.

Bacterial cultures and secretome preparation

Clinical human bacterial strains were provided by the Laboratory of Bacteriology of Strasbourg Hospital. For each species, five strains from cutaneous samples were cultured separately in Mueller-Hinton broth at 37°C for 18 hours (anaerobic condition for *P. acnes* strains). Cultures were centrifuged at 10 000 rpm for 10 minutes then filtered with 0.20 µm filters (Nalgene Rapid-Flow). Sterile secretomes of each species were pooled and protein concentration was measured on ADVIA 2400 (Siemens).

B. burgdorferi ss strain N40 was used at passage 5 to 8, cultured in BSK-H medium (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) at 33°C and washed twice before the assays.

ELISA

IL-8 and TNF- α secretion was measured in supernatants of unstimulated and 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 and keratinocytes were directly suspended in RNA Lyser (Zymo Research) for RNA extraction according to the manufacturer's protocol. RNA purification was made on columns (Quick-RNA MiniPrep, The epigenetic company) and 1 μ g 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 an ABI PRISM 7500 (Applied Biosystem) with specific primers for IL-8, hBD-2, CXCL-1, SOD-2, TNF- α , MMP-3, MMP-12, MCP-1, as previously described (Schramm et al. 2012). 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The housekeeping gene used was β -actin (Schramm et al. 2012).

Statistics

For ELISA and QRT-PCR, each experiment of cell stimulation was carried out at least three times in independent experiments. Results are presented as means \pm standard error of mean (SEM) and were analyzed by a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's correction. Differences in values are considered significant at $p < 0.05$. For ELISAs, the data are the means \pm SEM 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 SEM of triplicate values were compared between stimulated and non-stimulated cells.

Results

S. epidermidis secretome strongly induces IL-8 secretion and expression by keratinocytes and fibroblasts, and is synergistic with *Borrelia*

As IL-8 is a key chemokine in innate immune response (Mukaida et al. 1998), we tested its production and expression by ELISA and qRT-PCR by KCs and FBs, at different concentrations of the different secretomes, in presence or absence of *Borrelia* (Figure 1).

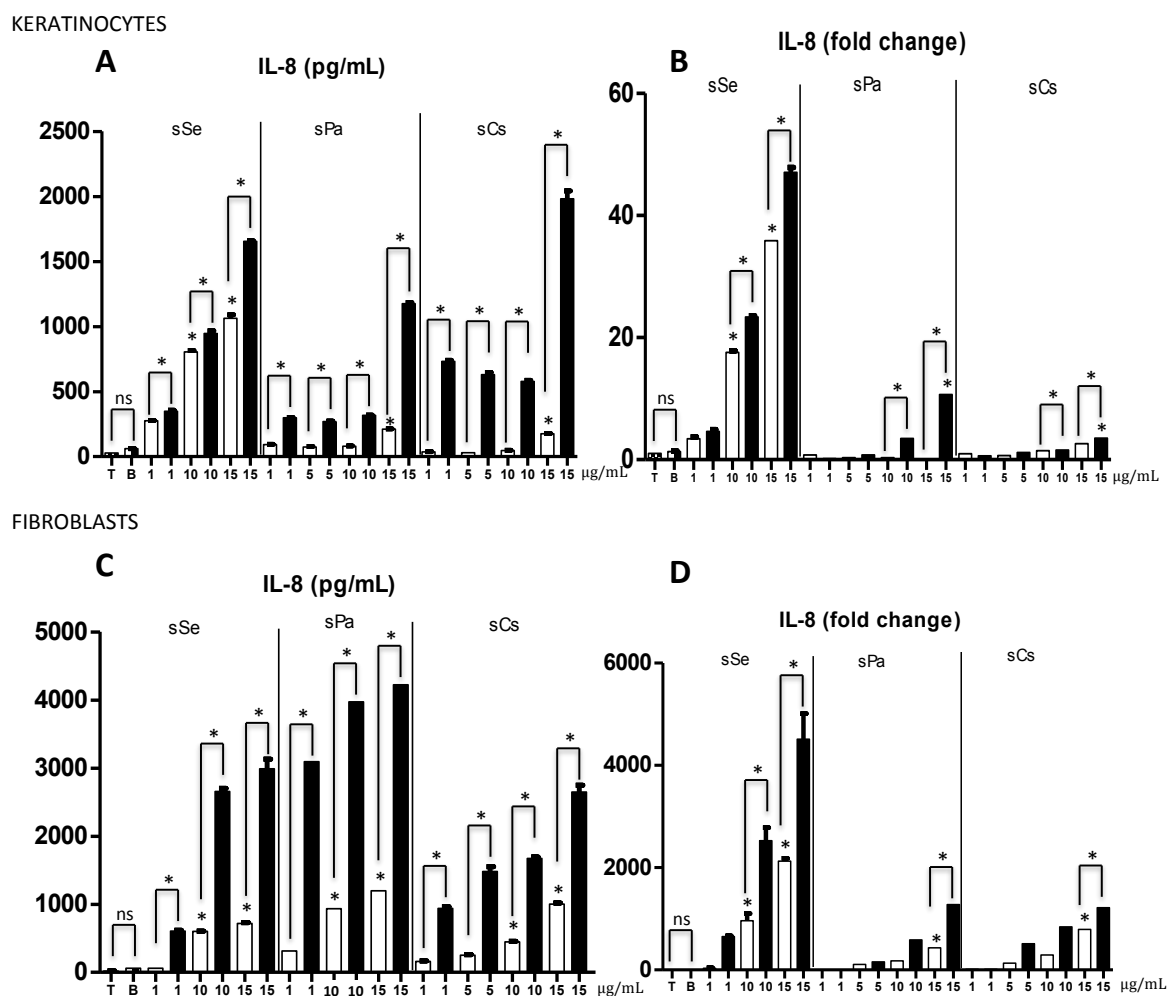


Figure 1: IL-8 production at 24 hours post-stimulation by secretome (white bars) or co-stimulation by secretome plus *Borrelia* (black bars) within keratinocytes, tested by ELISA (1A) and qRT-PCR (1B), or fibroblasts by ELISA (1C) or qRT-PCR (1D). sSe: secretome of *S. epidermidis*; sPa: secretome of *P. acnes*; sCs: secretome of *C. striatum*. *: significant difference ($p < 0,05$) with negative control (T: culture media only) or secretome alone. ns: non significant difference with negative control.

Stimulation of KCs and FBs by *Borrelia* alone showed no-significant differences with the negative control after 6 and 24 hours incubation. Stimulation with secretomes increased significantly the production of IL-8 by KCs and FBs, and these differences were observed by ELISA and qRT-PCR. *S. epidermidis* secretome (sSe) seemed to have a stronger activity on KCs than other secretomes, since its addition was followed by a strong IL-8 response, significant at 10 µg/mL sSe, and dose dependent. It reached 1022 pg/mL IL-8 for 15 µg/mL sSe. Analysed by qRT-PCR, the presence of sSe increased IL-8 expression by KCs up to 35 times the rate of the negative control. Other secretomes, sPa and sCs, showed less activity than sSe on KCs, but significant differences in IL-8 production or expression were observed for the concentration 15 µg/mL. Results on fibroblasts IL-8 production or expression were more constant. All secretomes caused a dose-dependant IL-8 expression and production, significant from 10 µg/mL. IL-8 levels were not different between the secretomes, but IL-8 expression was greater for sSe than for the others (p<0,05).

Clearly, a synergistic effect between commensal bacteria secretomes and *Borrelia* was observed on IL-8 induction and secretion by resident skin cells. This synergistic effect was observed for all secretomes tested, as these levels were greater than addition of secretome level plus *Borrelia* level, taken separately (p<0,05). KCs co-stimulation showed IL-8 levels 11.2 and 2 fold higher than sPa, sCs and sSe alone, respectively. Synergistic effect was stronger with FBs than KCs, with IL-8 levels reaching 4000 pg/mL IL-8 for 15 µg/mL sPa in presence of *Borrelia*, and only 2000 pg/mL IL-8 for 15 µg/mL sCs in presence of *Borrelia*. This effect was dose-dependant.

Commensal bacteria secretome shows different activities on hBD-2 and CXCL-1 expression by KCs

hBD-2 is a beta-defensin and CXCL-1 is a chemokine which is chemoattractant for neutrophils. Both are produced by KCs in response to microorganism detection by pattern recognition receptors (PRRs). We tested their expressions in presence of commensal bacteria secretomes and in presence or absence of *Borrelia* (Figure 2).

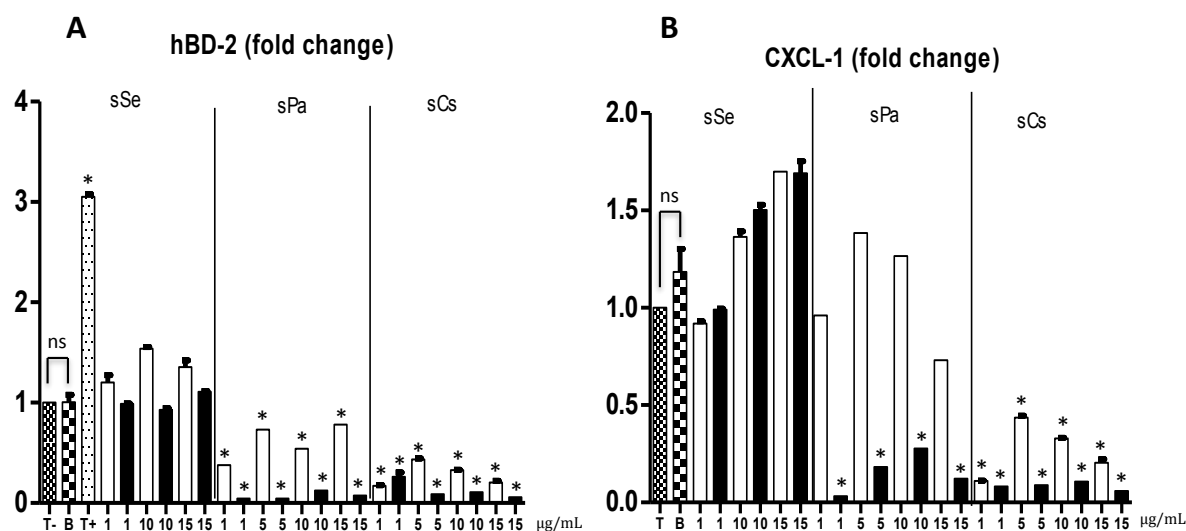


Figure 2: hBD-2 expression (A) and CXCL-1 expression (B) by KCs at 24 hours post stimulation by secretome (white bars) or co-stimulation by secretome plus *Borreliella* (black bars). T+: positive hBD-2 expression control (IL-1 β). *: significant difference ($p < 0,05$) with negative control (T: culture media only).

Borreliella did not induce hBD-2 expression by KCs. sSe stimulation alone and co-stimulation by sSe plus *Borreliella* did not induce hBD-2 expression by KCs. Interestingly, sPa and sCs decreased hBD-2 expression by KCs and co-incubation with *Borreliella* greatly accentuated this inhibition. sPa alone showed a 40-70% inhibition and sCs alone a 70-90% inhibition on hBD-2 expression levels. Addition of *Borreliella* potentiated this effect with a 90% inhibition of hBD-2 expression levels, from 1 $\mu\text{g/mL}$ sPa or sCs.

Similarly, *Borreliella* alone and sSe did not induce any effect on CXCL-1 expression by KCs. Unlike to hBD-2 expression, sPa did not inhibit CXCL-1 expression but sCs did, with a 50-80% inhibition. Co-incubation with *Borreliella* showed a great inhibition in CXCL-1 expression level, when it was co-incubated with sPa or sCs. Like hBD-2, this inhibition occurred already at 1 $\mu\text{g/mL}$ sPa or sCs.

So, secretomes showed different activity on hBD-2 and CXCL-1 expression by KCs, and addition of *Borreliella* to sPa and sCs greatly inhibited this expression.

Expression of LL37, the Human cathelicidin, was also tested, but no significant difference was observed (data not shown).

Commensal bacteria secretomes induces SOD-2 and CXCL-1 expression by FBs, and co-stimulation with *Borrelia* has an additive or synergistic effect

Super-Oxide-Dismutase-2 (SOD-2) is an iron/manganese enzyme involved in clearing ROS in FBs, and confers protection against cell death. We tested SOD-2 and CXCL-1 expression in presence of commensal bacteria secretomes and in presence or absence of *Borrelia* (Figure 3).

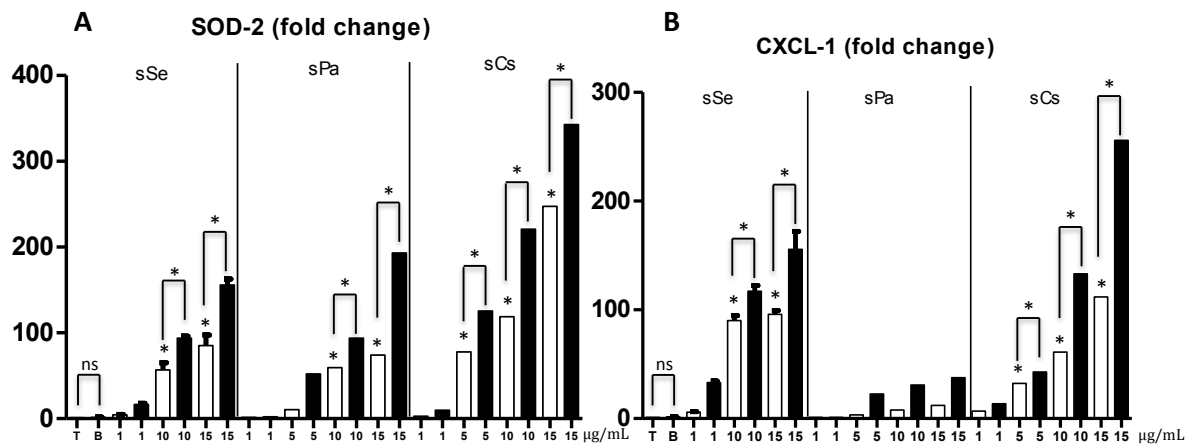


Figure 3: SOD-2 expression (A) and CXCL-1 expression (B) by FBs at 24 hours post stimulation by secretome (white bars) or co-stimulation by secretome plus *Borrelia* (black bars). *: significant difference ($p < 0,05$) with negative control or secretome alone (T: culture media only).

Stimulation with *Borrelia* alone did not affect SOD-2 or CXCL-1 expression by FBs. The three secretomes tested induced a dose-dependant SOD-2 expression, and were significant at 10 µg/mL for sSe, 5 µg/mL for sCs and 10 µg/mL for sPa. sCs seemed to be the best activator since highest levels of SOD-2 were observed with ($p < 0,05$). Co-stimulation with *Borrelia* showed various results. Co-stimulation of *Borrelia* with sSe showed only an additive effect, significant at 10 µg/mL. For the co-stimulation of *Borrelia* with sPa, an additive effect was observed at the concentration 10 µg/mL and a synergistic effect was observed at the concentration 15 µg/mL ($p < 0,05$). For co-stimulation of *Borrelia* with sCs, an additive effect was observed at the concentration 5 µg/mL and a synergistic effect at the concentrations 10 and 15 µg/mL ($p < 0,05$).

Various secretome activities were also observed with CXCL-1 expression by FBs. The three secretomes tested induced a dose-dependant CXCL-1 expression, significant for sSe and sCs (at concentrations 10 and 5 µg/mL, respectively), but not for sPa. Co-

stimulation with *Borrelia* showed only an additive effect for sSe, significant at 10 µg/mL, and an additive effect was observed for sCs at 5 µg/mL. At concentration 10 and 15 µg/mL sCs, a synergistic effect was observed ($p < 0,05$).

MMPs, TNF- α and MCP-1 expressions were also evaluated but no significant effect of the different secretomes was observed (data not shown).

Discussion

Skin interface plays a major role in vector-borne diseases (Bernard et al. 2015). Moreover, new data's show that skin microbiota is involved in cutaneous defence, and could educate the cutaneous immune system. The skin microbiota can cooperate with the host immune system to preserve tissue integrity (Belkaid and Tamoutounour 2016). The microbiota role has been shown in vector-borne diseases, like leishmaniasis. In a murine model, "germ-free" mice are not able to develop an effective immune response to the parasite, unlike "pathogen-free" mice, which had a commensal flora. Colonisation of "germ-free" mice by commensal microbiota restores the immune system, and controls the infection by recruitment of immune cells (Naik et al. 2015).

In addition to the skin microbiota, resident skins cells, KCs and FBs represent the first line against pathogens detection. KCs possess many PRRs, which detect microorganisms, and secrete many inflammatory or antimicrobial molecules (Frohm et al. 1997; Liang et al. 2006; Weaver et al. 2007; Nestle et al. 2009; Firat et al. 2014). FBs are dominant in the dermis and are involved mainly in erythema migrans production and homeostasis (Li and Wang 2011). Both are implicated in immune response against pathogens (Saalbach et al. 2007; Nestle et al. 2009), but little is known about the relationship between these cells and the skin microbiota in the context of Lyme borreliosis.

