



**HAL**  
open science

# Identification de marqueurs de la maladie de Lyme et développement de méthodes de détection directe d'antigènes de *Borrelia burgdorferi*

Victoria Dolange

► **To cite this version:**

Victoria Dolange. Identification de marqueurs de la maladie de Lyme et développement de méthodes de détection directe d'antigènes de *Borrelia burgdorferi*. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ006 . tel-04463394

**HAL Id: tel-04463394**

**<https://theses.hal.science/tel-04463394v1>**

Submitted on 17 Feb 2024

**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.

Identification de marqueurs de la  
maladie de Lyme et développement de  
méthodes de détection directe  
d'antigènes de *Borrelia burgdorferi*

*Identification of markers for Lyme disease and development of  
methods for direct detection of Borrelia burgdorferi antigens*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 569 : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : Immunologie  
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Médicaments et Technologies pour la Santé**  
(Université Paris-Saclay, CEA, INRAE),  
sous la direction de **Nathalie MOREL**, directrice de recherche

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 février 2022, par  
Victoria DOLANGE**

**Composition du Jury**

<b>Claire JANOIR-JOUVESHOMME</b> Professeure des universités, Université Paris-Saclay (INRAE)	Présidente
<b>Nathalie BOULANGER</b> Maîtresse de conférences des universités, HDR Université de Strasbourg (CNR des <i>Borrelia</i> )	Rapporteur & Examinatrice
<b>Mathieu PICARDEAU</b> Directeur de recherche, Institut Pasteur (CNR de la Leptospirose), Université de Paris	Rapporteur & Examineur
<b>Muriel VAYSSIER-TAUSSAT</b> Directrice de recherche, Université de Tours (INRAE)	Examinatrice
<b>Nathalie MOREL</b> Directrice de recherche, CEA de Saclay	Directrice de thèse

## ***Remerciements***

Je tiens à remercier Nathalie Boulanger et Mathieu Picardeau pour avoir évalué mes travaux de thèse en tant que rapporteurs et membres du jury de la soutenance.

Je remercie Claire Janoir-Jouveshomme pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que présidente du jury de thèse ainsi que Muriel Vayssier-Taussat en tant qu'examinatrice.

Je remercie également Rachel Bras-Marques et Bernard Maillère pour nos échanges tout au long de la thèse et ce notamment lors du comité de mi-thèse.

Merci à Nathalie Morel, ma directrice de thèse, qui a toujours été présente pour moi. J'ai énormément appris à tes côtés. Je n'aurais pas pu avoir meilleure directrice de thèse. J'ai adoré nos échanges scientifiques, professionnels et personnels. Merci de m'avoir toujours soutenue, j'en suis grandement reconnaissante.

Je remercie également Stéphanie Simon et Christophe Junot pour votre accueil au sein du Service de Pharmacologie et Immunoanalyse et du Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse.

Je remercie tout le personnel, permanent ou de passage, avec qui j'ai construit des liens durant ces trois belles années (que ce soit au détour d'un couloir ou lors des jeux de Noël).

Merci à ceux qui ont participé à mon projet, vous avez été essentiels à cette réussite.

Un grand merci au bureau de l'ambiance (ou ex. bureau des filles), vous qui m'avez supporté au quotidien toujours avec le sourire. À Stephy, pour ton écoute, pour nos débriefing faits-divers et nos échanges, à Audrey, pour nos points décorations et ambiance, à Jihana, mon lutin farceur de début de thèse, à Marion, pour ta joie de vivre, à Loïs, la meilleure des relèvees, à Ghita, à Nell d'avoir fait un passage dans le bureau et à Nicolas (petite incruste masculine), merci de m'avoir formé à mon arrivée et de m'avoir ensuite supporté en voisine de bureau. Vous allez tellement me manquer. Je compte sur vous pour perpétuer la tradition des Shocobons.

Je remercie mes collègues qui sont devenus des amis (avec qui on a fait les 400 coups) : Fanny, Justine, Lilas, Christian, Antoine, Anaïs V., Jessica. Mention spéciale à Anne-So, merci d'avoir toujours été là, toujours avec une oreille attentive et amicale, à Lucia, merci pour ses heures passées dans l'animalerie à me former, à discuter de tout et de rien et ses soirées pizza. Vous êtes exceptionnelles.