Our results show an important IL-8 response by KCs and FBs to the three commensal bacteria secretomes tested. It is known that *P. acnes* can trigger an IL-8 response by the KCs in *Acne vulgaris*, via a TLR2 and TLR4 dependant mechanism (Nagy et al. 2005; Schaller et al. 2005). Moreover, co-stimulation of cells by commensal secretomes plus *Borrelia* showed an important synergistic effect on IL-8 expression and production, while stimulation by *Borrelia* alone did not differ from negative control. It is possible that *Borrelia* and commensal bacteria secretomes activate IL-8

expression by different ways. According to the receptor activated, two different ways lead to IL-8 production, IRAK/TRAFF6 or RIP2. IRAK/TRAFF6 lead to activation of NF- κ B pathway and RIP2 activates the transcription factor AP1. *Borrelia* is recognized by the host cells through TLRs and NLRs. TLR2, which heterodimerizes with TLR1 to recognize triacetylated lipoproteins, seems to be central to the induction of many inflammatory cytokines (Radolf et al. 2012). It results in activation of MAPK pathways, translocation of NF- κ B into the nucleus, and subsequent production of many inflammatory molecules (Radolf et al. 2012). Bacterial compounds can also activate TLR2 in human KCs (Pivarcsi et al. 2003), and activation of TLR2 by *Borrelia* and these bacterial compounds could be additive in IL-8 production. The synergistic activity may be explained by the binding capacity of *Borrelia* to CD14 (Cabral et al. 2006). CD14 is the cofactor of TLR4, which is not bound by *Borrelia*. TLR4 is involved in necroptosis, which is a programmed form of necrotic cell death (Pasparakis et al. 2014). This mechanism is important in *Acne vulgaris*, where an upregulation of TLR4 expression is observed, with an over growth of *P. acnes* and an overrepresentation of *S. epidermidis* (Gallo and Nakatsuji 2011). Stimulation of TLR4 by microbiota secretomes, and activation of CD14 by *Borrelia*, may greatly induce expression and production of inflammatory molecules like IL-8.

Finally, IL-8 is a chemokine involved in neutrophil recruitment. Synergistic activity observed between secretomes and *Borrelia* may help the host to control infection. *Borrelia* is sensitive to neutrophil response when it is stimulated (Xu et al. 2007), since they are able to trap *Borrelia* by NETosis, and produce molecules that are bactericidal against the spirochaete (H₂O₂, LL37 or elastase for example) (Lusitani et al. 2002).

KCs stimulation by secretomes showed various activities. sSe seems to not affect the hBD-2 and CXCL-1 expression in our experimentations, while literature have shown that *S. epidermidis* is able to induce expression of hBDs in Human KCs via a small molecule <10 kDa in a TLR2 dependant mechanism. Co-cultivation of differentiated human primary keratinocytes with live *S. epidermidis*, but not heat-inactivated bacteria, enhances production of hBD-2, hBD-3, and RNase7 (Gallo and Nakatsuji 2011). In our experiments, we used sterile-filtered commensal secretomes and not entire bacteria. This may explain these differences.

sPa and sCs greatly inhibited hBD-2 expression. It has been showed that distinct strains of *P. acnes* induce hBD-2 expression, but not all strains (Nagy et al. 2005). It is possible that our *P. acnes* strains did not induce hBD-2 expression. But like with *S. epidermidis*, we used only sterile-filtered secretomes and utilization of whole bacteria may give different results. *P. acnes* secretome contains approximately 20 proteins, and the majority are involved in tissue degradation, including glycoside hydrolases with similarities to endoglycoceramidase, β -N-acetylglucosaminidase and muramidase; esterases such as lysophospholipase and triacylglycerol lipase; and several proteases (Holland et al. 2010). No data in literature suggest an anti-inflammatory activity of *P. acnes* and *C. striatum* secretomes but few studies exist.

Co-stimulation by sPa and sCs with *Borrelia* showed a great inhibition of hBD-2 and CXCL-1 expression. We do not explain this activity yet, and an analysis of secretome fractions will help our understanding of this phenomenon. Besides, this phenomenon could be important in the disease, since inhibition of innate immunity like hBDs secretion may help the spirochaete to disseminate or stay in the skin.

Stimulation of FBs by secretomes showed a dose-dependant expression of SOD-2 and CXCL-1, and an additive or synergistic effect was observed with the presence of *Borrelia*. It is known that the lipoprotein OspA and OspC (TLR2/1 agonist) activate NF- κ B pathway in FBs and results in subsequent production of cytokines (Ebnet et al. 1997; Bernard et al. 2016). Moreover, recent data showed that CXCL-1 and SOD-2 is overexpress by FBs in presence of *Borrelia* (Meddeb et al. 2016). As *S. epidermidis* and *P. acnes* also bind to TLR2, the additive effect may be explained.

These data are preliminary and needs to be reproduced and completed. We are currently working on different fractions produced by HPLC to identify the molecules involved in IL-8 secretion.

Bibliography

- Barthold, SW, de Souza, MS, Janotka, JL, *et al.* (1993). Chronic Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *Am J Pathol* 143: 959–71.
- Bastos, MCF, Ceotto, H, Coelho, ML V, *et al.* (2009). Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol* 10: 38–61.

- Belkaid, Y, Tamoutounour, S (2016). The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol* 16: 353–66.
- Bernard, Q, Gallo, RL, Jaulhac, B, *et al.* (2016). *Ixodes* tick saliva suppresses the keratinocyte cytokine response to TLR2/TLR3 ligands during early exposure to Lyme borreliosis. *Exp Dermatol* 25: 26–31.
- Bernard, Q, Jaulhac, B, Boulanger, N (2014). Smuggling across the Border: How Arthropod-Borne Pathogens Evade and Exploit the Host Defense System of the Skin. *J Invest Dermatol* 134: 1211–9.
- Bernard, Q, Jaulhac, B, Boulanger, N (2015). Skin and arthropods: an effective interaction used by pathogens in vector-borne diseases. *Eur J Dermatol* 25 Suppl 1: 18–22.
- Cabral, ES, Gelderblom, H, Hornung, RL, *et al.* (2006). *Borrelia burgdorferi* lipoprotein-mediated TLR2 stimulation causes the down-regulation of TLR5 in human monocytes. *J Infect Dis* 193: 849–59.
- Chronnell, CMT, Ghali, LR, Ali, RS, *et al.* (2001). Human β defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: Upregulation in *acne vulgaris* lesions. *J Invest Dermatol* 117: 1120–5.
- Cogen, AL, Yamasaki, K, Muto, J, *et al.* (2010). *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus. *PLoS One* 5: e8557.
- Costello, EEK, Lauber, CCL, Hamady, M, *et al.* (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* (80-) 326: 1694–7.
- Di Domizio, J, Pagnoni, A, Huber, M, *et al.* (2016). [The skin microbiota: a colossus steps into the spotlight]. *Rev médicale suisse* 12: 660–4.
- Ebnet, K, Brown, KD, Siebenlist, UK, *et al.* (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: 3285–92.
- Firat, YH, Simanski, M, Rademacher, F, *et al.* (2014). Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PLoS One* 9: e93941.
- Frischknecht, F (2007). The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell Microbiol* 9 (7): 1630-1640.
- Frohm, M, Agerberth, B, Ahangari, G, *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: 15258–63.
- Gallo, RL, Nakatsuji, T (2011). Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. *J Invest Dermatol* 131: 1974–80.
- Grice, E a, Segre, J a (2011). The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9: 244–53.
- Grice, EA, Kong, HH, Renaud, G, *et al.* (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res* 18: 1043–50.
- Holland, C, Mak, TN, Zimny-Arndt, U, *et al.* (2010). Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. *BMC Microbiol* 10: 230.
- Iwase, T, Uehara, Y, Shinji, H, *et al.* (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465: 346–9.
- Kern, A, Collin, E, Barthel, C, *et al.* (2011). Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of lyme disease. *Vector borne zoonotic Dis Larchmont NY* 11: 1343–50.
- Kim, J (2005). Review of the innate immune response in *acne vulgaris*: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology* 211 (3): 193-8.
- Lane, RS, Piesman, J, Burgdorfer, WCN-2123 (1991). Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Ann Rev Entomol* 36: 587–609.
- Li, B, Wang, JHC (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *J Tissue Viability* 20: 108–20.
- Liang, SC, Tan, X-Y, Luxenberg, DP, *et al.* (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203: 2271–9.
- Litzinger, S, Duckworth, A, Nitzsche, K, *et al.* (2010). Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J Bacteriol* 192: 3132–43.
- Lusitani, D, Malawista, SE, Montgomery, RR (2002). *Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components. *J Infect Dis* 185: 797–804.
- Mukaida, N, Harada, A, Matsushima, K (1998). Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 9 (1): 9-23.

- Nagy, I, Pivarcsi, A, Koreck, A, *et al.* (2005). Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 124: 931–8.
- Naik, S, Bouladoux, N, Linehan, JL, *et al.* (2015). Commensal–dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* 520: 104–8.
- Nestle, FO, Di Meglio, P, Qin, J-Z, *et al.* (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679–91.
- Pasparakis, M, Haase, I, Nestle, FO (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14: 289–301.
- Pivarcsi, A, Bodai, L, Rethi, B, *et al.* (2003). Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 15: 721–30.
- Radolf, JD, Caimano, MJ, Stevenson, B, *et al.* (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 10: 87–99.
- Saalbach, A, Klein, C, Sleeman, J, *et al.* (2007). Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells. *J Immunol* 178: 4966–74.
- Schaller, M, Loewenstein, M, Borelli, C, *et al.* (2005). Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with *Propionibacterium acnes* and coproporphyrin III. *Br J Dermatol* 153: 66–71.
- Scharschmidt, TC, Fischbach, MA (2013). What lives on our skin: Ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discov Today Dis Mech* 10 (3-4): e83-e89.
- Schramm, F, Kern, A, Barthel, C, *et al.* (2012). Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *PLoS One* 7: e40046.
- Seo, H, Kim, S, Sagong, H, *et al.* (2016). Structural basis for cytokinin production by LOG from *Corynebacterium glutamicum*. *Sci Rep* 10: 31390.
- Stanek, G, Wormser, GP, Gray, J, *et al.* (2012). Lyme borreliosis. *Lancet* 379: 461–73.
- Weaver, CT, Hatton, RD, Mangan, PR, *et al.* (2007). IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages Key Words. *Annu Rev Immunol* 25: 821–52.
- Xu, Q, Seemanapalli, S V, Reif, KE, *et al.* (2007). Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. *J*

Immunol 178: 5109-15.

Discussion et perspectives

La première partie de cette thèse consistait à analyser le rôle de la peau dans la persistance de *Borrelia* sur un modèle murin de borréliose de Lyme.

Le choix de la peau comme sujet d'étude dans le contexte de la borréliose de Lyme a été guidée par plusieurs raisons. La peau est une interface majeure dans les infections vectorielles. C'est sur ce site anatomique que se rencontrent les trois acteurs impliqués : l'hôte vertébré, l'arthropode vecteur et le pathogène. Le vecteur (insectes ou tiques), est dans un premier temps attiré par les composés organiques volatiles produits par le microbiote cutané (De Jong and Knols 1995; Verhulst et al. 2011). Ensuite, le vecteur, en se servant de ses pièces piqueuses, va pénétrer à l'intérieur du tissu cutané pour effectuer son repas sanguin. Au décours de celui-ci, il va pouvoir co-injecter avec sa salive le pathogène. Il en résulte la création d'un site cutané particulier où de multiples interactions coexistent entre le pathogène, les cellules résidentes et immunitaire de la peau et la salive de la tique. La salive joue à ce niveau un rôle primordial par ses capacités pharmacologiques et immunomodulatrices (Simo et al. 2017). Suite à la transmission, le pathogène va utiliser le tissu cutané comme une zone privilégiée pour se multiplier et/ou persister (Guilbride et al. 2012).

De multiples exemples montrent la capacité des pathogènes transmis par un arthropode vecteur à persister dans le tissu cutané. Cet aspect est d'ailleurs indispensable pour que le pathogène puisse être prélevé par le vecteur au cours des cycles naturels de transmission de ces microorganismes. Dans le cas de la leishmaniose, maladie causée par un flagellé du genre *Leishmania* et transmis par le diptère *Phlebotomus* ou *Lutzomia*, la forme promastigote du parasite va infecter rapidement les polynucléaires neutrophiles cutanés, induisant leur apoptose. Ensuite, les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages où le parasite va pouvoir contourner le système immunitaire et se multiplier sous la forme amastigote, entraînant la formation d'une lésion cutanée localisée pouvant perdurer plusieurs semaines (Peters et al. 2008; Ribeiro-Gomes et al. 2012). Dans le cas du paludisme, 50% des formes sporozoïtes injectés vont persister au niveau cutané à l'intérieur des follicules pileux où ils peuvent se transformer en mérozoïtes infectieux pour les érythrocytes (Gueirard et al. 2010). Cette persistance cutanée pourrait être responsable d'une tolérance immunitaire vis-à-

vis de ce parasite¹⁷² (Guilbride et al. 2012). Le virus de la Dengue (flavivirus) profite également du tissu cutané pour se multiplier. Le virus est capable non seulement d'infecter les cellules dendritiques mais également les kératinocytes et les fibroblastes (Bustos-Arriaga et al. 2011; Surasombatpattana et al. 2012). La forte proportion de ces cellules au niveau cutané permet au virus de se multiplier intensément avant l'induction d'une forte réponse immunitaire par les cellules immunitaires spécialisées. De plus, la salive du moustique du genre *Aedes* diminue la production par les kératinocytes des peptides antimicrobiens, facilitant la réplication du virus (Surasombatpattana et al. 2012).

Dans la borréliose de Lyme, la peau est le premier organe touché, avec l'apparition d'un érythème migrant (Stanek et al. 2012). Le pathogène est capable de se multiplier rapidement dans celle-ci (Hodzic et al. 2003; Kern et al. 2011), et les cellules résidentes, kératinocytes et fibroblastes, sont impliqués dans le processus infectieux (Marchal et al. 2009; Brisson et al. 2011). Plusieurs études ont ainsi montré la capacité de *Borrelia*, d'abord à se multiplier puis à persister dans la peau tout en conservant sa viabilité (Liang et al. 2004a; Kern et al. 2015). La peau est enfin suspectée de jouer un rôle de filtre pour la bactérie en sélectionnant des clones virulents avant de disséminer vers les organes cibles (Brisson et al. 2011; Rego et al. 2014). Aux stades tardifs de la pathologie, la peau est également touchée avec l'apparition chez l'homme d'ACA.

La peau est donc un organe particulier dans la borréliose de Lyme, de la transmission du pathogène aux formes cutanées tardives, et c'est dans ce contexte que nous l'avons choisie comme modèle d'étude.

Plusieurs modèles animaux existent pour l'étude de la borréliose de Lyme (voir ce chapitre page 46) : la souris, le rat (Barthold et al. 1993), le lapin (qui, comme l'être humain, peut présenter un EM) (Folley et al. 1995), le chien (Straubinger et al. 1997), ou le macaque rhésus qui développe des manifestations précoces localisées et disséminées, mais dont les contraintes techniques et éthiques en limite l'utilisation à des fins de recherche. Le modèle le plus utilisé est la souris de type C3H/HeN, qui est la souris la plus sensible à l'infection par *Borrelia* (Barthold et al. 1990), et qui développe de sévères atteintes articulaires et cardiaques. Ce modèle permet en outre d'explorer la

¹⁷² L'immunisation par fortes doses de sporozoïtes atténués et injectés par voie intradermique réduit considérablement leur pouvoir protecteur par rapport à une injection intraveineuse. Cette tolérance serait liée à l'induction des lymphocytes T_{reg} par les parasites présents dans la peau.

transmission et la dissémination de la bactérie. Néanmoins, ce modèle ne développe ni EM ni ACA, qui sont pourtant des manifestations importantes chez l'homme.

Bien que ce modèle soit imparfait, il a été montré que des cultures de peaux de souris infectées par *Borrelia* étaient possibles jusqu'à 360 jours après l'infection (Barthold et al. 1993), ce qui en faisait un modèle intéressant pour nos expérimentations.

Le choix des souches de *Borrelia* utilisées a été basé sur plusieurs raisons : (1) Parmi les souches de *Borrelia* responsables de la pathologie chez l'homme, les souches de *B. burgdorferi* ss sont détectées en Europe, mais également en Asie et aux Etats-Unis, faisant de ces souches un modèle ubiquiste. (2) Deux souches de *B. burgdorferi* ss sont largement employées dans l'étude de la borréliose de Lyme, la souche N40 et la souche B31. Ces deux souches, isolées initialement de tiques *I. scapularis*, sont hautement infectieuses chez la souris (Burgdorfer et al. 1982; Barthold et al. 1988b). Néanmoins, il a été montré que sur le modèle murin C3H/HeN, la souche N40 était plus infectieuse pour de faibles inocula que la souche B31 (Chan et al. 2012). La souche N40 présente donc l'intérêt de pouvoir travailler avec des inocula proches de ceux observés dans la nature. (3) La souche de *B. burgdorferi* ss N40 est facilement cultivable sur milieux BSK-H. Par la suite, les résultats obtenus dans nos études étant prometteur, nous avons élargi le panel d'espèces utilisées aux souches de *B. afzelii* NE4049 (isolée d'EM) et de *B. garinii* PBI. Ce panel nous permettait alors de couvrir les trois espèces principales de *Borrelia* responsables de la borréliose de Lyme en Europe.

Nous avons ensuite choisi deux voies d'infection par le spirochète, une naturelle (via la tique), et une artificielle (via l'injection à la seringue). L'infection des souris par des nymphes positives permettait de se rapprocher au maximum du cycle naturel de la maladie. L'infection par injection permettait quant à elle de maîtriser la dose infectieuse afin de limiter au maximum les fluctuations dans nos expérimentations.

Ce modèle nous a permis de développer une infection disséminée (J40), puisque toutes les cultures de peaux, mais également la majorité des cultures articulaires et cardiaques étaient positives après ce délai. L'utilisation de l'injection intra-péritonéale nous a en outre permis de confirmer le tropisme de *Borrelia* pour le tissu cutané. Nous n'avons pas étudié les voies de dissémination de la bactérie à partir du péritoine, mais il paraît vraisemblable qu'elle soit hématogène, puisque les cultures articulaires et cardiaques étaient également positives 40 jours après l'infection, signant une

dissémination globale du pathogène chez la souris. Ces données étaient par ailleurs cohérentes avec celles décrites dans la littérature (Barthold et al. 1991a, 1993).