Merci aux personnes qui ont fait partie de la team Morel : à Elise pour ton soutien inconditionnel, à Benjamin, la pipelette, à Nicolas (encore toi) et surtout à Dom., merci pour ces moments passés en salle de Western-blot, pour toutes ses conversations et ses fous rires.

Un Merci à l'ensemble du LERI et du LI2A. Spécialement, à Boubou, pour ta bonne humeur quotidienne, ton humour et ton coucou traditionnel du soir, à Hervé V., le plus breton de l'étape pour tes conseils avisés, à Anne, pour ta bienveillance, à Cécile, pour ta joie de vivre communicative, à Alexandra, pour nos conversations entre deux couloirs, à Hervé B. pour tes blagues, à Julie pour ses nombreuses heures en animalerie, à Marc, pour les anticorps monoclonaux, à Karla, à Marie, à Mélanie, à Nina, à Célestine, à Gwenaëlle, à Patricia, à Michel, à Alexis, à Céline, à Karine, à Issa, à Stéphane H., à Stéphane N., à Blanche, à Marine, à Martha, à Eric, à Julien, à Chloé, à Elora, à Saffyia, à Cherif, à Christelle, à Marion, merci tout simplement. Je remercie également tous les anciens pour ses moments partagés : Anita, Chloé, Emeline, Nihel, Diane, Emeric, Duncan, Vanina, Céline, Daniel, Anaïs D., Eléa, Menel, Gloria, Kathleen, Justyna, Yidan et Slobodan. J'espère n'avoir oublié personne, tellement chacun d'entre vous ont été important pour moi.

Je tiens à remercier également Sandrine, Laurie et Florence, pour leur aide logistique et administrative, vous avez joué un rôle essentiel au bon déroulé de la thèse. Merci à l'équipe sécurité : Marie-Laure, Emmanuel et Alain. Merci aussi à toute l'équipe de l'animalerie centrale Jean-Charles, Sylvain et Anne-Sophie.

Enfin, je remercie toute l'équipe de foot du CEA Saclay : « les licornes atomiques » (toutes vous citées seraient un peu long tellement l'équipe grandit à vue d'œil) et les coachs, avec qui j'ai partagé des moments exceptionnels sur les terrains, mais également en dehors. Vous allez terriblement me manquer.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu : Mathilde, Chloé, Baptiste, Mathias, Ulysse, Alexis D., Alexis B., Simon, Lucas, Sophie, Elsa, Camille, et tous les autres, je compte sur vous pour me rendre visite malgré la distance.

Pour terminer, merci à toute ma famille et en particulier mes parents, Nathalie et Christian, qui ont toujours tout fait pour que je réussisse, qui m'ont soutenu pendant toutes mes années d'études, j'espère que vous êtes fiers. C'est grâce à vous que je suis arrivée jusque-là et je vous en serai toujours reconnaissante. Mention spéciale à Jérôme, ma sœur Célia, mon beau-frère Julien, mon frère Corentin, ma belle-sœur Nolwenn et mon neveu Auguste, pour leurs soutiens et attentions. Vous avez été toujours à mes côtés, je vous aime.

« J'ai un peu de mal à imaginer ma vie sans mes proches. Quand je dis un peu de mal, en fait, je ne l'imagine pas du tout. Ils sont mes repères, mes bases, mes compliments, mes reproches. »

G.C.M.