Enfin, nous avons montré la persistance de *Borrelia* dans la peau en faisant se nourrir des tiques naïves sur souris infectées. La transmission rapide (dès 8h), et le taux d'infection élevé (80% à 5 jours), confirme cette persistance cutanée de la bactérie en absence de bactériémie. Notre modèle murin est donc cohérent avec les données d'études antérieures (Shih et al. 1992, 1995; Gern et al. 1993) et adéquat pour des expérimentations ultérieures.

Le problème actuel principal de la borréliose de Lyme réside dans le manque de tests disponibles pour d'une part, diagnostiquer biologiquement la maladie à la phase précoce, et d'autre part d'identifier les infections actives tardives et les réinfections. La sérologie, non recommandée au début de la maladie car souvent négative, ne permet pas, aux stades disséminés, de différencier une infection active d'une infection guérie (cicatrice sérologique) ou d'une réinfection. La culture et les techniques moléculaires possèdent une faible sensibilité dans les tissus cutanés. Développer de nouvelles techniques sensibles et spécifiques, permettant la mise en évidence de *Borrelia* persistantes et vivantes dans les tissus est donc un enjeu majeur de la recherche sur la borréliose de Lyme.

Le choix d'une technique par protéomique s'est fait sur la base de travaux antérieurs de l'équipe, qui à, grâce à la Ge-LC-MS/MS (technique de protéomique non ciblée), puis à la SRM-MS (technique de protéomique ciblée), avait permis l'identification de protéines de *Borrelia* à la phase précoce de l'infection, sur modèle murin mais également à partir de biopsies humaines d'EM (Schnell et al. 2015b). Cette technique permettait l'identification à partir de biopsies de peaux murines de 25 protéines de *Borrelia*, parmi 1400 protéines de souris. Parmi ces protéines retrouvées, certaines étaient très intéressantes, comme la flagelline, moteur de la mobilité de la bactérie (Li et al. 2002; Charon et al. 2009), mais aussi OspC, lipoprotéine essentielle dans la transmission précoce de la bactérie (Kenedy et al. 2012), ou encore DbpA, facteur d'adhésion de la bactérie à la matrice extra-cellulaire (Parveen et al. 2003).

Fort de cette expérience, nous avons tenté d'utiliser cette technique prometteuse à la phase tardive de la maladie.

La principale différence entre la phase précoce de la maladie et la phase tardive réside dans le taux de bactéries présentes dans la peau. A la phase précoce, le taux de bactéries présentes dans la peau est élevée, avec un pic de multiplication du spirochète à 7 jours post-infection (Kern et al. 2011), jusqu'à 10^3 bactéries par mg de tissu. A la phase tardive de la maladie, ce taux est beaucoup plus faible, ce qui a entraîné des résultats négatifs par PCR.

Pour palier ce déficit, nous avons décidé d'utiliser un dermocorticoïde topique puissant, le clobetasol. L'utilisation de cette molécule pendant 48h a permis une multiplication intense de la bactérie au niveau cutané. L'usage pendant uniquement 48h était volontaire, afin d'éviter une réactivation systémique de la bactérie, ce qui a été démontré par l'absence de culture sanguine positive après l'application de la molécule. L'absorption percutanée de corticostéroïdes appliqués topiquement peut entraîner une disponibilité systémique (Levin and Maibach 2002). Toutefois, suite à une application topique du clobétasol dans la plupart des régions de la peau normale, seules de petites quantités de médicament semblent atteindre le derme et ensuite la circulation systémique avec la dose habituelle (données humaines). L'absorption systémique peut être augmentée lorsque la dose habituelle est dépassée ou lorsque la peau est inflammatoire ou malade (American Society of Health-System Pharmacists 2011).

Cette réactivation peut s'expliquer par deux mécanismes. D'une part, le clobetasol, en tant que corticoïde, permet d'obtenir une immunosuppression locale donnant à la bactérie un milieu propice pour s'y multiplier, et d'autre part, par son action vasoconstrictive (Schalla and Schorning 1991), elle pourrait abaisser légèrement la température cutanée, améliorant la multiplication du spirochète (la température optimale de multiplication de *Borrelia* est de 33°C). Par ailleurs, l'utilisation de corticoïde dans le milieu de culture de *Borrelia* ne modifie pas le taux de croissance de la bactérie, permettant d'exclure une activité directe de la molécule sur le spirochète. Enfin, cette multiplication intense de la bactérie après application de dermocorticoïde pourrait avoir un impact clinique, certains médecins prescrivant ces dermocorticoïdes sur des lésions pouvant être des EM, ce qui pourrait faciliter *a posteriori* le développement de la maladie.

Cet artifice technique nous a permis de détecter par Ge-LC-MS/MS plusieurs protéines de *Borrelia*, parmi 4500 protéines de souris, et différentes de celles trouvées à la phase précoce. Parmi ces protéines, la protéine VlsE est très intéressante,

puisqu'elle est surexprimée à la phase tardive de la maladie, et est impliquée dans l'échappement immunitaire de *Borrelia* (Ohnishi et al. 2001; Liang et al. 2004b). Ensuite, grâce à l'utilisation d'analyse protéomique ciblée (SRM-MS), il a été possible de détecter ces protéines et de les quantifier dans la peau de souris.

Nous avons donc désormais à notre disposition une technique de protéomique ciblée, permettant de détecter des protéines spécifiques de *Borrelia* dans la peau de souris, à la phase tardive de la maladie. La suite logique de cette étude est de tester cette technique sur des peaux humaines, ce qui devrait peut être permettre de distinguer les infections précoces des infections tardives (les protéines détectées n'étant pas les mêmes). Un PHRC (Projet Hospitalier de Recherche Clinique) est actuellement en cours pour l'évaluation chez l'homme de cette technique dans le diagnostic précoce de la maladie. Par la suite, cette technique pourrait être pertinente dans la détection de *Borrelia* à la phase disséminée de la maladie et à d'autres pathogènes transmis par des arthropodes vecteurs et persistants dans la peau. Comme nous l'avons dit précédemment, plusieurs pathogènes transmis par les tiques ou les moustiques sont capables de persister dans la peau, pendant une durée plus ou moins longue. Le développement d'une technique de SRM-MS multiplex, ciblant l'ensemble de ces pathogènes est donc envisageable.

La deuxième partie de cette thèse s'est intéressée aux relations entretenues entre les cellules résidentes de l'épiderme et du derme, KCs et FBs, avec le sécrétome de trois bactéries commensales, *S. epidermidis*, *P. acnes* et *C. striatum*, en présence ou en absence de *Borrelia*.

Les KCs sont les cellules résidentes principales de l'épiderme. Nous avons choisi d'étudier la réponse des KCs 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 KCs sont de véritables cellules sentinelles de l'interface cutanée : les PRRs 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 al. 2009).

Les FBs, quant à eux, sont les cellules principales du derme. Lors de la piqûre de la tique, celle-ci rentre profondément dans le derme et les FBs se retrouvent en contact direct avec les spirochètes dans ce qui est appelé le « feeding pool » (Radolf et al. 2012). Ces cellules, dont le rôle principal est le remodelage du tissu cutané, sont également associées au système immunitaire en tant que cellule sentinelle.

L'abondance de bactéries commensales au niveau cutané pose la question de leurs relations avec l'hôte colonisé. Pendant longtemps, il a été communément pensé que les germes commensaux exploitaient les ressources nutritives de l'hôte dans leur propre intérêt. Il est désormais admis que l'hôte bénéficie largement de cette colonisation dans la lutte contre les pathogènes. Cette protection passe par deux principaux mécanismes (Di Domizio et al. 2016). D'une part, les commensaux entrent en compétition avec les pathogènes pour les nutriments et l'espace disponible, et d'autre part, les commensaux peuvent produire directement des bactériocines, capables d'agir comme de véritables antibiotiques (Gallo and Nakatsuji 2011).

A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée au rôle du microbiote cutané dans la transmission de la maladie de Lyme, et sur son rôle potentiellement inhibiteur ou facilitateur sur l'infection par *Borrelia*. La constatation première est que 80-90% des personnes piquées par des tiques infectées par *Borrelia* ne développent pas de Borréliose de Lyme (Hofhuis et al. 2013, 2017). Le microbiote cutané, par l'éducation du système immunitaire, pourrait jouer un rôle important dans la résolution naturelle de l'infection. Ce point reste à démontrer.

Parmi les 1800 genres bactériens présents dans le microbiote cutané, trois genres sont prépondérants : *Staphylococcus* spp., *Propionibacterium* spp. et *Corynebacterium* spp. Nous avons décidé d'utiliser *S. epidermidis*, espèce majoritaire du microbiote cutané, *P. acnes*, majoritaire dans les zones sébacées et *C. striatum*, majoritaire des zones humides avec les *Staphylococcus*. Nous avons décidé d'utiliser les sécrétomes de ces trois bactéries plutôt que les bactéries entières pour une raison simple. La co-culture de KCs ou de FBs avec des bactéries vivantes entraîne la destruction de celles-ci, ne permettant pas une analyse fine des relations entretenues entre elles. De plus, l'idée étant de co-incuber cet ensemble avec *Borrelia*, l'utilisation de bactéries entières aurait également été en défaveur du spirochète, qui possède un temps de multiplication beaucoup plus lent que nos commensaux. Enfin, la littérature montre que le sécrétome de ces bactéries, au moins pour *S. epidermidis* qui est le plus

étudié, possède des capacités immunomodulatrices et peut interférer avec l'infection par certains pathogènes (Otto et al. 1999; Iwase et al. 2010; Gallo and Nakatsuji 2011; Bennallack et al. 2014; Wang et al. 2014) (voir paragraphe C. 2. Rôle du microbiote cutané sur l'immunité p85).

Nos résultats préliminaires montrent que les sécrétomes de ces trois bactéries entraînent une forte réponse IL-8 de la part des KCs et des FBs. De plus, il existe une synergie d'activité entre ces sécrétomes et *Borrelia*. Nous ne savons pas à l'heure actuelle quelles sont les molécules responsables dans les divers sécrétomes de cette activité. Une analyse des fractions de ces sécrétomes est en cours, et les premiers résultats montrent que seules certaines fractions entraînent une surexpression d'IL-8 par les KCs (fractions 25, 26, 27, 33, 36, 38, 123, 126 et 127 sur les 143 fractions testées). A priori, la proximité de rétention de certaines fractions permettraient de les regrouper en trois groupes : 25, 26 et 27 ; 33, 36 et 38 et enfin 123, 126 et 127. Il existerait donc au moins 3 molécules différentes responsables de la surexpression d'IL-8 par les KCs. Cette surexpression d'IL-8 pourrait être bénéfique pour l'hôte, dans la mesure où il s'agit d'un chimioattractant des neutrophiles, qui possède un effet bactéricide sur *Borrelia* (Lusitani et al. 2002).

L'activité des sécrétomes s'est montrée homogène vis-à-vis des fibroblastes. Une surexpression dose-dépendante de CXCL-1 et de SOD-2 a été montrée, ce qui conforte l'idée que les fibroblastes possèdent un rôle de sentinelle dans l'immunité innée cutanée. La présence de signaux de danger, ou alarmines, entraîne une réponse par les FBs qui serait favorable à l'hôte en augmentant le chimiotactisme des cellules immunitaires spécialisées, tout en évitant des dégâts tissulaires importants par diminution des espèces réactives de l'oxygène présentes.

L'activité des sécrétomes s'est par contre montrée variée vis-à-vis de la production d'hBD-2 et de CXCL-1 par les KCs. Si le sécrétome de *S. epidermidis* n'entraîne pas d'effet visible, les sécrétomes de *P. acnes* et de *C. striatum* semblent inhiber fortement leur expression. Cet effet était également synergique en présence de *Borrelia*. Ici encore, une analyse des fractions nous permettra de comprendre les mécanismes mis en jeu. Dans ce cas précis, cette inhibition pourrait être bénéfique au pathogène, en diminuant les capacités de défense de l'hôte. De plus, ceci nous confirme le rôle important des KCs dans l'immunité innée, qui répondraient de manière différentes selon les divers stimuli bactériens présents.

La présence de réponses tantôt favorable à l'hôte, tantôt au pathogène, montre la complexité et l'équilibre existant entre ces différentes entités, dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Une étude fine des divers mécanismes et des molécules mis en jeu nous permettra à l'avenir de mieux comprendre cette pathologie. De plus, les variations du microbiote existantes entre différents individus pourraient expliquer des sensibilités différentes aux piqûres de tiques puis dans la transmission de la maladie.

Dans nos expérimentations, nous n'avons pas, afin de simplifier le modèle *in vitro*, utilisé la salive de la tique. Celle-ci possédant de multiples effets pharmacologiques et immunomodulateurs (Kazimírová and Stibrániová 2013; Simo et al. 2017), devra être testée pour étudier son activité sur les KCs et les FBs, en présence des sécrétomes des bactéries commensales. Il a été montré que la salive de la tique possédait une activité suppressive sur la production de cytokines et de peptides antimicrobiens par les KCs en présence de *Borrelia* (Marchal et al. 2011; Bernard et al. 2016). A l'inverse, sur les FBs, la salive de la tique semble posséder des effets pro-inflammatoires en augmentant leur production d'IL-8 et d'IL-6 (Scholl et al. 2016). Aucune étude n'a encore étudié l'activité de la salive de tique en présence du microbiote cutané. Notre modèle, en utilisant les sécrétomes de diverses bactéries commensales, est tout indiqué pour ces études futures.

Enfin, un autre aspect du microbiote cutané est impliqué dans les maladies vectorielles. Il a été montré que les bactéries commensales, par la production de molécules issues de leur métabolisme, possèdent un rôle attractif sur le vecteur (De Jong and Knols 1995). Ceci a été relativement bien étudié chez le moustique *Anopheles*, montrant que d'une part, des cultures de bactéries commensales sur gélose sont attractives chez ce moustique (Verhulst et al. 2009), et d'autre part, la densité cutanée en *Staphylococcus* spp. et en *Pseudomonas* spp. sur la peau de patients sains est directement corrélée à l'attractivité de la peau sur ces moustiques (Verhulst et al. 2011). Aucune étude ne s'est intéressée au rôle attractif du microbiote cutané chez la tique. Une étude pilote, menée par notre équipe en collaboration avec des forestiers de l'ONF Alsace, nous a permis sur une année de suivi, de montrer que certains de ces forestiers attirent statistiquement plus les tiques que d'autres. Il est prévu d'élargir la cohorte de personnes aux personnels de l'ONF Nord-Est afin d'obtenir une puissance suffisante pour étudier le microbiote cutané des personnes faiblement attractives et fortement attractives, par séquençage à haut débit de type « Shotgun ». Cette étude complètera notre compréhension du rôle général du microbiote dans les maladies à transmission

vectorielle : (1) Rôle à distance, en analysant le rôle du métabolome des bactéries commensales sur l'attractivité des tiques. (2) Rôle au niveau de la peau, dans la transmission directe de *Borrelia* lors de la piqûre d'une tique infectée. Nous prévoyons également d'établir un modèle murin C3H/HeN pour analyser le rôle du microbiote cutané.

Bibliographie

- Adeolu, M, Gupta, R (2014). A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members o. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105: 1049–72.
- Afzelius, A (1910). Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. *Arch Dermatol Syph* 101: 405–6.
- Akins, DR, Bourell, KW, Caimano, MJ, *et al.* (1998). A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state. *J Clin Invest* 101: 2240–50.
- Akira, S, Takeda, K (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499–511.
- Amara, N, Goven, D, Prost, F, *et al.* (2010). NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax* 65: 733–8.
- American Society of Healthsystem Pharmacists (2011). *Drug information 2011*. Bethesda. MD. 2011, p. 3545
- Anderson, JF, Magnarelli, LA, LeFebvre, RB, *et al.* (1989). Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolated from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. *J Clin Microbiol* 27: 13–20.
- Anderson, JM, Valenzuela, JG (2007). Spit-acular Entry: *Borrelia* Gets Help from a Tick Salivary Protein to Move from the Mammalian Host to the Arthropod Vector. *Cell Host Microbe* 2 (1): 3-4.
- Andoh, A, Zhang, Z, Inatomi, O, *et al.* (2005). Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 129: 969–84.
- Anguita, J, Persing, DH, Rincón, M, *et al.* (1996). Effect of anti-interleukin 12 treatment on murine lyme borreliosis. *J Clin Invest* 97: 1028–34.
- Ansel, J, Perry, P, Brown, J, *et al.* (1990). Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 94: 101S-107S.
- Antonara, S, Ristow, L, McCarthy, J, *et al.* (2010). Effect of *Borrelia burgdorferi* OspC at

- the site of inoculation in mouse skin. *Infect Immun* 78: 4723–33.
- Antonicelli, F, Bellon, G, Lorimier, S, *et al.* (2009). Role of the elastin receptor complex (S-Gal/Cath-A/Neu-1) in skin repair and regeneration. *Wound Repair Regen* 17 (5): 631-638.
- Appel, MJG, Allan, S, Jacobson, RH, *et al.* (1993). Experimental lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis* 167: 651–4.
- Arvikar, SL, Steere, AC (2015). Diagnosis and treatment of Lyme arthritis. *Infect Dis Clin North Am* 29: 269–80.
- Bachmann, M, Horn, K, Rudloff, I, *et al.* (2010). Early Production of IL-22 but Not IL-17 by peripheral blood mononuclear cells exposed to live *Borrelia burgdorferi*: The role of monocytes and interleukin-1. *PLoS Pathog* 6: e1001144.
- Bärfverstedt, B (1943). Über lymphadenosis begnigne cutis, eine klinische und pathologisch-anatomische Studie. *Acta dermato-venerologica*.
- Barthold, S (1991). Infectivity of *Borrelia burgdorferi* relative to route of inoculation and genotype in laboratory mice. *J Infect Dis* 16: 419–20.
- Barthold, S, Moody, K, Terwilliger, G, *et al.* (1988a). Experimental Lyme Arthritis in Rats Infected with *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* 157: 842–6.
- Barthold, SW, Beck, DS, Hansen, GM, *et al.* (1990). Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *J Infect Dis* 162: 133–8.
- Barthold, SW, Moody, KD, Terwilliger, GA, *et al.* (1988b). An animal model for Lyme arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 539: 264–73.
- Barthold, SW, Persing, D, Armstrong, A, *et al.* (1991). Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am J Pathol* 139: 263–73.
- Barthold, SW, de Souza, MS, Janotka, JL, *et al.* (1993). Chronic Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *Am J Pathol* 143: 959–71.
- Bashir, MM, Sharma, MR, Werth, VP (2009). TNF-alpha production in the skin. *Arch Dermatol Res* 301 (1): 87-91
- Bastos, MCF, Ceotto, H, Coelho, ML V, *et al.* (2009). Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol* 10: 38–61.
- Batsford, S, Dunn, J, Mihatsch, M (2004). Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* vary in their ability to induce experimental joint injury. *Arthritis Rheum*

50: 2360–9.

- Battisti, JM, Bono, JL, Rosa, PA, *et al.* (2008). Outer surface protein A protects Lyme disease spirochetes from acquired host immunity in the tick vector. *Infect Immun* 76: 5228–37.
- Bauer, B, Spreu, J, Rohe, C, *et al.* (2015). Key residues at the membrane-distal surface of KACL, but not glycosylation, determine the functional interaction of the keratinocyte-specific C-type lectin-like receptor KACL with its high-affinity receptor NKp65. *Immunology* 145: 114–23.
- Baum, E, Grosenbaugh, DA, Barbour, AG (2014). Diversity of antibody responses to *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected beagle dogs. *Clin Vaccine Immunol* 21: 838–46.
- Belkaid, Y, Tamoutounour, S (2016). The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol* 16: 353–66.
- Bennallack, PR, Burt, SR, Heder, MJ, *et al.* (2014). Characterization of a novel plasmid-borne thiopeptide gene cluster in *Staphylococcus epidermidis* strain 115. *J Bacteriol* 196: 4344–50.
- Berglund, J, Eitrem, R, Ornstein, K, *et al.* (1995). An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *N Engl J Med* 333: 1319–27.
- Bernard, Q, Gallo, RL, Jaulhac, B, *et al.* (2016). *Ixodes* tick saliva suppresses the keratinocyte cytokine response to TLR2/TLR3 ligands during early exposure to Lyme borreliosis. *Exp Dermatol* 25: 26–31.
- Bernard, Q, Jaulhac, B, Boulanger, N (2014). Smuggling across the Border: How Arthropod-Borne Pathogens Evade and Exploit the Host Defense System of the Skin. *J Invest Dermatol* 134: 1211–9.
- Bernard, Q, Wang, Z, Di Nardo, A, *et al.* (2017). Interaction of primary mast cells with *Borrelia burgdorferi* (sensu stricto): Role in transmission and dissemination in C57BL/6 mice. *Parasites and Vectors* 10: 313.
- Berndtson, K (2013). Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *In: Int J Gen Med.* 291–306.
- Biedermann, T, Kneilling, M, Mailhammer, R, *et al.* (2000). Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* 192: 1441–52.

- Bikle, DD (2011). Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 347 (1-2): 80-89.
- Blaydon, DC, Kelsell, DP (2014). Defective channels lead to an impaired skin barrier. *J Cell Sci* 127: 4343–50.
- Blum, H (2017). The human microbiome. *Adv Med Sci* 13: 414–20.
- Bockenstedt, LK, Kang, I, Chang, C, *et al.* (2001). CD4+ helper 1 cells facilitate regression of murine lyme carditis. *Infect Immun* 69: 5264–9.
- Bodaghi, B (2007). [Ocular manifestations of Lyme disease]. *Médecine Mal Infect* 37: 518–22.
- Bondi, CD, Manickam, N, Lee, DY, *et al.* (2010). NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 21: 93–102.
- Bonneau, S, Gupta, S, Cadiergues, MC (2010). Comparative efficacy of two fipronil spot-on formulations against experimental tick infestations (*Ixodes ricinus*) in dogs. *Parasitol Res* 107: 735–9.
- Borchers, AT, Keen, CL, Huntley, AC, *et al.* (2015). Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *J Autoimmun* 57: 82–115.
- Bos, JD, Zonneveld, I, Das, PK, *et al.* (1987). The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol* 88: 569–73.
- Boyard, C, Barnouin, J, Gasqui, P, *et al.* (2007). Local environmental factors characterizing *Ixodes ricinus* nymph abundance in grazed permanent pastures for cattle. *Parasitology* 134: 987–94.
- Breitner-Ruddock, S, Würzner, R, Schulze, J, *et al.* (1997). Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol* 185: 253–60.
- Brissette, C a, Houdek, HM, Floden, AM, *et al.* (2012). Acetate supplementation reduces microglia activation and brain interleukin-1 β levels in a rat model of Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation* 9: 249.
- Brisson, D, Baxamusa, N, Schwartz, I, *et al.* (2011). Biodiversity of *Borrelia burgdorferi* strains in tissues of lyme disease patients. *PLoS One* 6 (8): e22926
- Burgdorfer, W (1984). The New Zealand white rabbit: An experimental host for infecting ticks with Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 57: 609–12.
- Burgdorfer, W, Barbour, AG, Hayes, SF, *et al.* (1982). Lyme disease-a tick-borne

- spirochetosis? *Science* 216: 1317–9.
- Burgdorfer, W, Gage, KL (1987). Susceptibility of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*) to the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am J Trop Med Hyg* 37: 624–8.
- Bustos-Arriaga, J, Garcia-Machorro, J, Leon-Juarez, M, *et al.* (2011). Activation of the innate immune response against dengue in normal non-transformed human fibroblasts. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1420.
- Cabral, ES, Gelderblom, H, Hornung, RL, *et al.* (2006). *Borrelia burgdorferi* lipoprotein-mediated TLR2 stimulation causes the down-regulation of TLR5 in human monocytes. *J Infect Dis* 193: 849–59.
- Caimano, MJ, Kenedy, MR, Kairu, T, *et al.* (2011). The hybrid histidine kinase Hk1 is part of a two-component system that is essential for survival of *Borrelia burgdorferi* in feeding *Ixodes scapularis* ticks. *Infect Immun* 79: 3117–30.
- Callister, SM, Jobe, DA, Schell, RF, *et al.* (2000). Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* ticks. *J Clin Microbiol* 38: 3670–4.
- Candi, E, Schmidt, R, Melino, G (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 328–40.
- Capone, KA, Dowd, SE, Stamatas, GN, *et al.* (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *J Invest Dermatol* 131: 2026–32.
- Caporaso, JG, Lauber, CL, Costello, EK, *et al.* (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 12: R50.
- Carneiro, LAM, Magalhaes, JG, Tattoli, I, *et al.* (2008). Nod-like proteins in inflammation and disease. *J Pathol* 214 (2): 136–148.
- Carrasco, SE, Troxell, B, Yang, Y, *et al.* (2015). Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infect Immun* 83: 4848–60.
- Centers for Disease Control and Prevention (2017). Reported cases of Lyme disease by state or locality, 2005-2015† [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/lyme/stats/tables.html>
- Cervantes, JL, Dunham-Ems, SM, La Vake, CJ, *et al.* (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. *PNAS* 108: 3683–8.

- Cervantes, JL, La Vake, CJ, Weinerman, B, *et al.* (2013). Human TLR8 is activated upon recognition of *Borrelia burgdorferi* RNA in the phagosome of human monocytes. *J Leukoc Biol* 94: 1231–41.
- Chan, K, Awan, M, Barthold, SW, *et al.* (2012). Comparative molecular analyses of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains B31 and N40D10/E9 and determination of their pathogenicity. *BMC Microbiol* 12: 157.
- Charon, NW, Goldstein, SF, Marko, M, *et al.* (2009). The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *J Bacteriol* 191: 600–7.
- Du Chateau, BK, England, DM, Callister, SM, *et al.* (1996). Macrophages exposed to *Borrelia burgdorferi* induce Lyme arthritis in hamsters. *Infect Immun* 64: 2540–7.
- Chehoud, C, Rafail, S, Tyldsley, AS, *et al.* (2013). Complement modulates the cutaneous microbiome and inflammatory milieu. *Proc Natl Acad Sci* 110: 15061–6.
- Chipev, CC, Simon, M (2002). Phenotypic differences between dermal fibroblasts from different body sites determine their responses to tension and TGFbeta1. *BMC Dermatol* 2: 13.
- Chmielewski, T, Tylewska-Wierzbanowska, S (2010). Interactions between *Borrelia burgdorferi* and mouse fibroblasts. *Pol J Microbiol* 59: 157–60.
- Chronnell, CMT, Ghali, LR, Ali, RS, *et al.* (2001). Human β defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: Upregulation in *Acne vulgaris* lesions. *J Invest Dermatol* 117: 1120–5.
- Chung, Y, Zhang, N, Wooten, RM (2013). *Borrelia burgdorferi* elicited-IL-10 suppresses the production of inflammatory mediators, phagocytosis, and expression of co-stimulatory receptors by murine macrophages and/or dendritic cells. *PLoS One* 8: e84980.
- Cichorek, M, Wachulska, M, Stasiewicz, A, *et al.* (2013). Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Dermatologii i Alergol* 30: 30–41.
- Cinco, M, Cini, B, Murgia, R, *et al.* (2001). Evidence of involvement of the mannose receptor in adhesion of *Borrelia burgdorferi* to monocyte/macrophages. *Infect Immun* 69: 2743–7.
- Cladera-Olivera, F, Caron, GR, Brandelli, A (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol* 38: 251–6.
- CNR *Borrelia* (2017). Evaluation des trousse de sérologie *Borrelia* par immuno-

- empreinte [WWW Document]. URL http://www.chru-strasbourg.fr/sites/default/files/documents/evaluation_trousse_Serologie_Borrelia_immunoempreinte.pdf
- Coburn, J, Leong, J, Chaconas, G (2013). Illuminating the roles of the *Borrelia burgdorferi* adhesins. *Trends Microbiol* 21: 372–9.
- Cogen, AL, Yamasaki, K, Muto, J, *et al.* (2010). *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLoS One* 5: e8557.
- Collins, C, Shi, C, Russell, JQ, *et al.* (2008). Activation of gamma delta T cells by *Borrelia burgdorferi* is indirect via a TLR- and caspase-dependent pathway. *J Immunol* 181: 2392–8.
- Collins, C, Wolfe, J, Roessner, K, *et al.* (2005). Lyme arthritis synovial gammadelta T cells instruct dendritic cells via fas ligand. *J Immunol* 175: 5656–65.
- Conlon, JA, Mather, TN, Tanner, P, *et al.* (2000). Efficacy of a nonadjuvanted, outer surface protein A, recombinant vaccine in dogs after challenge by ticks naturally infected with *Borrelia burgdorferi*. *Vet Ther* 1: 96–107.
- Costello, EEK, Lauber, CCL, Hamady, M, *et al.* (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (80-)* 326: 1694–7.
- Coughlin, RT, Fish, D, Mather, TN, *et al.* (1995). Protection of dogs from lyme disease with a vaccine containing outer surface protein (Osp) A, OspB, and the saponin adjuvant QS21. *J Infect Dis* 171: 1049–52.
- Coutte, L, Botkin, DJ, Gao, L, *et al.* (2009). Detailed analysis of sequence changes occurring during vlsE antigenic variation in the mouse model of *Borrelia burgdorferi* infection. *PLoS Pathog* 5 (2): e1000293.
- Crack, LR, Jones, L, Malavige, GN, *et al.* (2012). Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. *Clin Exp Dermatol* 37: 534–43.
- 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 Zoonotic Dis* 2: 3–9.
- Croke, CL, Munson, EL, Lovrich, SD, *et al.* (2000). Occurrence of severe destructive lyme arthritis in hamsters vaccinated with outer surface protein A and challenged with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 68: 658–63.

- Cruz, AR, Moore, MW, La Vake, CJ, *et al.* (2008). Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, potentiates innate immune activation and induces apoptosis in human monocytes. *Infect Immun* 76: 56–70.
- Currie, SM, Findlay, EG, McHugh, BJ, *et al.* (2013). The Human Cathelicidin LL-37 Has Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus. *PLoS One* 8: e73659.
- Danner, M, Luger, TA (1987). Human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines produce a cytokine with interleukin 3-like activity. *J Invest Dermatol* 88: 353–61.
- Dattwyler, R, Volkman, DJ, Luft, BJ, *et al.* (1988). Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N Engl J Med* 319: 1441–6.
- De Silva, AM, Fikrig, E (1995). Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg* 53: 397–404.
- De Silva, AM, Fish, D, Burkot, TR, *et al.* (1997). OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks. *Infect Immun* 65: 3146–50.
- Dethlefsen, L, McFall-Ngai, M, Relman, DA (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449: 811–8.
- Dister, SW, Fish, D, Bros, SM, *et al.* (1997). Landscape characterization of peridomestic risk for Lyme disease using satellite imagery. *Am J Trop Med Hyg* 57: 687–92.
- Diuk-Wasser, MA, Vannier, E, Krause, PJ (2016). Coinfection by *Ixodes* Tick-Borne Pathogens: Ecological, Epidemiological, and Clinical Consequences. *Trends Parasitol* 32 (1): 30-42.
- Dominguez-Bello, MG, Costello, EK, Contreras, M, *et al.* (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci* 107: 11971–5.
- Di Domizio, J, Pagnoni, A, Huber, M, *et al.* (2016). [The skin microbiota: a colossus steps into the spotlight]. *Rev médicale suisse* 12: 660–4.
- Dotevall, L, Hagberg, L, Karlsson, JE, *et al.* (1999). Astroglial and neuronal proteins in cerebrospinal fluid as markers of CNS involvement in Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol* 6: 169–78.
- Duchateau, BK, Jensen, JR, England, DM, *et al.* (1997). Macrophages and enriched populations of T lymphocytes interact synergistically for the induction of severe, destructive lyme arthritis. *Infect Immun* 65: 2829–36.
- DuChateau, BK, Munson, EL, England, DM, *et al.* (1999). Macrophages interact with

- enriched populations of distinct T lymphocyte subsets for the induction of severe destructive Lyme arthritis. *J Leukoc Biol* 65: 162–70.
- Van Duin, D, Medzhitov, R, Shaw, AC (2006). Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol* 27 (1): 49-55.
- Dunham-Ems, SM, Caimano, MJ, Pal, U, *et al.* (2009). Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *J Clin Invest* 119 (12): 3652–3665.
- Duray, PH, Johnson, RC (1986). The histopathology of experimentally infected hamsters with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Proc Soc Exp Biol Med* 181: 263–9.
- Eap, R, Jacques, E, Semlali, A, *et al.* (2012). Cysteinyl leukotrienes regulate TGF-beta1 and collagen production by bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 86: 127–33.
- Ebnet, K, Brown, KD, Siebenlist, UK, *et al.* (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: 3285–92.
- Elsner, RA, Hasteley, CJ, Baumgarth, N (2015). CD4+ T cells promote antibody production but not sustained affinity maturation during *Borrelia burgdorferi* infection. *Infect Immun* 83: 48–56.
- Embers, ME, Barthold, SW, Borda, JT, *et al.* (2012). Persistence of *Borrelia burgdorferi* in rhesus macaques following antibiotic treatment of disseminated infection. *PLoS One* 7 (1): e29914.
- Embers, ME, Liang, FT, Howell, JK, *et al.* (2007). Antigenicity and recombination of VlsE, the antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*, in rabbits, a host putatively resistant to long-term infection with this spirochete. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 421–9.
- Endris, RG, Cooke, D, Amodie, D, *et al.* (2002). Repellency and efficacy of 65% permethrin and selamectin spot-on formulations against *Ixodes ricinus* ticks on dogs. *Vet Ther* 3: 64–71.
- England, JD, Bohm, RP, Roberts, ED, *et al.* (1997a). Mononeuropathy multiplex in rhesus monkeys with chronic Lyme disease. *Ann Neurol* 41: 375–84.
- England, JD, Bohm Jr., RP, Roberts, ED, *et al.* (1997b). Lyme neuroborreliosis in the rhesus monkey. *Semin Neurol* 17: 53–6.