## Abréviations

<b>1D</b>	Electrophorèse monodimensionnelle	<b>IL</b>	Interleukine
<b>2D</b>	Electrophorèse bidimensionnelle	<b>InMAD</b>	<i>In vivo</i> Microbial Antigen Discovery
<b>ACA</b>	Acrodermatite chronique atrophiante	<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1- thiogalactopyranoside
<b>AchE</b>	Acétylcholinestérase	<b>IRAC</b>	<i>Ixodes ricinus anti-complement protein</i>
<b>AcM(s)</b>	Anticorps monoclonal/aux	<b>Iric</b>	<i>Ixodes ricinus</i>
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique	<b>ISAC</b>	<i>Ixodes scapularis anti-complement protein</i>
<b>AEBSF</b>	Chlorhydrate de fluorure de 4-(2-aminoéthyl) benzène sulfonyle	<b>K<sub>a</sub></b>	Constante d'association
<b>Alun</b>	Hydroxyde d'aluminium	<b>kb</b>	Kilobase
<b>ARNr</b>	Acide ribonucléique ribosomique	<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de dissociation à l'équilibre
<b>ARS</b>	Agence régionale de santé	<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>ATCC</b>	American type culture collection	<b>K<sub>dis</sub></b>	Constante de dissociation
<b>Ba</b>	<i>Borrelia afzelii</i>	<b>LC-MS/MS</b>	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
<b>Bam</b>	$\beta$ -barrel assembly machine	<b>LCR</b>	Liquide céphalo-rachidien
<b>Bbav</b>	<i>Borrelia bavariensis</i>	<b>LoD</b>	Limite de détection
<b>BBK32</b>	<i>Fibronectin-binding protein</i> BBK32	<b>LoQ</b>	Limite de quantification
<b>Bbsl</b>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	<b>m/z</b>	Rapport masse sur charge
<b>Bbss</b>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	<b>MAC</b>	Complexe d'attaque membranaire
<b>BCA</b>	BiCinchoninic acid Assay	<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption- Time of Flight</i>
<b>BET</b>	Bromure d'éthidium	<b>MOWSE</b>	<i>Molecular Weight S</i> Earch
<b>Bg</b>	<i>Borrelia garinii</i>	<b>MS</b>	Spectrométrie de masse
<b>BLI</b>	biolayer interferometry	<b>MSA</b>	Sécurité sociale agricole
<b>Bmp</b>	<i>Borrelia membrane protein</i>	<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin	<b>NK</b>	<i>Natural killer cell</i>
<b>BSK-II</b>	Barbour-Stoenner-Kelly modifié	<b>NR</b>	Non réductrice
<b>CAS</b>	Anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobines de souris Ig(G+M)	<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>CCL</b>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>	<b>Osp</b>	<i>Outer surface protein</i>
<b>CD</b>	Cellules dendritiques	<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>CDC</b>	Center for Disease Control and prevention	<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>CHCA</b>	cyano-4-hydroxycinnamique hydroxycinnamique	<b>PEG</b>	polyéthylène glycol
<b>CNR</b>	Centre National de Référence	<b>pI</b>	Point Isoélectrique
<b>CRASP</b>	<i>Complement regulator-acquiring surface protein</i>	<b>pi</b>	Post-inoculation
<b>CXCL</b>	Chimioattractant des lymphocytes B	<b>PMF</b>	Peptide mass fingerprinting
<b>Dbp</b>	<i>Decorin-binding protein</i>	<b>PSM</b>	Poste de sécurité microbiologique
<b>DC-SIGN</b>	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule3-grabbing non integrin</i>	<b>PVDF</b>	Polyfluorure de vinylidène
<b>DDT</b>	Dichloro-diphényl-trichloroéthane	<b>qPCR</b>	PCR quantitative
<b>DEET</b>	N,N-Diéthyl-m-toluamide	<b>R</b>	Réductrice
<b>DMF</b>	Diméthylformamide anhydre	<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>DTNB</b>	Acide dithio-bisnitrobenzoïque	<b>RST</b>	<i>Ribosomal spacer type</i>
<b>ECL</b>	Electrochemiluminescence	<b>s.l.</b>	sensu lato
<b>ECM</b>	Matrice extracellulaire	<b>s.s.</b>	sensu stricto
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra Acétique	<b>Salp</b>	<i>Salivary protein</i>
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Immunoassays</i>	<b>SCID</b>	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>ELISPOT</b>	<i>Enzyme-linked immunospot</i>	<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>EM</b>	Erythème migrant	<b>SMCC</b>	N-succinimidyl-4-(Nmaléimidométhyl)- cyclohexane-1-carboxylate
<b>Erp</b>	OspE-F related lipoprotein	<b>Sp</b>	Spirochètes
<b>EU</b>	Unité Ellman	<b>SPIE-IA</b>	<i>Solid-phase immobilized epitope Immunoassay</i>
<b>EUCALB</b>	European concerted action against Lyme Borreliosis	<b>SPL</b>	Syndrome post Lyme
<b>FDA</b>	Food drug and administration	<b>TAE</b>	Tris Acétate EDTA
<b>Fla</b>	Flagelline	<b>Tm</b>	Température de fusion
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane	<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>GSK</b>	Glaxo Wellcomeet Smithkline Beecham	<b>TROSPA</b>	<i>Tick receptor for OspA</i>
<b>HAT</b>	Hypoxanthine Aminoptérine-Thymidine	<b>UE</b>	Unités Ellman
<b>HCl</b>	Acide chloridrique	<b>UFC</b>	Unités formant colonies
<b>HRP</b>	<i>Horse-Radish Peroxidase</i>	<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>IC</b>	Immuno-complexe	<b>VlsE</b>	<i>Variable major protein (VMP)-like sequence E lipoprotein</i>
<b>IEF</b>	Focalisation isoélectrique	<b>WB</b>	Western blot
<b>IFN</b>	Interféron		
<b>Ig</b>	Immunoglobuline		

## ***Table des matières***

Liste des figures .....	1
Liste des tableaux .....	4
<b>Introduction générale</b> .....	<b>5</b>
<b>I. La borréliose de Lyme</b> .....	<b>7</b>
1. Historique .....	7
2. Le vecteur : la tique du genre <i>Ixodes</i> .....	8
2.1 Taxonomie.....	8
2.2 Anatomie de la tique : les caractéristiques.....	9
2.3 Le cycle de développement.....	10
2.4 Biotope et répartition géographique .....	12
2.5 Transmission des pathogènes .....	13
3. Les bactéries <i>B. burgdorferi</i> sensu lato .....	13
3.1 Taxonomie et répartition.....	13
3.2 Caractéristiques morphologiques .....	15
3.3 Caractéristiques métaboliques et culturales .....	18
3.4 Génomique bactérienne.....	19
3.5 La pathogénie .....	20
3.5.1 Le point d'entrée des bactéries.....	20
3.5.2 La dissémination du pathogène .....	21
3.5.3 Une bactérie capable d'échapper au système immunitaire .....	22
Échappement du système immunitaire inné .....	23
Échappement au système immunitaire adaptatif .....	24
3.5.4 Les antigènes bactériens : les protéines de surface .....	27
Outer surface protein (Osp) A et B.....	27

	Outer surface protein (Osp) C .....	28
	Decorin binding protein (Dbp) A et B .....	29
	Variable major protein (Vmp)-like sequence E.....	29
	3.5.5 Les modèles animaux .....	31
4.	L'épidémiologie de la borréliose de Lyme.....	33
5.	Le coût économique .....	35
6.	Les manifestations cliniques.....	36
6.1	La phase précoce localisée .....	36
6.2	La phase disséminée .....	37
6.3	La phase tardive ou « chronique ».....	38
7.	Le traitement et la prévention .....	39
7.1	Le traitement curatif.....	39
7.2	La prévention.....	40
<b>II.</b>	<b>Le diagnostic de la maladie de Lyme .....</b>	<b>41</b>
1.	Le diagnostic clinique.....	42
2.	Les diagnostics biologiques .....	42
2.1	Les généralités .....	42
2.2	Le diagnostic indirect.....	43
2.2.1	Le test immuno-enzymatique ELISA.....	44
2.2.2	Le test de confirmation : l'immunodot ou western blot.....	46
2.2.3	Autodiagnosics.....	47
2.2.4	Les limites.....	48
	Les réactions croisées.....	48
	La diversité de souches européennes .....	49
	La « fenêtre » de séronégativité.....	49
	Les complexes immuns .....	49
	La « cicatrice sérologique ».....	49