- Eschner, AK, Mugnai, K (2015). Immunization with a recombinant subunit OspA vaccine markedly impacts the rate of newly acquired *Borrelia burgdorferi* infections in client-owned dogs living in a coastal community in Maine, USA. *Parasit Vectors* 10: 92.
- Fan, L, Busser, BW, Lifsted, TQ, *et al.* (2003). Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3386–91.
- Faust, K, Sathirapongsasuti, JF, Izard, J, *et al.* (2012). Microbial co-occurrence relationships in the Human Microbiome. *PLoS Comput Biol* 8: e1002606.
- Feghali, C a, Wright, TM (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2: d12–26.
- Feldmeyer, L, Werner, S, French, LE, *et al.* (2010). Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur J Cell Biol* 89 (9): 638-644.
- Fernandez-Flores, A (2015). Regional Variations in the Histology of the Skin. *Am J Dermatopathol* 37: 737–54.
- Ferris, LK, Mburu, YK, Mathers, AR, *et al.* (2013). Human beta-defensin 3 induces maturation of human langerhans cell-like dendritic cells: an antimicrobial peptide that functions as an endogenous adjuvant. *J Invest Dermatol* 133: 460–8.
- Firat, YH, Simanski, M, Rademacher, F, *et al.* (2014). Infection of keratinocytes with *Trichophytum rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PLoS One* 9: e93941.
- La Fleur, RL, Callister, SM, Dant, JC, *et al.* (2015). Vaccination with the ospA- and ospB-negative *Borrelia burgdorferi* strain 50772 provides significant protection against canine lyme disease. *Clin Vaccine Immunol* 22: 836–9.
- Foley, DM, Gayek, RJ, Skare, JT, *et al.* (1995). Rabbit model of Lyme borreliosis: *Erythema migrans*, infection-derived immunity, and identification of *Borrelia burgdorferi* proteins associated with virulence and protective immunity. *J Clin Invest* 96: 965–75.
- Fraser, C, Casjens, S, Huang, W (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580–6.
- Frendl, G (1992). Interleukin 3: From colony-stimulating factor to pluripotent immunoregulatory cytokine. *Int J Immunopharmacol* 14: 421–30.
- Frischknecht, F (2007). The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell Microbiol* 9 (7): 1630-1640.

- Frohm, M, Agerberth, B, Ahangari, G, *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: 15258–63.
- van Furth, R, Nibbering, PH, van Dissel, JT, *et al.* (1985). The characterization, origin, and kinetics of skin macrophages during inflammation. *J Invest Dermatol* 85: 398–402.
- Galbe, JL, Guy, E, Zapatero, JM, *et al.* (1993). Vascular clearance of *Borrelia burgdorferi* in rats. *Microb Pathog* 14: 187–201.
- Gallo, RL, Hooper, L V (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12: 503–16.
- Gallo, RL, Nakatsuji, T (2011). Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. *J Invest Dermatol* 131: 1974–80.
- Garcia-Monco, JC, Villar, BF, Alen, JC, *et al.* (1990). *Borrelia burgdorferi* in the central nervous system: experimental and clinical evidence for early invasion. *J Infect Dis* 161: 1187–93.
- Garcia, RC, Murgia, R, Cinco, M (2005). Complement receptor 3 binds the *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins OspA and OspB in an iC3b-independent manner. *Infect Immun* 73: 6138–42.
- Garin, C, Bujadoux, D (1922). Paralyse par les tiques. *J des Mal régnantes à Lyon* 77: 765–7.
- Gautam, A, Dixit, S, Embers, M, *et al.* (2012). Different patterns of expression and of IL-10 modulation of inflammatory mediators from macrophages of Lyme disease-resistant and -susceptible mice. *PLoS One* 7: e43860.
- 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. *Infect Immun* 69: 456–62.
- Geboes, L, Dumoutier, L, Kelchtermans, H, *et al.* (2009). Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 60: 390–5.
- Geijtenbeek, TBH, Gringhuis, SI (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 465–79.
- Georgilis, K, Peacocke, M, Klempner, MS (1992). Fibroblasts protect the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from ceftriaxone in vitro. *J Infect Dis* 166: 440–4.
- Gern, L (2009). Life Cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Transmission to

- Humans. *Curr Probl Dermatol* 37: 18-30.
- Gern, L, Schaible, UE, Simon, MM, *et al.* (1993). Mode of Inoculation of the Lyme Disease Agent *Borrelia burgdorferi* Influences Infection and Immune Responses in Inbred Strains of Mice. *J Infect Dis* 167: 971–5.
- Giambartolomei, GH, Dennis, V a, Lasater, BL, *et al.* (1999). Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14. *Infect Immun* 67: 140–7.
- Gittler, JK, Krueger, JG, Guttman-Yassky, E (2013). Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 131: 300–13.
- Golde, WT, Piesman, J, Dolan, MC, *et al.* (1997). Reactivity with a specific epitope of outer surface protein A predicts protection from infection with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 65: 882–9.
- Gondolf, KB, Mihatsch, M, Curschellas, E, *et al.* (1994). Induction of experimental allergic arthritis with outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Arthritis Rheum* 37: 1070–7.
- Goodman, JL, Jurkovich, P, Kodner, C, *et al.* (1991). Persistent cardiac and urinary tract infections with *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected syrian hamsters. *J Clin Microbiol* 29: 894–6.
- Goossens, HAT, Maes, JHJ, Van Den Bogaard, AEJM (2003). The prevalence of antibodies against *B. burgdorferi*, an indicator for Lyme borreliosis in dogs? A comparison of serological tests. *Tijdschr Diergeneeskd* 128: 650–7.
- Grabbe, S, Steinbrink, K, Steinert, M, *et al.* (1995). Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity. *J Immunol* 155: 4207–17.
- Greene, RT (1991). Canine Lyme borreliosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pr* 21: 51–64.
- Greene, RT, Walker, RL, Nicholson, WL, *et al.* (1988). Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimentally and naturally exposed dogs. *J Clin Microbiol* 26: 648–53.
- Grice, E a, Segre, J a (2011). The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9: 244–53.
- Grimm, D, Tilly, K, Byram, R, *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* 101: 3142–7.

- Groom, JR, Luster, AD (2011). CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* 89: 207–15.
- Gross, DM, Steere, AC, Huber, BT (1998). T helper 1 response is dominant and localized to the synovial fluid in patients with Lyme arthritis. *J Immunol* 160: 1022–8.
- Grosshans, E (2002). [Pick-Herxheimer's disease]. *Ann Dermatol Venereol* 129: 1063–6.
- Gueirard, P, Tavares, J, Thiberge, S, *et al.* (2010). Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18640–5.
- Guerau-De-Arellano, M, Huber, BT (2005). Chemokines and Toll-like receptors in Lyme disease pathogenesis. *Trends Mol Med* 11 (3): 114-120.
- Guglielmone, A a (2010). Zootaxa, The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: Ixodida) of the world. *Zootaxa* 2528: 1–28.
- Guilbride, DL, Guilbride, PDL, Gawlinski, P (2012). Malaria's deadly secret: A skin stage. *Trends Parasitol* 28 (4): 142-150.
- Guo, X, Booth, CJ, Paley, MA, *et al.* (2009). Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infect Immun* 77: 2320–9.
- Guthmiller, JM, Vargas, KG, Srikantha, R, *et al.* (2001). Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3216–9.
- Hagman, KE, Lahdenne, P, Popova, TG, *et al.* (1998). Decorin-binding protein of *Borrelia burgdorferi* is encoded within a two- gene operon and is protective in the murine model of Lyme borreliosis. *Infect Immun* 66: 2674–83.
- Hamer, SA, Hickling, GJ, Keith, R, *et al.* (2012). Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia andersonii* in Michigan, U.S.A. *Parasit Vectors* 5: 231.
- Hammerschmidt, C, Hallström, T, Skerka, C, *et al.* (2012). Contribution of the infection-associated complement regulator-acquiring surface protein 4 (ErpC) to complement resistance of *Borrelia burgdorferi*. *Clin Dev Immunol* 2012: 349657.
- Hansen, K, Hovmark, A, Lebech, AM, *et al.* (1992). Roxithromycin in Lyme borreliosis: Discrepant results of an in vitro and in vivo animal susceptibility study and a clinical trial in patients with *erythema migrans*. *In: Acta Derm. Venereol.* 297–300.
- Hanson, MS, Cassatt, DR, Guo, BP, *et al.* (1998). Active and passive immunity against *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein A (DbpA) protects against infection. *Infect Immun* 66: 2143–53.
- Harder, J, Schroder, JM (2005). Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol*

- Allergy* 86: 22–41.
- Hartiala, P, Hytönen, J, Suhonen, J, *et al.* (2008). *Borrelia burgdorferi* inhibits human neutrophil functions. *Microbes Infect* 10: 60–8.
- Hartiala, P, Hytönen, J, Yrjänäinen, H, *et al.* (2010). TLR2 utilization of *Borrelia* does not induce p38- and IFN-beta autocrine loop-dependent expression of CD38, resulting in poor migration and weak IL-12 secretion of dendritic cells. *J Immunol* 184: 5732–42.
- Hashemi, P, Kao, GF, Konia, T, *et al.* (2014). Multicentric primary extramammary paget disease: A Tokel cell disorder? *Cutis* 94: 35–8.
- Hawley, KL, Martín-Ruiz, I, Iglesias-Pedraz, JM, *et al.* (2013). CD14 targets complement receptor 3 to lipid rafts during phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*. *Int J Biol Sci* 9: 803–10.
- Hayes, BM, Dulebohn, DP, Sarkar, A, *et al.* (2014). Regulatory protein BBD18 of the Lyme disease spirochete: Essential role during tick acquisition? *MBio* 5: e01017-14.
- He, M, Ouyang, Z, Troxell, B, *et al.* (2011). Cyclic di-gmp is essential for the survival of the Lyme disease spirochete in ticks. *PLoS Pathog* 7: e1002133.
- Hefty, PS, Jolliff, SE, Caimano, MJ, *et al.* (2001). Regulation of OspE-related, OspF-related, and Elp lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* strain 297 by mammalian host-specific signals. *Infect Immun* 69: 3618–27.
- Hejka, A, Schmitz, JL, England, DM, *et al.* (1989). Histopathology of Lyme arthritis in LSH hamsters. *Am J Pathol* 134: 1113–23.
- Heng, NCK, Wescombe, PA, Burton, JP, *et al.* (2007). The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. *Bacteriocins Ecol Evol* 2007: 45-92.
- Henke, SE, Pence, DB, Demarais, S, *et al.* (1990). Serologic survey of selected zoonotic disease agents in black-tailed jack rabbits from western Texas. *J Wildl Dis* 26: 107–11.
- Hernández-Quintero, M, Kuri-Harcuch, W, González Robles, A, *et al.* (2006). Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res* 325: 77–90.
- Herxheimer, K, Hartmann, K (1902). Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch Dermatol* 61: 57–76.
- Herzer, P (1996). Joint manifestations of Lyme Borreliosis. In: *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panon. Adriat.* 143–6.

- Heylen, D, Tijssse, E, Fonville, M, *et al.* (2013). Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.l. in a bird tick community. *Environ Microbiol* 15: 663–73.
- Hoffmann, A-K, Naj, X, Linder, S (2014). Daam1 is a regulator of filopodia formation and phagocytic uptake of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages. *FASEB J* 28: 3075–89.
- Hofhuis, A, Herremans, T, Notermans, DW, *et al.* (2013). A prospective study among patients presenting at the general practitioner with a tick bite or *erythema migrans* in the Netherlands. *PLoS One* 8: e64361.
- Hofhuis, A, Van De Kasstele, J, Sprong, H, *et al.* (2017). Predicting the risk of Lyme borreliosis after a tick bite, using a structural equation model. *PLoS One* 12: e0181807.
- Hojgaard, A, Eisen, RJ, Piesman, J (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: 732–6.
- Holland, C, Mak, TN, Zimny-Arndt, U, *et al.* (2010). Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. *BMC Microbiol* 10: 230.
- Honsberger, NA, Six, RH, Heinz, TJ, *et al.* (2016). Efficacy of sarolaner in the prevention of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* transmission from infected *Ixodes scapularis* to dogs. *Vet Parasitol* 222: 67–72.
- Hovius, JWR, van Dam, AP, Fikrig, E (2007). Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends Parasitol* 23 (9): 434-438.
- Hovius, JWR, Hovius, KE, Oei, A, *et al.* (2000). Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *J Clin Microbiol* 38: 2611–21.
- Hovius, JWR, de Jong, M a WP, den Dunnen, J, *et al.* (2008). Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog* 4: e31.
- Hubálek, Z (2009). Epidemiology of Lyme Borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37: 31-50.
- Hughes, CAN, Engstrom, SM, Coleman, LA, *et al.* (1993). Protective immunity is induced by a *Borrelia burgdorferi* mutant that lacks OspA and OspB. *Infect Immun* 61: 5115–22.
- Hulinska, D, Bartak, P, Hercogova, J, *et al.* (1994). Electron microscopy of Langerhans

- cells and *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients. *Zentralbl Bakteriol* 280: 348–59.
- Huppertz, HI, Böhme, M, Standaert, SM, *et al.* (1999). Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 697–703.
- Hutton, T, Goldstein, RE, Njaa, BL, *et al.* (2008). Search for *Borrelia burgdorferi* in kidneys of dogs with suspected “Lyme nephritis.” *J Vet Intern Med* 22: 860–5.
- Santé publique France (2016). BORRÉLIOSE DE LYME [WWW Document]. URL <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Borreliose-de-lyme/Donnees-epidemiologiques>
- Isogai, H, Kimura, K, Hayashi, S, *et al.* (1997). Levels of endogenous interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor in congenic mice infected with *Borrelia garinii*. *Microbiol Immunol* 41: 427–30.
- Iwase, T, Uehara, Y, Shinji, H, *et al.* (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465: 346–9.
- Jacek, E, Tang, K, Komorowski, L, *et al.* (2016). Epitope-Specific Evolution of Human B Cell Responses to *Borrelia burgdorferi* VlsE Protein from Early to Late Stages of Lyme Disease. *J Immunol* 196: 1036–43.
- Jia, J, Duan, Q, Guo, J, *et al.* (2014). Psoriasis, A multifunctional player in different diseases. *Curr Protein Pept Sci* 15: 836–42.
- Jobe, DA, Callister, SM, Lim, LCL, *et al.* (1994). Ability of canine Lyme disease vaccine to protect hamsters against infection with several isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 32: 618–22.
- Johnson, BJB, Sviat, SL, Happ, CM, *et al.* (1995). Incomplete protection of hamsters vaccinated with unlipidated OspA from *Borrelia burgdorferi* infection is associated with low levels of antibody to an epitope defined by mAb LA-2. *Vaccine* 13: 1086–94.
- Johnson, RC, Kodner, C, Russell, M (1986). Passive immunization of hamsters against experimental infection with the Lyme disease spirochete. *Infect Immun* 53: 713–4.
- Johnson, RC, Kodner, CB, Jurkovich, PJ, *et al.* (1990). Comparative in vitro and in vivo susceptibilities of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to cefuroxime and other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2133–6.
- Johnson, RC, Marek, N, Kodner, C (1984). Infection of Syrian hamsters with lyme disease

- spirochetes. *J Clin Microbiol* 20: 1099–101.
- De Jong, R, Knols, BGJ (1995). Selection of biting sites on man by two malaria mosquito species. *Experientia* 51: 80–4.
- Junttila, J, Peltomaa, M, Soini, H, *et al.* (1999). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol* 37: 1361–5.
- Kalali, BN, Köllisch, G, Mages, J, *et al.* (2008). Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J Immunol* 181: 2694–704.
- Kalish, RS, Wood, JA, Golde, W, *et al.* (2003). Human T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* infection: no correlation between human leukocyte function antigen type 1 peptide response and clinical status. *J Infect Dis* 187: 102–8.
- Kanitakis, J (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12: 390-9-1.
- Kasemsarn, P, Bosco, J, Nixon, RL (2016). The Role of the Skin Barrier in Occupational Skin Diseases. *Curr Probl Dermatol* 49: 135–43.
- Katchar, K, Drouin, EE, Steere, AC (2013). Natural killer cells and natural killer T cells in Lyme arthritis. *Arthritis Res Ther* 15: R183.
- Kawai, T, Akira, S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373–84.
- Kazimírová, M, Stibrániová, I (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 1–17.
- Keane-myers, A, Nickell, SP (1995). T cell subset-dependent modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol* 154: 1770–6.
- Keane-Myers, A, Nickell, SP, Keane-Myers, A, *et al.* (1995). immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. Role of IL-4 and IFN-gamma in modulation of Role of IL-4 and IFN- γ in Modulation of Immunity to *Borrelia burgdorferi* in Mice. *J Immunol J Immunol by guest May J Immunol* 155: 2020–8.
- Kebir, H, Kreymborg, K, Ifergan, I, *et al.* (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13: 1173–5.
- Keerthisingam, CB, Jenkins, RG, Harrison, NK, *et al.* (2001). Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to transforming growth factor-beta in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced

- pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 158: 1411–22.
- Kendall, RT, Feghali-Bostwick, CA (2014). Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 27 (5): 123.
- Kenedy, MR, Akins, DR (2011). The OspE-related proteins inhibit complement deposition and enhance serum resistance of *Borrelia burgdorferi*, the lyme disease spirochete. *Infect Immun* 79: 1451–7.
- Kenedy, MR, Lenhart, TR, Akins, DR (2012). The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66: 1–19.
- Kenedy, MR, Vuppala, SR, Siegel, C, *et al.* (2009). CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 77: 2773–82.
- Kern, A, Collin, E, Barthel, C, *et al.* (2011). Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of lyme disease. *Vector borne zoonotic Dis Larchmont NY* 11: 1343–50.
- Kern, A, Schnell, G, Bernard, Q, *et al.* (2015). Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto Population and Its Involvement in *Borrelia* Pathogenicity: Study on Murine Model with Specific Emphasis on the Skin Interface. *PLoS One* 10: e0133195.
- Kerscher, B, Wilson, GJ, Reid, DM, *et al.* (2016). Mycobacterial receptor, Clec4d (CLECSF8, MCL), is coregulated with Mincle and upregulated on mouse myeloid cells following microbial challenge. *Eur J Immunol* 46: 381–9.
- Kezic, S, Jakasa, I (2016). Filaggrin and Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatol* 49: 1–7.
- Kim, J (2005). Review of the innate immune response in *Acne vulgaris*: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology* 211 (3): 193-8.
- Kimsey, RB, Spielman, A (1990). Motility of lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *J Infect Dis* 162: 1205–8.
- Kinjo, Y, Tupin, E, Wu, D, *et al.* (2006). Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 7: 978–86.
- Klempner, MS, Noring, R, Rogers, RA (1993). Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* 167: 1074–81.
- Knigge, H, Simon, MM, Meuer, SC, *et al.* (1996). The outer surface lipoprotein OspA of *Borrelia burgdorferi* provides co-stimulatory signals to normal human peripheral

- CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26: 2299–303.
- de Koning, J (1993). Histopathologic patterns of erythema migrans and borrelial lymphocytoma. *Clin Dermatol* 11: 377–83.
- Kornblatt, AN, Steere, AC, Brownstein, DG (1984). Experimental Lyme disease in rabbits: Spirochetes found in *erythema migrans* and blood. *Infect Immun* 46: 220–3.
- Kornblatt, AN, Urband, PH, Steere, AC (1985). Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 186: 960–4.
- Kościuczuk, EM, Lisowski, P, Jarczak, J, *et al.* (2012). Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* 1–14.
- Kostick, JL, Szkotnicki, LT, Rogers, EA, *et al.* (2011). The diguanylate cyclase, Rrp1, regulates critical steps in the enzootic cycle of the Lyme disease spirochetes. *Mol Microbiol* 81: 219–31.
- Kotsyfakis, M, Anderson, JM, Andersen, JF, *et al.* (2008). Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J Immunol* 181: 5209–12.
- Kraiczy, P, Skerka, C, Kirschfink, M, *et al.* (2001). Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *In: Int. Immunopharmacol.* 393–401.
- Krimer, PM, Miller, AD, Li, Q, *et al.* (2011). Molecular and pathological investigations of the central nervous system in *Borrelia burgdorferi*-infected dogs. *J Vet Diagn Invest* 23: 757–63.
- Krinsky, WL, Brown, SJ, Askenase, PW (1982). *Ixodes dammini*: Induced skin lesions in guinea pigs and rabbits compared to erythema chronicum migrans in patients with lyme arthritis. *Exp Parasitol* 53: 381–95.
- Kumru, OS, Bunikis, I, Sorokina, I, *et al.* (2011). Specificity and role of the *Borrelia burgdorferi* CtpA protease in outer membrane protein processing. *J Bacteriol* 193: 5759–65.
- Laborel-Préneron, E, Bianchi, P, Boralevi, F, *et al.* (2015). Effects of the *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* secretomes isolated from the skin microbiota of atopic children on CD4+ T cell activation. *PLoS One* 10: e0141067.
- Lafleur, RL, Dant, JC, Wasmoen, TL, *et al.* (2009). Bacterin that induces anti-ospA and anti-ospC borreliacidal antibodies provides a high level of protection against canine lyme disease. *Clin Vaccine Immunol* 16: 253–9.
- Lagal, V, Portnoi, D, Faure, G, *et al.* (2006). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

- invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect* 8: 645–52.
- Lai, Y, Gallo, RL (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30 (3): 131-141.
- Lai, Y, Nardo, A Di, Nakatsuji, T, *et al.* (2009). Commensal bacteria regulate TLR3-dependent inflammation following skin injury. *Nat Med* 15: 1377–82.
- Latham, R, Gell, D, Fairbairn, R, *et al.* (2017). An isolate of *Haemophilus haemolyticus* produces a bacteriocin-like substance that inhibits the growth of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Int J Antimicrob Agents* 49: 503–6.
- Lazarus, JJ, Kay, MA, McCarter, AL, *et al.* (2008). Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages. *Infect Immun* 76: 1153–62.
- Lazarus, JJ, Meadows, MJ, Lintner, RE, *et al.* (2006). IL-10 deficiency promotes increased *Borrelia burgdorferi* clearance predominantly through enhanced innate immune responses. *J Immunol* 177: 7076–85.
- Lee, JH, Cho, DH, Park, HJ (2015). IL-18 and cutaneous inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 16 (12): 29357-29369.
- Lee, W-Y, Moriarty, TJ, Wong, CHY, *et al.* (2010). An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat Immunol* 11: 295–302.
- Leeflang, MMG, Ang, CW, Berkhout, J, *et al.* (2016). The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 16: 140.
- Leeming, JP, Holland, KT, Cunliffe, WJ (1984). The microbial ecology of pilosebaceous units isolated from human skin. *J Gen Microbiol* 130: 803–7.
- Leonovich, SA (2004). Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in *Ixodes ricinus* ticks and their possible role in host perception. *Exp Appl Acarol* 32: 89–102.
- Levin, C, Maibach, HI (2002). Topical corticosteroid-induced adrenocortical insufficiency: clinical implications. *Am J Clin Dermatol* 3: 141–7.
- Levin, M, Papero, M, Fish, D (1997). Feeding density influences acquisition of *Borrelia burgdorferi* in larval *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 34: 569–72.
- Levine, JF, Wilson, ML, Spielman, A (1985). Mice as reservoirs of the Lyme disease

- spirochete. *Am J Trop Med Hyg* 34: 355–60.
- Li, C, Bakker, RG, Motaleb, MA, *et al.* (2002). Asymmetrical flagellar rotation in *Borrelia burgdorferi* nonchemotactic mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6169–74.
- Liang, FT, Brown, EL, Wang, T, *et al.* (2004a). Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *Am J Pathol* 165: 977–85.
- Liang, FT, Jacobs, MB, Bowers, LC, *et al.* (2002a). An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. *J Exp Med* 195: 415–22.
- Liang, FT, Nelson, FK, Fikrig, E (2002b). Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *J Exp Med* 196: 275–80.
- Liang, FT, Yan, J, Mbow, ML, *et al.* (2004b). *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infect Immun* 72: 5759–67.
- Liang, SC, Tan, X-Y, Luxenberg, DP, *et al.* (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203: 2271–9.
- Lieskovska, J, Kopecky, J (2012). Effect of tick saliva on signalling pathways activated by TLR-2 ligand and *Borrelia afzelii* in dendritic cells. *Parasite Immunol* 34: 421–9.
- Lieskovská, J, Kopecký, J (2012). Tick saliva suppresses IFN signalling in dendritic cells upon *Borrelia afzelii* infection. *Parasite Immunol* 34: 32–9.
- Lieskovská, J, Páleníková, J, Širmarová, J, *et al.* (2015). Tick salivary cystatin sialostatin L2 suppresses IFN responses in mouse dendritic cells. *Parasite Immunol* 37: 70–8.
- Lim, LCL, England, DM, DuChateau, BK, *et al.* (1994). Development of destructive arthritis in vaccinated hamsters challenged with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 62: 2825–33.
- Lim, LCL, England, DM, DuChateau, BK, *et al.* (1995a). *Borrelia burgdorferi*-specific T lymphocytes induce severe destructive Lyme arthritis. *Infect Immun* 63: 1400–8.
- Lim, LCL, England, DM, Glowacki, NJ, *et al.* (1995b). Involvement of CD4 T lymphocytes in induction of severe destructive Lyme arthritis in inbred LSH hamsters. *Infect Immun* 63: 4818–25.
- Lima, C, Zeidner, N, Beard, C, *et al.* (2005). Differential Infectivity of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi* Derived from *Ixodes scapularis* Salivary Glands and Midgut. *J Med Entomol* 42: 506–10.
- Lipschütz, B (1913). Über eine seltene Erythemform (*erythema chronicum atrophicans*).

- Arch Dermatol Syph* 118: 349–56.
- Lipsker, D (2007). Dermatological aspects of Lyme borreliosis. *Médecine Mal Infect* 37: 540–7.
- Lipsker, D, Jaulhac, B (2009). *Lyme Borreliosis*. Karger. Basel.
- Littman, MP, Goldstein, RE, Labato, MA, *et al.* (2006). ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: Diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 20: 422–34.
- Litzinger, S, Duckworth, A, Nitzsche, K, *et al.* (2010). Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J Bacteriol* 192: 3132–43.
- Liu, Z, Giudice, GJ, Zhou, X, *et al.* (1997). A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 100: 1256–63.
- López-García, B, Lee, PHA, Yamasaki, K, *et al.* (2005). Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *J Invest Dermatol* 125: 108–15.
- Love, AC, Schwartz, I, Petzke, MM (2015). Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *J Leukoc Biol* 97: 379–90.
- Lovrich, SD, Callister, SM, DuChateau, BK, *et al.* (1995). Abilities of OspA proteins from different seroprotective groups of *Borrelia burgdorferi* to protect hamsters from infection. *Infect Immun* 63: 2113–9.
- Lovrich, SD, Callister, SM, Schmitz, JL, *et al.* (1991). Borreliacidal activity of sera from hamsters infected with the Lyme disease spirochete. *Infect Immun* 59: 2522–8.
- Lovrich, SD, Jobe, DA, Schell, RF, *et al.* (2005). Borreliacidal OspC antibodies specific for a highly conserved epitope are immunodominant in human lyme disease and do not occur in mice or hamsters. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 746–51.
- Lusitani, D, Malawista, SE, Montgomery, RR (2002). *Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components. *J Infect Dis* 185: 797–804.
- Ma, J, Bulger, PA, Dante, S, *et al.* (1995). Characterization of canine humoral immune responses to outer surface protein subunit vaccines and to natural infection by Lyme disease spirochetes. *J Infect Dis* 171: 909–15.
- Ma, J, Hine, PM, Clough, ER, *et al.* (1996). Safety, efficacy, and immunogenicity of a

- recombinant Osp subunit canine Lyme disease vaccine. *Vaccine* 14: 1366–74.
- Maas-Szabowski, N, Szabowski, A, Stark, HJ, *et al.* (2001). Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol* 116: 816–20.
- Macháčková, M, Oborník, M, Kopecký, J (2006). Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in vivo. *Folia Parasitol (Praha)* 53: 153–8.
- Magnarelli, LA, Anderson, JF, McAninch, JB (1990). Serologic analyses of cottontail rabbits for antibodies to *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 28: 890–3.
- Maher, TM, Evans, IC, Bottoms, SE, *et al.* (2010). Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 73–82.
- Mannelli, A, Bertolotti, L, Gern, L, *et al.* (2012). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: Transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol Rev* 36 (4): 837–861.
- Marchal, C, Schramm, F, Kern, A, *et al.* (2011). Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. *Infect Immun* 79: 774–85.
- Marchal, CM, Luft, BJ, Yang, X, *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: 2515–7.
- Marionnet, C, Pierrard, C, Vioux-Chagnoleau, C, *et al.* (2006). Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 126: 971–9.
- Mason, LMK, Veerman, CC, Geijtenbeek, TBH, *et al.* (2014). Ménage à trois: *Borrelia*, dendritic cells, and tick saliva interactions. *Trends Parasitol* 30: 95–103.
- Mason, LMK, Wagemakers, A, Van't Veer, C, *et al.* (2016). *Borrelia burgdorferi* induces TLR2-mediated migration of activated dendritic cells in an ex vivo human skin model. *PLoS One* 11: e0164040.
- Mather, TN, Fish, D, Coughlin, RT (1994). Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J Am Vet Med Assoc* 205: 186–8.
- Matuschka, F-R, Schinkel, TW, Klug, B, *et al.* (2000). Relative incompetence of european rabbits for Lyme disease spirochaetes. *Parasitology* 121: 297–302.
- Matuschka, FR, Endepols, S, Richter, D, *et al.* (1996). Risk of urban Lyme disease

- enhanced by the presence of rats. *J Infect Dis* 174: 1108–11.
- Matuschka, FR, Endepols, S, Richter, D, *et al.* (1997). Competence of urban rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol* 34: 489–93.
- Matuschka, FR, Fischer, P, Heiler, M, *et al.* (1992). Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European Ixodes ticks. *Parasitol Res* 78: 695–8.
- Matyniak, JE, Reiner, SL (1995). T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. *J Emerg Med* 181: 1251–4.
- Maurer, M, Lopez Kostka, S, Siebenhaar, F, *et al.* (2006). Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* 20: 2460–7.
- Menten-Dedoyart, C, Faccinetto, C, Golovchenko, M, *et al.* (2012). Neutrophil Extracellular Traps Entrap and Kill *Borrelia burgdorferi* Ssensu Stricto Spirochetes and Are Not Affected by *Ixodes ricinus* Tick Saliva. *J Immunol* 189: 5393–5401.
- Messer, L, Felten, R, Moreau, P, *et al.* (2014). Fibrous nodules over the patella revealing *acrodermatitis chronica atrophicans*. *Joint Bone Spine* 82: 208.
- Metz, M, Siebenhaar, F, Maurer, M (2008). Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiology* 213 (3-4): 251-260.
- Mikami, Y, Dobschütz, E V., Sommer, O, *et al.* (2009). Matrix metalloproteinase-9 derived from polymorphonuclear neutrophils increases gut barrier dysfunction and bacterial translocation in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 145: 147–56.
- Milovanovic, M, Volarevic, V, Radosavljevic, G, *et al.* (2012). IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res* 52: 89–99.
- Miot, LDB, Miot, HA, Silva, MG Da, *et al.* (2009). Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol* 84: 623–35.
- Moguelet, P (2007). [Histopathology of Lyme borreliosis]. *Med Mal Infect* 37 Suppl 3: S189-93.
- Montgomery, RR, Lusitani, D, De Boisfleury Chevance, A, *et al.* (2004). Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infect Immun* 72: 2989–94.
- Moody, KD, Barthold, SW, Terwilliger, GA, *et al.* (1990a). Experimental chronic Lyme borreliosis in Lewis rats. *Am J Trop Med Hyg* 42: 165–74.
- Moody, KD, Barthold, SW, Terwilliger, GA (1990b). Lyme borreliosis in laboratory animals: Effect of host species and in vitro passage of *Borrelia burgdorferi*. *Am J Trop Med Hyg* 43: 87–92.
- Moriarty, T, Norman, M, Colarusso, P, *et al.* (2008). Real-time high resolution 3D imaging

- of the lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathog* 4: e1000090.
- Mosser, DM, Edwards, JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958–69.
- Motta, V, Soares, F, Sun, T, *et al.* (2014). NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. *Physiol Rev* 95: 149–78.
- Mouw, JK, Ou, G, Weaver, VM (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 771–85.
- Mueller, NT, Bakacs, E, Combellick, J, *et al.* (2015). The infant microbiome development: Mom matters. *Trends Mol Med* 21 (2): 109-117.
- Müllegger, RR, Glatz, M (2008). Skin manifestations of lyme borreliosis: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 9: 355–68.
- Munson, E, Nardelli, DT, Du Chateau, BK, *et al.* (2012). Hamster and murine models of severe destructive lyme arthritis. *Clin Dev Immunol*.
- Murakami, M, Ohtake, T, Dorschner, RA, *et al.* (2002). Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 81: 845–50.
- Nagy, I, Pivarcsi, A, Koreck, A, *et al.* (2005). Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 124: 931–8.
- Naik, S, Bouladoux, N, Linehan, JL, *et al.* (2015). Commensal–dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* 520: 104–8.
- Naik, S, Bouladoux, N, Wilhelm, C, *et al.* (2012). Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. *Science (80-)* 337: 1115–9.
- Naj, X, Hoffmann, A-K, Himmel, M, *et al.* (2013). The formins FMNL1 and mDia1 regulate coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages. *Infect Immun* 81: 1683–95.
- Nakatsuji, T, Chiang, H-I, Jiang, SB, *et al.* (2013). The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nat Commun* 4: 1431.
- Narasimhan, S, DePonte, K, Marcantonio, N, *et al.* (2007a). Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. *PLoS One* 2 (5): e451.
- Narasimhan, S, Sukumaran, B, Bozdogan, U, *et al.* (2007b). A Tick Antioxidant Facilitates the Lyme Disease Agent’s Successful Migration from the Mammalian Host to the

- Arthropod Vector. *Cell Host Microbe* 2: 7–18.
- Di Nardo, A, Vitiello, A, Gallo, RL (2003). Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 170: 2274–8.
- Nazario, S, Das, S, De Silva, AM, *et al.* (1998). Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity. *Am J Trop Med Hyg* 58: 780–5.
- Nestle, FO, Di Meglio, P, Qin, J-Z, *et al.* (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679–91.
- Nickoloff, BJ, Turka, LA (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 15: 464–9.
- Nolte, SV, Xu, W, Rennekampff, H-O, *et al.* (2008). Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 187: 165–76.
- Oh, J, Byrd, AL, Park, M, *et al.* (2016). Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell* 165: 854–66.
- Oh, J, Conlan, S, Polley, EC, *et al.* (2012). Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med* 4: 77.
- Ohnishi, J, Piesman, J, de Silva, AM (2001). Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 670–5.
- Olson, CM, Bates, TC, Izadi, H, *et al.* (2009). Local production of IFN-gamma by invariant NKT cells modulates acute Lyme carditis. *J Immunol* 182: 3728–34.
- Oosting, M, Buffen, K, van der Meer, JWM, *et al.* (2014). Innate immunity networks during infection with *Borrelia burgdorferi*. *Crit Rev Microbiol* 7828: 1–12.
- Oosting, M, ter Hofstede, H, Sturm, P, *et al.* (2011). TLR1/TLR2 heterodimers play an important role in the recognition of *Borrelia* spirochetes. *PLoS One* 6: e25998.
- Oppenheim, JJ, Tewary, P, De La Rosa, G, *et al.* (2007). Alarmins initiate host defense. *In: Adv. Exp. Med. Biol.* 185–94.
- Oschmann, P, Dorndorf, W, Hornig, C, *et al.* (1998). Stages and syndromes of neuroborreliosis. *J Neurol* 245(5):262-72.
- Otto, M, Süßmuth, R, Vuong, C, *et al.* (1999). Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* agr pheromone and derivatives. *FEBS Lett* 450: 257–62.