2.3	Les tests non conventionnels.....	50
2.3.1	Réponse inflammatoire et auto-immune.....	50
2.3.2	Réponse immunitaire cellulaire.....	51
2.3.3	Le xénodiagnostic.....	51
2.4	Le diagnostic direct.....	52
2.4.1	Culture et examen microscopique .....	52
2.4.2	L'amplification de l'ADN par PCR.....	53
2.4.3	La détection d'antigènes bactériens dans les liquides biologiques et dans la peau.....	55
3.	La problématique générale du diagnostic.....	56

<b>Projet de thèse.....</b>	<b>57</b>
-----------------------------	-----------

<b>CHAPITRE I : Recherche et identification d'antigènes circulants.....</b>	<b>59</b>
---	-----------

<b>I. Introduction .....</b>	<b>60</b>
------------------------------	-----------

<b>II. Résultats &amp; discussion .....</b>	<b>64</b>
---	-----------

1.	Modèle murin d'infection : lignée immunocompétente C3H/HeN.....	64
----	---	----

1.1	Suivi de l'infection .....	65
-----	----------------------------	----

1.1.1	Suivi des signes cliniques des souris C3H/HeN.....	66
-------	--	----

1.1.2	Suivi des réponses polyclonales des souris infectées .....	66
-------	--	----

1.1.3	Détection de l'ADN de <i>Borrelia burgdorferi</i> dans les tissus.....	68
-------	--	----

1.2	Conclusion du modèle murin d'infection C3H/HeN .....	68
-----	--	----

2.	Recherche et identification des antigènes circulants de <i>B. burgdorferi</i> 297 sur un modèle murin immunodéprimé et immunocompétent .....	69
----	--	----

2.1	Suivi de l'infection .....	70
-----	----------------------------	----

2.1.1	Suivi des signes cliniques des souris C3H/HeN.....	70
-------	--	----

2.1.2	Réponses polyclonales des souris infectées .....	71
-------	--	----

2.2	Détection de l'ADN de <i>Borrelia</i> dans les tissus.....	72
2.3	Identification d'antigènes circulants : analyse des plasmas immuns « InMAD » .....	74
2.3.1	Mise en évidence de protéines immuno-réactives par western blot.....	74
2.3.2	Identification des antigènes circulants par spectrométrie de masse.....	79
2.4	Discussion.....	83
<b>III.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>85</b>

## **CHAPITRE II : Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes circulants et développement de tests immuno-enzymatiques.....86**

<b>I.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>87</b>
<b>II.</b>	<b>Résultats &amp; discussion.....</b>	<b>90</b>
1.	Développement d'outils immunologiques pour la détection de deux marqueurs précoces, FlaB et OspC, et évaluation dans un modèle d'infection murin.....	90
1.1	Introduction de l'article.....	90
1.2	L'article.....	91
1.3	Discussion et conclusion de l'article.....	105
2.	La production et le criblage des anticorps monoclonaux dirigés contre OspA et le peptide C6 de VlsE.....	108
2.1	La production des anticorps monoclonaux.....	108
2.1.1	La production des protéines recombinantes.....	108
2.1.2	Couplage du peptide-C6 à la BSA-SMC.....	110
2.1.3	Réponses immunitaires des souris immunisées.....	110
2.1.4	La sélection des hybridomes.....	111
2.1.5	Production des anticorps monoclonaux en surnageant de culture et purification.....	113
2.2	La caractérisation des anticorps monoclonaux.....	115
2.2.1	Les analyses combinatoires.....	115

OspA .....	115
VlsE.....	116
2.2.2 Détection par western blot .....	117
2.2.3 Les paramètres cinétiques de liaison des anticorps .....	119
2.3 Les tests immuno-enzymatiques ELISA et SPIE-IA.....	121
2.3.1 Test ELISA pour OspA.....	121
2.3.2 Test SPIE-IA pour VlsE.....	122
<b>III. Conclusion &amp; perspectives.....</b>	<b>123</b>