- Pachner, A, Itano, A, Ricalton, N (1991). An outer surface protein is a major T cell antigen in experimental Lyme disease in CB6F1 mice. *Ann N Y Acad Sci* 636: 393–5.
- Pachner, AR, Amemiya, K, Bartlett, M, *et al.* (2001). Lyme borreliosis in rhesus macaques: effects of corticosteroids on spirochetal load and isotype switching of anti-*Borrelia burgdorferi* antibody. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 225–32.
- Pachner, AR, Braswell, ST, Delaney, E, *et al.* (1994). A rabbit model of Lyme neuroborreliosis: characterization by PCR, serology, and sequencing of the OspA gene from the brain. *Neurology* 44: 1938–43.
- Pachner, AR, Delaney, E, O’Neill, T, *et al.* (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, Delaney, E, Ricalton, NS (1992). Murine Lyme borreliosis: route of inoculation determines immune response and infectivity. *Reg Immunol* 4: 345–51.
- Pal, U, Li, X, Wang, T, *et al.* (2004). TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119: 457–68.
- Pappas, CJ, Iyer, R, Petzke, MM, *et al.* (2011). *Borrelia burgdorferi* requires glycerol for maximum fitness during the tick phase of the enzootic cycle. *PLoS Pathog* 7: e1002102.
- Parveen, N, Caimano, M, Radolf, JD, *et al.* (2003). Adaptation of the Lyme disease spirochaete to the mammalian host environment results in enhanced glycosaminoglycan and host cell binding. *Mol Microbiol* 47: 1433–44.
- Pasparakis, M, Haase, I, Nestle, FO (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14: 289–301.
- Patrican, LA (1997). Acquisition of Lyme disease spirochetes by cofeeding *Ixodes scapularis* ticks. *Am J Trop Med Hyg* 57: 589–93.
- Peavy, C a, Lane, RS, Kleinjan, JE (1997). Role of small mammals in the ecology of *Borrelia burgdorferi* in a peri-urban park in north coastal California. *Exp Appl Acarol* 21: 569–84.
- Peters, NC, Egen, JG, Secundino, N, *et al.* (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Sci (New York, NY)* 321: 970–4.
- Petnicki-Ocwieja, T, DeFrancesco, AS, Chung, E, *et al.* (2011). Nod2 suppresses *Borrelia burgdorferi* mediated murine Lyme arthritis and carditis through the induction of

- tolerance. *PLoS One* 6: e17414.
- Petzke MM, Brooks A, Krupna MA, *et al.* (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(8): 5279-92
- Philipp, MT, Aydintug, MK, Bohm, RP, *et al.* (1993). Early and early disseminated phases of Lyme disease in the rhesus monkey: A model for infection in humans. *Infect Immun* 61: 3047-59.
- Piesman, J (1991). Experimental acquisition of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by larval *Ixodes dammini* (Acari: *Ixodidae*) during partial blood meals. *J Med Entomol* 28: 259-62.
- Piesman, J (1993). Standard System for Infecting Ticks (Acari: *Ixodidae*) with the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* 30: 199-203.
- Piesman, J, Mather, TN, Sinsky, RJ, *et al.* (1987). Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 25: 557-8.
- Piesman, J, Maupin, GO, Campos, EG, *et al.* (1991). Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J infect dis* 163: 895-7.
- Piesman, J, Oliver, JR, Sinsky, RJ (1990). Growth kinetics of the lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am J Trop Med Hyg* 42: 352-7.
- Pietikäinen, J, Meri, T, Blom, AM, *et al.* (2010). Binding of the complement inhibitor C4b-binding protein to Lyme disease *Borreliae*. *Mol Immunol* 47: 1299-305.
- Plato, A, Hardison, SE, Brown, GD (2015). Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol* 37 (2): 97-106.
- Preac-Mursic, V, Wilske, B, Jauris, S, *et al.* (1992). Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. *Infection* 20: 342-9.
- Preac Mursic, V, Patsouris, E, Wilske, B, *et al.* (1990). Persistence of *Borrelia burgdorferi* and histopathological alterations in experimentally infected animals. A comparison with histopathological findings in human Lyme disease. *Infection* 18: 332-41.
- Pride, MW, Brown, EL, Stephens, LC, *et al.* (1998). Specific Th1 cell lines that confer protective immunity against experimental *Borrelia burgdorferi* infection in mice. *J Leukoc Biol* 63: 542-9.

- Pritt, BS, Mead, PS, Johnson, DKH, *et al.* (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: A descriptive study. *Lancet Infect Dis* 16: 556–64.
- Probert, WS, Johnson, BJB (1998). Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Mol Microbiol* 30: 1003–15.
- Proksch, E, Brandner, JM, Jensen, JM (2008). The skin: An indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17: 1063–72.
- Proksch, E, Brasch, J (2012). Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of contact dermatitis. *Clin Dermatol* 30 (3): 335-344.
- Purser, JE, Lawrenz, MB, Caimano, MJ, *et al.* (2003). A plasmid-encoded nicotinamidase (PncA) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host. *Mol Microbiol* 48: 753–64.
- Qiu, WG, Martin, CL (2014). Evolutionary genomics of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Findings, hypotheses, and the rise of hybrids. *Infect Genet Evol* 27: 576-593.
- Radolf, JD, Caimano, MJ, Stevenson, B, *et al.* (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 10: 87–99.
- Ramesh, G, Alvarez, AL, Roberts, ED, *et al.* (2003). Pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: *Borrelia burgdorferi* lipoproteins induce both proliferation and apoptosis in rhesus monkey astrocytes. *Eur J Immunol* 33: 2539–50.
- Ramesh, G, Santana-Gould, L, Inglis, FM, *et al.* (2013). The Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* induces inflammation and apoptosis in cells from dorsal root ganglia. *J Neuroinflammation* 10: 88.
- Rau, A, Hogg, T, Marquardt, R, *et al.* (2001). A new lysozyme fold. Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution. *J Biol Chem* 276: 31994–9.
- Rego, ROM, Bestor, A, Štefka, J, *et al.* (2014). Population bottlenecks during the infectious cycle of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 9: e101009.
- Reid, G, Younes, JA, Van der Mei, HC, *et al.* (2011). Microbiota restoration: Natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol* 9: 27–38.
- Revel, AT, Talaat, AM, Norgard, M V (2002). DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc Natl Acad Sci*

USA 99: 1562–7.

- Ribeiro-Gomes, FL, Peters, NC, Debrabant, A, *et al.* (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response. *PLoS Pathog* 8 (2): e1002536.
- Rizzoli, A, Silaghi, C, Obiegala, A, Rudolf, I, *et al.* (2014). Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front Public Health* 1;2: 251
- Roberts, ED, Bohm, RP, Cogswell, FB, *et al.* (1995). Chronic lyme disease in the rhesus monkey. *Lab Invest* 72: 146–60.
- Rollend, L, Fish, D, Childs, JE (2013). Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: A summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis* 4: 46–51.
- Rosa, PA, Tilly, K, Stewart, PE (2005). The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nat Rev Microbiol* 3: 129–43.
- Saalbach, A, Klein, C, Sleeman, J, *et al.* (2007). Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells. *J Immunol* 178: 4966–74.
- Sabat, R, Grütz, G, Warszawska, K, *et al.* (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 331–44.
- Sachsenmeier, KF, Schell, K, Morrissey, LW, *et al.* (1992). Detection of borreliacidal antibodies in hamsters by using flow cytometry. *J Clin Microbiol* 30: 1457–61.
- Sahay, B, Patsey, RL, Eggers, CH, *et al.* (2009). CD14 Signaling restrains chronic inflammation through induction of p38-MAPK/SOCS-dependent tolerance. *PLoS Pathog*. e1000687.
- Sahay, B, Singh, A, Gnanamani, A, *et al.* (2011). CD14 signaling reciprocally controls collagen deposition and turnover to regulate the development of lyme arthritis. *Am J Pathol* 178: 724–34.
- Salazar, JC, Duhnam-Ems, S, La Vake, C, *et al.* (2009). Activation of human monocytes by live *Borrelia burgdorferi* generates TLR2-dependent and -independent responses which include induction of IFN-beta. *PLoS Pathog* 5: e1000444.
- Salazar, JC, Pope, CD, Sellati, TJ, *et al.* (2003). Coevolution of markers of innate and adaptive immunity in skin and peripheral blood of patients with *erythema migrans*. *J Immunol* 171: 2660–70.
- Sambri, V, Marangoni, A, Giacani, L, *et al.* (2002). Comparative in vitro activity of five

- cathelicidin-derived sythetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J Antimicrob Chemother* 50: 895–902.
- Sassone-Corsi, M, Nuccio, S-P, Liu, H, *et al.* (2016). Microcins mediate competition among *Enterobacteriaceae* in the inflamed gut. *Nature* 540: 280–3.
- Schacht, V, Kapp, A (2011). Inflammatory dermatoses. *Pathologe* 32: 384–90.
- Schaible, UE, Kramer, MD, Justus, CWE, *et al.* (1989). Demonstration of antigen-specific T cells and histopathological alterations in mice experimentally inoculated with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 57: 41–7.
- Schalla, W, Schorning, S (1991). Potency assessment of topical corticoids in the vasoconstrictor assay and on tuberculin-induced inflammation. *Skin Pharmacol Physiol* 4: 191–204.
- Scharschmidt, TC, Fischbach, MA (2013). What lives on our skin: Ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discov Today Dis Mech* 10 (3-4): e83-e89.
- Scharschmidt, TC, Vasquez, KS, Truong, HA, *et al.* (2015). A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity* 43: 1011–21.
- Scheckelhoff, MR, Telford, SR, Wesley, M, *et al.* (2007). *Borrelia burgdorferi* intercepts host hormonal signals to regulate expression of outer surface protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (17): 7247-52.
- Schmitz, J, Schell, R, Hejka, A, *et al.* (1988). Induction of lyme arthritis in LSH hamsters. *Infect Immun* 56: 2336–42.
- Schmitz, JL, Schell, RF, Hejka, AG, *et al.* (1990). Passive immunization prevents induction of lyme arthritis in LSH hamsters. *Infect Immun* 58: 144–8.
- Schmitz, JL, Schell, RF, Lovrich, SD, *et al.* (1991). Characterization of the protective antibody response to *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected LSH hamsters. *Infect Immun* 59: 1916–21.
- Schnell, G, Boeuf, A, Jaulhac, B, *et al.* (2015a). Proteomic analysis of three *Borrelia burgdorferi* sensu lato native species and disseminating clones: Relevance for Lyme vaccine design. *Proteomics* 15: 1280–90.
- Schnell, G, Boeuf, A, Westermann, B, *et al.* (2015b). Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies: a promising work toward an early diagnosis of Lyme disease. *Mol Cell proteomics* 14: 1254–64.

- Scholl, DC, Embers, ME, Caskey, JR, *et al.* (2016). Immunomodulatory effects of tick saliva on dermal cells exposed to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Parasit Vectors* 9: 394.
- Schommer, NN, Gallo, RL (2013). Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol* 21 (12): 660-668.
- Schramm, F, Grillon, A, Martino, S De, *et al.* (2013). La borréiiose de Lyme. *Rev Francoph des Lab* 2013: 35-49.
- Schramm, F, Kern, A, Barthel, C, *et al.* (2012). Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *PLoS One* 7: e40046.
- Schuijt, TJ, Coumou, J, Narasimhan, S, *et al.* (2011). A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe* 10: 136-46.
- Schwan, TG, Kime, KK, Schrupf, ME, *et al.* (1989). Antibody response in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) experimentally infected with the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Infect Immun* 57: 3445-51.
- Scott, JD, Clark, KL, Foley, JE, *et al.* (2017). Detection of *Borrelia* Genomespecies 2 in *Ixodes spinipalpis* Ticks Collected from a Rabbit in Canada. *J Parasitol* 103: 38-46.
- Scotton, CJ, Chambers, RC (2007). Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus. *Chest* 132 (4): 1311-1321.
- Sender, R, Fuchs, S, Milo, R (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164 (3): 337-340.
- Seneschal, J, Clark, RA, Gehad, A, *et al.* (2012). Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity* 36: 873-84.
- Shang, ES, Champion, CI, Wu, XY, *et al.* (2000). Comparison of protection in-rabbits against host-adapted and cultivated *Borrelia burgdorferi* following infection-derived immunity or immunization with outer membrane vesicles or outer surface protein A. *Infect Immun* 68: 4189-99.
- Shapiro, SD (1998). Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10 (5): 602-608.
- Shi, C, Sahay, B, Russell, JQ, *et al.* (2011). Reduced immune response to *Borrelia burgdorferi* in the absence of gamma-delta T cells. *Infect Immun* 79: 3940-6.

- Shi, Y, Xu, Q, McShan, K, *et al.* (2008). Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 76: 1239–46.
- Shih, C, Liu, L, Spielman, A (1995). Differential spirochetal infectivities to vector ticks of mice chronically infected by the agent of Lyme disease. *J Clin Microbiol*. 1995 Dec;33(12):3164-8.
- Shih, CM, Liu, LP (1996). Accelerated infectivity of tick-transmitted Lyme disease spirochetes to vector ticks. *J Clin Microbiol* 34: 2297–9.
- Shih, CM, Pollack, RJ, Telford, SR, *et al.* (1992). Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice. *J Infect Dis* 166: 827–31.
- Shih, CM, Spielman, A (1993). Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. *J Clin Microbiol* 31: 2878–81.
- Siebenhaar, F, Syska, W, Weller, K, *et al.* (2007). Control of *Pseudomonas aeruginosa* skin infections in mice is mast cell-dependent. *Am J Pathol* 170: 1910–6.
- Siegel, C, Hallström, T, Skerka, C, *et al.* (2010). Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 5 (10): e13519.
- Sigmundsdottir, H, Butcher, EC (2008). Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9: 981–7.
- Silberer, M, Koszik, F, Stingl, G, *et al.* (2000). Downregulation of class II molecules on epidermal Langerhans cells in Lyme borreliosis. *Brit J Dermatol* 143: 786–94.
- Simo, L, Kazimirova, M, Ridcharson, J, *et al.* (2017). The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 22 (7): 281.
- Sjowall, J, Carlsson, A, Vaarala, O, *et al.* (2005). Innate immune responses in Lyme borreliosis: Enhanced tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12 in asymptomatic individuals in response to live spirochetes. *Clin Exp Immunol* 141: 89–98.
- Sjowall, J, Fryland, L, Nordberg, M, *et al.* (2011). Decreased Th1-type inflammatory cytokine expression in the skin is associated with persisting symptoms after treatment of *erythema migrans*. *PLoS One* 6 (3): e18220.
- Slámová, M, Skallová, A, Páleníková, J, *et al.* (2011). Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. *Parasite Immunol* 33: 654–60.

- Slominski, A, Tobin, DJ, Zmijewski, MA, *et al.* (2008). Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab* 19 (1): 17-24.
- Smetanick, MT, Zellis, SL, Ermolovich, T (2010). *Acrodermatitis chronica atrophicans*: a case report and review of the literature. *Cutis* 85: 247-52.
- Smith, MD, Bhatt, DP, Geiger, JD, *et al.* (2014). Acetate supplementation modulates brain adenosine metabolizing enzymes and adenosine A₂A receptor levels in rats subjected to neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 11: 99.
- Sonenshine, D (1993). *Biology of Ticks: Volume 2*. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Sonnenberg, GF, Nair, MG, Kirn, TJ, *et al.* (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 207: 1293-305.
- Sonnesyn, SW, Manivel, JC, Johnson, RC, *et al.* (1993). A guinea pig model for Lyme disease. *Infect Immun* 61: 4777-84.
- Sorrell, JM, Caplan, AI (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 117: 667-75.
- Sparber, F (2014). Langerhans cells: an update. *J Dtsch Dermatol Ges* 12: 1107-11.
- Spreu, J, Kuttruff, S, Stejfova, V, *et al.* (2010). Interaction of C-type lectin-like receptors Nkp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5100-5.
- Staehli, F, Ludigs, K, Heinz, LX, *et al.* (2012). NLRC5 deficiency selectively impairs MHC class I- dependent lymphocyte killing by cytotoxic T cells. *J Immunol* 188: 3820-8.
- Stanek, G, Wormser, GP, Gray, J, *et al.* (2012). Lyme borreliosis. *Lancet* 379: 461-73.
- Steere, AC (1989). Lyme disease. *N Engl J Med* 321: 586-96.
- Steere, AC, Malawista, SE, Hardin, JA, *et al.* (1977a). *Erythema chronicum migrans* and lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* 86: 685-98.
- Steere, AC, Malawista, SE, Snyderman, DR, *et al.* (1977b). Lyme Arthritis. *Arthritis Rheum* 20: 7-17.
- Stratton, R, Rajkumar, V, Ponticos, M, *et al.* (2002). Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *FASEB J* 16: 1949-51.
- Straubinger, R, Straubinger, A, Summers, B, *et al.* (2000). Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. *J Infect Dis* 181: 1069-81.
- Straubinger, RK, Dharma Rao, T, Davidson, E, *et al.* (2001). Protection against tick-

- transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine. *Vaccine* 20: 181–93.
- Straubinger, RK, Summers, BA, Chang, YF, *et al.* (1997). Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 35: 111–6.
- Strle, F, Stanek, G (2009). Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37: 51-110.
- Strle, K, Drouin, EE, Shen, S, *et al.* (2009). *Borrelia burgdorferi* stimulates macrophages to secrete higher levels of cytokines and chemokines than *Borrelia afzelii* or *Borrelia garinii*. *J Infect Dis* 200: 1936–43.
- Strle, K, Sulka, K, Pianta, A, *et al.* (2017). T-Helper 17 Cell Cytokine Responses in Lyme Disease Correlate With *Borrelia burgdorferi* Antibodies During Early Infection and With Autoantibodies Late in the Illness in Patients With Antibiotic-Refractory Lyme Arthritis. *Clin Infect Dis* 64: 930–8.
- Stübs, G, Fingerle, V, Zähringer, U, *et al.* (2011). Acylated cholesteryl galactosides are ubiquitous glycolipid antigens among *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63: 140–3.
- Su, Y, Richmond, A (2015). Chemokine regulation of neutrophil infiltration of skin wounds. *Adv wound care* 4: 631–40.
- Suarez-Carmona, M, Hubert, P, Delvenne, P, *et al.* (2015). Defensins: “Simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev* 26 (3): 361-370.
- Sugawara, T, Gallucci, RM, Simeonova, PP, *et al.* (2001). Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine* 15: 328–36.
- Summers, B a, Straubinger, a F, Jacobson, RH, *et al.* (2005). Histopathological studies of experimental Lyme disease in the dog. *J Comp Pathol* 133: 1–13.
- Surasombatpattana, P, Patramool, S, Luplertlop, N, *et al.* (2012). *Aedes aegypti* saliva enhances dengue virus infection of human keratinocytes by suppressing innate immune responses. *J Invest Dermatol* 132: 2103–5.
- Swirski, FK, Nahrendorf, M, Etzrodt, M, *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325: 612–6.
- Tadeu, AMB, Horsley, V (2014). Epithelial Stem Cells in Adult Skin. *Curr Top Dev Biol* 107: 109–31.