### **CHAPITRE III : Analyse d'une cohorte d'échantillons de sérum humain .....**

<b>I. Introduction .....</b>	<b>126</b>
<b>II. Résultats et discussion.....</b>	<b>127</b>
1. Dosage ELISA des anticorps IgM et IgG des patients dirigés contre OspC et la région C10.....	127
2. Mise au point d'une méthode de dissociation de complexes immuns impliquant l'épitope C10 d'OspC.....	130
3. Dosage SPIE-IA OspC des échantillons de sérum de patients lyme après traitement pour décomplexer les IC .....	132
4. Dosage SPIE-IA des échantillons de sérum de patient lyme sans traitement de décomplexation .....	133
5. Discussion générale.....	134
<b>III. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>136</b>

### **Conclusion générale et perspectives.....**

### **Matériels et méthodes.....**

#### **I. Le matériel biologique utilisé.....**

1.	Les tampons et réactifs .....	142
2.	Les bactéries.....	143
2.1	La collection bactérienne .....	143
2.2	Vérification de la présence du gène <i>ospc</i> .....	143
3.	Les traceurs .....	144
3.1	Le couplage des peptides à l'AchE.....	144
3.2	Le couplage des protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux à la biotine .....	145
<b>II.</b>	<b>L'expérimentation animale.....</b>	<b>145</b>
1.	L'infection des souris pour la stratégie InMAD .....	145
2.	L'immunisation des souris pour la stratégie InMAD.....	146
3.	L'immunisation des souris pour la production d'anticorps monoclonaux .....	146
<b>III.</b>	<b>Méthodes de suivi de l'infection .....</b>	<b>146</b>
1.	Détection de l'ADN de <i>B. burgdorferi</i> dans les tissus de souris .....	146
1.1	Extraction de l'adn de <i>Borrelia</i> .....	146
1.2	Méthode d'amplification génique.....	147
1.2.1	La PCR nichée.....	147
1.2.2	La PCR en temps réel .....	149
2.	L'ELISA pour le suivi de la réponse polyclonale.....	152
2.1	La préparation des phases solides.....	152
2.2	Le test ELISA.....	153
3.	Le western blot.....	153
<b>III.</b>	<b>Recherche et identification des biomarqueurs.....</b>	<b>154</b>
1.	L'électrophorèse bidimensionnelle .....	154
2.	Analyse des protéines d'intérêt par MALDI-TOF .....	155
<b>IV.</b>	<b>Production des anticorps monoclonaux .....</b>	<b>156</b>
1.	Production et purification des protéines recombinantes.....	156

1.1	Production des protéines recombinantes dans la fraction soluble .....	156
1.2	Production des protéines recombinantes dans les corps d'inclusion .....	156
1.3	Purification des protéines par chromatographie d'affinité.....	157
1.4	Dosage des protéines recombinantes .....	157
2.	Le couplage des peptides à la BSA-SMC.....	157
3.	Production des anticorps monoclonaux (AcMs).....	158
3.1	L'immunisation des souris .....	158
3.2	L'obtention des hybridomes par fusion .....	158
3.3	La purification et l'isotypage des anticorps monoclonaux .....	158
4.	Les dosages immuno-enzymatiques pour le criblage des anticorps monoclonaux .....	159
<b>IV.</b>	<b>Caractérisation des anticorps monoclonaux .....</b>	<b>160</b>
1.	L'analyse combinatoire .....	160
1.1	La préparation des phases solides.....	160
1.2	Le test elisa pour la combinatoire.....	160
2.	L'interférométrie de bio-couche (bio-layer interferometry ou BLI).....	160
3.	Détermination de la sensibilité de détection en western blot .....	162
<b>V.</b>	<b>Mise en place des différentes méthodes de dosages .....</b>	<b>162</b>
1.	Les dosages immunométriques .....	162
1.1	Dosage sandwich pour la détection de FlaB et OspA.....	163
1.2	Le spie-ia pour le dosage d'OspC et VlsE .....	163
1.3	La limite théorique de détection et de quantification des immunodosages ..	164
2.	L'immunocapture suivie du western blot.....	164
3.	L'extraction protéique des échantillons murins .....	165
<b>VI.</b>	<b>Analyse d'une cohorte d'échantillons de sérum humain .....</b>	<b>167</b>
1.	Les sérums Cerba .....	167
2.	Dosage ELISA des réponses IgG et IgM dirigées contre le peptide C10 .....	167

3.	Mise au point d'une méthode de dissociation de complexes immuns .....	168
	<b>Bibliographie</b> .....	170
	<b>Annexes</b> .....	210
Annexe 1 :	alignement des séquences en acides aminés des protéines FlaB de <i>B. burgdorferi</i> s.l. ....	212
Annexe 2 :	alignement des séquences en acides aminés des protéines OspA de <i>B. burgdorferi</i> s.l. ....	213
Annexe 3 :	alignement des séquences en acides aminés des protéines OspC de <i>B. burgdorferi</i> s.l. ....	214
Annexe 4 :	alignement des séquences en acides aminés des protéines VlsE de <i>B. burgdorferi</i> s.l. ....	215

## Liste des figures

Figure 1 : Classification des tiques dures. ....	8
Figure 2 : Morphologie générale schématique d'une tique ixodidé. ....	10
Figure 3 : Cycle de vie d' <i>Ixodes ricinus</i> . ....	11
Figure 4 : Cartographie de la distribution des tiques du complexe <i>Ixodes ricinus</i> . ....	12
Figure 5 : Taxonomie de la souche <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	14
Figure 6 : Répartition mondiale des espèces du complexe <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato. .....	15
Figure 7 : Structure et morphologie de <i>Borrelia burgdorferi</i> . ....	16
Figure 8 : Corps sphériques de <i>Borrelia burgdorferi</i> induits par la pénicilline.....	17
Figure 9 : Formation <i>in vitro</i> d'un biofilm de <i>Borrelia burgdorferi</i> . ....	18
Figure 10 : Structure génomique de <i>Borrelia burgdorferi</i> . ....	19
Figure 11 : Interface entre la tique et l'hôte.....	26
Figure 12 : L'enveloppe de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato. ....	27
Figure 13 : Variation antigénique de VlsE. ....	31
Figure 14 : Taux d'incidence de la maladie de Lyme en France métropolitaine en 2020.....	34
Figure 15 : Manifestation clinique précoce de la maladie de Lyme. ....	36
Figure 16 : Manifestations cliniques de la maladie de Lyme au stade disséminé.....	37
Figure 17 : Manifestation clinique tardive de Lyme , l'acrodermatite chronique atrophiante. ....	38
Figure 18 : Évolution du taux d'IgM et IgG après infection par la maladie de Lyme. ....	43
Figure 19 : Principe de l'ELISA indirect. ....	45
Figure 20 : Principe de la stratégie InMAD.....	61
Figure 21 : Principe du « Peptide mass fingerprinting » (PMF).....	62
Figure 22 : Protocole d'infection des souris C3H/HeN avec les trois souches majoritaires retrouvées en Europe de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato. ....	64
Figure 23 : Présence du gène <i>ospC</i> dans les différentes souches de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. .....	65
Figure 24 : Réponses polyclonales des souris infectées avec différentes souches de <i>Borrelia</i> par ELISA. ....	67
Figure 25 : Réponses polyclonales des souris infectées avec différentes souches de <i>Borrelia</i> par western blot. ....	67