- de Taeye, SW, Kreuk, L, van Dam, AP, *et al.* (2013). Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: it takes three to tango. *Trends Parasitol* 29: 119–28.
- Takaoka, A, Wang, Z, Choi, MK, *et al.* (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501–5.
- Talkington, J, Nickell, SP (1999). *Borrelia burgdorferi* spirochetes induce mast cell activation and cytokine release. *Infect Immun* 67: 1107–15.
- Talkington, J, Nickell, SP (2001). Role of Fc gamma receptors in triggering host cell activation and cytokine release by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 69: 413–9.
- Tattoli, I, Travassos, LH, Carneiro, LA, *et al.* (2007). The nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol* 29 (3): 289–301.
- Taylor, NAS, Tipton, MJ, Kenny, GP (2014). Considerations for the measurement of core, skin and mean body temperatures. *J Therm Biol* 46: 72–101.
- Tee, S, Martínez-escanamé, M, Zuriel, D, *et al.* (2013). *Acrodermatitis chronica atrophicans* With Pseudolymphomatous Infiltrates. *Am J Dermatopathol* 35: 338–42.
- Tel, J, Lambeck, AJA, Cruz, LJ, *et al.* (2010). Human plasmacytoid dendritic cells phagocytose, process, and present exogenous particulate antigen. *J Immunol* 184: 4276–83.
- Telford, SR, Spielman, A (1989a). Competence of a rabbit-feeding *Ixodes* (Acari: *Ixodidae*) as a vector of the Lyme disease spirochete. *J Med Entomol* 26: 118–21.
- Telford, SR, Spielman, A (1989b). Enzootic transmission of the agent of Lyme disease in rabbits. *Am J Trop Med Hyg* 41: 482–90.
- Tilly, K, Bestor, A, Rosa, PA (2013). Lipoprotein succession in *Borrelia burgdorferi*: Similar but distinct roles for OspC and VlsE at different stages of mammalian infection. *Mol Microbiol* 89: 216–27.
- Tilly, K, Elias, AF, Errett, J, *et al.* (2001). Genetics and regulation of chitobiose utilization in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 183: 5544–53.
- Töpfer, KH, Straubinger, RK (2007). Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent. A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Vaccine* 25: 314–26.
- Toulon, A, Breton, L, Taylor, KR, *et al.* (2009). A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med* 206: 743–50.
- Tracy, LE, Minasian, R a., Caterson, EJ (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast

- Function in the Healing Wound. *Adv wound care* 5: 119–36.
- Tripathi, S, Wang, G, White, M, *et al.* (2015). Antiviral activity of the human cathelicidin, LL-37, and derived peptides on seasonal and pandemic influenza A viruses. *PLoS One* 10.
- Tupin, E, Benhnia, MR-E-IR-E-I, Kinjo, Y, *et al.* (2008). NKT cells prevent chronic joint inflammation after infection with. *Proc Natl Acad Sci* 105: 19863–8.
- Urb, M, Sheppard, DC (2012). The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog* 8 (4): e1002619.
- Valencia, C, Serrano, A, Guerrero, A (1993). [Experimental model of Lyme disease in rats]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 11: 65–9.
- Van Dam, AP, Oei, A, Jaspars, R, *et al.* (1997). Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease. *Infect Immun* 65: 1228–36.
- Verhulst, NO, Beijleveld, H, Knols, BG, *et al.* (2009). Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes. *Malar J* 8: 302.
- Verhulst, NO, Qiu, YT, Beijleveld, H, *et al.* (2011). Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. *PLoS One* 6 (12): e28991.
- Vesely, DL, Fish, D, Shlomchik, MJ, *et al.* (2009). Langerhans cell deficiency impairs *Ixodes scapularis* suppression of Th1 responses in mice. *Infect Immun* 77: 1881–7.
- Vincent, MS, Roessner, K, Lynch, D, *et al.* (1996). Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by *Borrelia*-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med* 184: 2109–17.
- Wang, X, Gao, X-H, Hong, Y, *et al.* (2010). Local hyperthermia decreases the expression of CCL-20 in condyloma acuminatum. *Virol J* 7: 301.
- Wang, X, Ma, Y, Yoder, A, *et al.* (2008). T cell infiltration is associated with increased Lyme arthritis in TLR2-/- mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 124–33.
- Wang, Y, Kuo, S, Shu, M, *et al.* (2014). Staphylococcus epidermidis in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: Implications of probiotics in acne vulgaris. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 411–24.
- Weaver, CT, Hatton, RD, Mangan, PR, *et al.* (2007). IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages Key Words. *Annu Rev Immunol* 25: 821–52.
- Widhe, M, Jarefors, S, Ekerfelt, C, *et al.* (2004). *Borrelia*-specific interferon-gamma and

- interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *J Infect Dis* 189: 1881–91.
- Wikel, SK, Bergman, D (1997). Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitol Today*.
- Wooten, RM, Ma, Y, Yoder, RA, *et al.* (2002). Toll-Like Receptor 2 Is Required for Innate, But Not Acquired, Host Defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 168: 348–55.
- Wu, J, Weening, EH, Faske, JB, *et al.* (2011). Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires beta(1) integrins and Src kinase activity. *Infect Immun* 79: 1338–48.
- Xhindoli, D, Pacor, S, Benincasa, M, *et al.* (2016). The human cathelicidin LL-37 - A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1858: 546–66.
- Xiao, S, Kumar, M, Yang, X, *et al.* (2011). A host-restricted viral vector for antigen-specific immunization against Lyme disease pathogen. *Vaccine* 29: 5294–303.
- Xu, G, Fang, QQ, Keirans, JE, *et al.* (2003). Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J Parasitol* 89: 452–7.
- Xu, Q, Seemanapalli, S V, Reif, KE, *et al.* (2007a). Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. *J Immunol* 178: 5109–15.
- Xu, Q, Seemanapalli, S V., McShan, K, *et al.* (2007b). Increasing the interaction of *Borrelia burgdorferi* with decorin significantly reduces the 50 percent infectious dose and severely impairs dissemination. *Infect Immun* 75: 4272–81.
- Yamasaki, K, Gallo, R (2008). Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J dermatology* 18: 11–21.
- Yang, D, Chertov, O, Bykovskaia, SN, *et al.* (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525–8.
- Yang, X, Goldberg, MS, Popova, TG, *et al.* (2000). Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 37: 1470–9.
- Yazdi, AS, Röcken, M, Ghoreschi, K (2016). Cutaneous immunology: basics and new concepts. *Semin Immunopathol* 38 (1): 3-10.
- Yoshinari, NH, Reinhardt, BN, Steere, AC (1991). T cell responses to polypeptide fractions of *Borrelia burgdorferi* in patients with lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 34:

707–13.

Zeidner, NS, Schneider, BS, Rutherford, JS, *et al.* (2008). Suppression of Th2 cytokines reduces tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* load in mice. *J Parasitol* 94: 767–9.

Zhao, Z, Chang, H, Trevino, RP, *et al.* (2003). Selective up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human *erythema migrans* skin lesions of acute lyme disease. *J Infect Dis* 188: 1098–104.

Zhao, Z, Fleming, R, McCloud, B, *et al.* (2007a). CD14 mediates cross talk between mononuclear cells and fibroblasts for upregulation of matrix metalloproteinase 9 by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 75: 3062–9.

Zhao, Z, McCloud, B, Fleming, R, *et al.* (2007b). *Borrelia burgdorferi*-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 528–33.

Curriculum Vitae

Grillon Antoine
12 rue de Paris
67118 Geispolsheim

☎ 06.74.37.25.78

✉ antoine.grillon@chru-strasbourg.fr

Né le 03 Février 1984

PHARMACIEN BIOLOGISTE

Praticien-Hospitalo-Universitaire, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg

EA 7290 Virulence bactérienne précoce, groupe Borréliose de Lyme, Université de Strasbourg

DIPLOMES

- 2014** Responsable scientifique Expérimentation Animale Niveau 1, obtenu le 10 Décembre 2014 à Strasbourg
- 2014** Formation spéciale à la chirurgie des rongeurs, obtenue le 27 Août 2014 à Strasbourg
- 2012** Thèse de Doctorat de Pharmacie « Détection rapide des mutations gyrA chez les entérobactéries par pyroséquençage multiplex », soutenue le 5 Octobre 2012 à Reims
- 2012** DES de Biologie médicale, obtenu le 5 Octobre 2012, à Reims
- 2013** Master 2 Sciences, Technologie, Santé, Mention Vie et Santé, Spécialité physiopathologie cellulaire et moléculaire, obtenu le 3 Septembre 2013 à Strasbourg
- 2011** Équivalence Master 1, parcours santé, obtenue le 26 Octobre 2011 à Tours
- 2000** Baccalauréat Section S, spécialité Biologie

FONCTIONS ANTERIEURES

- 2012-2016** Assistant-Hospitalo-Universitaire, Laboratoire de Bactériologie de Strasbourg, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg
- 2008-2012** Internat en Pharmacie, Spécialité Biologie médicale
- 2002-2007** Faculté de Pharmacie de Tours

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M type producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bretonneau hospitals (CHRU Tours).

Holstein A, Grillon A, Yzon L, Morange V, Baty G, Lartigue MF, Mereghetti L, Goudeau A, Lanotte P.

Pathol Biol (Paris). 2010 Feb;58(1):67-9. Epub 2009 Nov 4.

Lethal meningitis due to *Pasteurella multocida*.

Grillon A, Guillard T, Brasme L, Limelette A, Novella JL, de Champs C.

Med Mal Infect. 2012 Aug;42(8):374-5. Epub 2012 Jul 21.

Brain abscess due to *Nocardia cyriacigeorgica* simulating an ischemic stroke

Lavalard E, Guillard T, Baumard S, Grillon A, Brasme L, Rodríguez-Nava V, Litré F, Delmer A, Boiron P, de Champs C.

Ann Biol Clin. 2013 May-Jun;71(3):345-8

La Borréliose de Lyme

Schramm F, Grillon A, De Martino S, Jaulhac B

Revue Française des Laboratoires. 2013 N°457 p35-49

Mobile insertion cassette elements found in small non-transmissible plasmids in *Proteae* may explain *qnrD* mobilization.

Guillard T, Grillon A, de Champ C, Cartier C, Madoux J, Berçot B, Lebreil AL, Lozniewski A, Rihahi J, Vernet-Garnier V, Cambau E

PLoS One. 2014 Feb 4;9(2)

Comparison of routine use of two chromogenic media ChromID CPS (bioMérieux) and UriSelect4 (Bio-Rad) for the detection of *Escherichia coli* and major uropathogenics in urine

Meddeb M, Maurer M, Grillon A, Schefftel JM, Jaulhac B

Ann Biol Clin (Paris). 2014 Mar-Apr;72(2):224-30

Antibiogramme : diamètres ou CMI ?

Jehl F, Chabaud A, Grillon A

Journal des anti-infectieux. 2015

***Moraxella osloensis*, an emerging pathogen of endocarditis in immunocompromised patients?**

Gagnard JC, Hidri N, Grillon A, Jessel L, Denes E

Swiss med Wkly. 2015 Sep 16;145:w14185

Comparative Activity of Ciprofloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Assessed by Minimum Inhibitory Concentrations and Time-Kill Studies.

Grillon A, Schramm F, Kleinberg M, Jehl F

Plos One. 2016 Jun 3;11(6):e0156690

Homogeneous Inflammatory Gene Profiles Induced in Human Dermal Fibroblasts in Response to the Three Main Species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Meddeb M, Carpentier W, Cagnard N, Nadaud S, Grillon A, Barthel C, De Martino SJ, Jaulhac B, Boulanger N, Schramm F
Plos One. 2016 Oct 5;11(10):e0164117

Use of ESwab in the Xpert® vanA/vanB PCR assay.

Rasoanandrasana S, Decousser JW, Cattoir V, Berçot B, Domrane C, Fihman V, Grillon A, Lesenne A, Raskine L, Cambau E, Jacquier H.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017 Apr;36(4):755-756

Inventory of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France as Assessed by a Multicenter Study.

Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, Brieu N, Cattoir V, Chapuis A, Chardon H, Degand N, Doucet-Populaire F, Dubois V, Fortineau N, Grillon A, Lanotte P, Leyssene D, Patry I, Podglajen I, Recule C, Ros A, Colomb-Cotin M, Ponties V, Ploy MC, Bonnet R.
Antimicrob Agents Chemother. 2017 Feb 23;61(3). pii: e01911-16

Photo Quiz: Is Gardening Dangerous?

Schramm F, Prunières G, Taleb CE, Gaudias J, Meddeb M, Grillon A, Liverneaux P, Jaulhac B.
J Clin Microbiol. 2017 Apr;55(4):991

***Staphylococcus aureus* méticillino-résistants : concentrations critiques et pharmacodynamie de la vancomycine et des nouvelles céphalosporines.**

Jehl F, Schramm F, Talagrand-Reboul E, Grillon A.
Journ des anti-infectieux. 2017 (sous presse)

COMMUNICATIONS ORALES SUR *BORRELIA*

Tropisme cutané de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto dans le développement de la borréliose de Lyme : mise en évidence sur un modèle murin

A. Grillon, B. Westermann, Laurence Sabatier, B. Jaulhac, N. Boulanger
Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, 2014

Caractéristiques des arthrites de Lyme positives dans les liquides et tissus articulaires. Données 2012-2014 du CNR *Borrelia*

A. Grillon, E. Twizeyoimana, F. Schramm, L. Zilliox, B. Jaulhac, S. De Martino
Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. 2014

Identifications de biomarqueurs cutanés lors de la transmission précoce de la Borréliose de Lyme par protéomique ciblée

A. Grillon, B. Westermann, L. Sabatier, B. Jaulhac, N. Boulanger
Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg. 2015

Proteomic approach to identify biomarkers of active Lyme disease in disseminated infections

A. Grillon, B. Westermann, L. Sabatier, G. Schnell, N. Boulanger, B. Jaulhac
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2015

Antoine Grillon

Borréliose de Lyme : Rôle de l'interface cutanée et du microbiome dans la physiopathologie de la maladie.

La maladie de Lyme est la maladie à transmission vectorielle la plus répandue de l'hémisphère Nord. La peau est un organe clef dans cette maladie, car c'est à cet endroit qu'interagissent les cellules de l'hôte, le pathogène, le microbiote cutané et le vecteur. Nous avons développé un modèle murin d'infection disséminée de borréliose de Lyme, qui nous a permis de développer une méthode spécifique de détection de protéines de *Borrelia* dans le tissu cutané murin par SRM-MS, pouvant aboutir à une méthode de diagnostic chez l'homme. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux relations entre le microbiote cutané, les cellules résidentes de la peau, kératinocytes et fibroblastes, avec *Borrelia*. Les sécrétomes de trois bactéries commensales, *S. epidermidis*, *P. acnes* et *C. striatum* possèdent un effet synergique sur l'expression de gènes inflammatoires par les kératinocytes et les fibroblastes. Les sécrétomes de *P. acnes* et de *C. striatum* se sont également montrés capables d'inhiber une partie de la réponse inflammatoire des kératinocytes, pouvant aider le pathogène lors de la transmission/dissémination précoce.

Mots clés : Borréliose de Lyme, protéomique, microbiote cutané, cellules résidentes cutanées, kératinocytes, fibroblastes, réponse inflammatoire, tique *Ixodes*, immunité innée cutanée

Lyme disease is the most common vector-borne disease in the Northern Hemisphere. Skin is a key organ in the disease, since it is the key interface where host cells, pathogen, skin microbiota and vector interact early during pathogen transmission. We developed a late lyme borreliosis model on mice. This model allowed us to develop a specific detection method of *Borrelia* proteins in the mouse skin by SRM-MS that might be used to develop a human diagnosis of disseminated Lyme disease. In a second part, we analysed the relationship between skin microbiota, resident skin cells (keratinocytes and fibroblasts), in the presence or absence of *Borrelia*. The secretome of three commensals bacteria, *S. epidermidis*, *P. acnes* and *C. striatum* was shown to have a synergistic activity with *Borrelia* in pro-inflammatory gene expressions by keratinocytes and fibroblasts. *P. acnes* and *C. striatum* secretomes were also able to inhibit partially the inflammatory response of keratinocytes that might help the transmission/dissemination of the pathogen.

Key words: Lyme borreliosis, proteomic analyses, skin microbiota, skin resident cells, keratinocytes, fibroblasts, inflammatory response, *Ixodes* tick, skin innate immunity