Figure 26 : Protocole d'infection et d'identification des antigènes circulants pour la souche <i>B. burgdorferi</i> 297. ....	70
Figure 27 : Réponses polyclonales des souris CB17scid et C3H/HeN infectées <i>B. burgdorferi</i> 297 par ELISA. ....	71
Figure 28 : Réponses polyclonales des souris CB17scid et C3H/HeN infectées <i>B. burgdorferi</i> 297 par western blot. ....	72
Figure 29 : Quantification de <i>B. burgdorferi</i> 297 dans les oreilles de souris infectées. ....	73
Figure 30 : Quantification de <i>B. burgdorferi</i> 297 après hémoculture. ....	74
Figure 31 : Analyse des plasmas de souris immunisées contre la souche <i>Borrelia burgdorferi</i> 297 (C3H/HeN). ....	75
Figure 32 : Analyse des plasmas de souris immunisées contre la souche <i>Borrelia burgdorferi</i> 297 (CB17scid). ....	76
Figure 33 : Immunoblot bidimensionnel pour identifier les protéines de <i>Borrelia burgdorferi</i> 297 reconnues par les sérums immuns InMAD à 15j pi. ....	77
Figure 34 : Immunoblot sur gel électrophorèse 1D pour identifier les protéines de <i>B. burgdorferi</i> 297 reconnues par les sérums immuns InMAD à 15j pi. ....	78
Figure 35 : Alignement des séquences protéiques d'OspA de <i>Bbss</i> B31 et <i>Bbss</i> 297. ....	82
Figure 36 : Alignement des séquences protéiques partielles de FlaB de <i>Bbss</i> B31 et <i>Bbss</i> 297. ....	83
Figure 37 : Principe de l'ELISA sandwich. ....	89
Figure 38 : Principe du SPIE-IA (Solid phase-immobilized epitope immunoassay). ....	89
Figure 39 : Structure tridimensionnelle d'OspC. ....	91
Figure 40 : Analyse SDS-PAGE dans des protéines recombinantes OspA et VlsE. ....	109
Figure 41 : Structure tridimensionnelle de VlsE. ....	110
Figure 42 : Réponse immunitaire des souris immunisées avec la protéine OspA ou le peptide C6 de VlsE et sélectionnées pour la production des anticorps. ....	111
Figure 43 : Analyse SDS-PAGE de cinq anticorps monoclonaux anti-OspA. ....	113
Figure 44 : Détection d'OspA par western blot en utilisant l'anticorps OspA-35. ....	118
Figure 45 : Détection de VlsE par western blot en utilisant l'anticorps C6-4. ....	119
Figure 46 : Courbe standard de l'ELISA sandwich OspA. ....	121
Figure 47 : Courbe standard du SPIE-IA VlsE. ....	122
Figure 48 : Distribution des titres en IgG et IgM dans les sérums de patients. ....	128

Figure 49 : Corrélation entre les mesures d'IgM et d'IgG dirigés contre la protéine recombinante OspC et/ou le peptide C10. ....	129
Figure 50 : Effet de divers traitements sur l'antigène OspC.....	130
Figure 51 : Effet de divers traitements sur l'antigène OspC complexé avec l'anticorps C10. ....	131
Figure 52 : Courbe étalon obtenue par SPIE-IA pour la détection OspC dans le sérum dilué au ½ après un traitement thermique 5min à 95°C.....	132
Figure 53 : Courbe étalon obtenue par SPIE-IA pour la détection OspC dans le sérum dilué au ¼.....	134
Figure 54 : Principe de la PCR nichée pour l'amplification de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato. ....	148
Figure 55 : Représentation graphique de la courbe standard de qPCR. ....	150
Figure 56 Courbe de fusion suite à l'amplification des échantillons. ....	151
Figure 57 : Format du test ELISA utilisé.....	152
Figure 58 : Principe du western blot.....	153
Figure 59 : Format des dosages immuno-enzymatiques pour le criblage de nos AcMs. ....	159
Figure 60 : Format des tests ELISA pour le dosage des cibles.....	163
Figure 61 : Schéma décrivant les étapes pour l'analyse des tissus infectés à <i>Borrelia</i> .....	166
Figure 62 : Format du test ELISA pour le dosage des IgG et IgM spécifiques sur antigènes immobilisés. ....	167

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les bactéries de l'ordre des <i>Spirochaetales</i> associées à des pathologies humaines. .....	14
Tableau 2 : Traitements de la Borréliose de Lyme chez l'adulte. ....	40
Tableau 3 : Principaux antigènes entrant dans la composition des tests sérologiques.....	45
Tableau 4 : Performance des tests de diagnostics actuellement recommandés. ....	48
Tableau 5 : Origines et infectivités des différentes souches de <i>B. burgdorferi</i> s.l. utilisées dans cette étude. ....	63
Tableau 6 : Identification des protéines par analyse MALDI-TOF. ....	79
Tableau 7 : Comparaison des séquences obtenues par MALDI-TOF et par digestion trypsique <i>in silico</i> .....	80
Tableau 8: Résultats des criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps spécifiques d'OspA. ....	112
Tableau 9 : Résultats des deux criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps anti-peptidiques spécifiques contre la région C6 de la protéine VlsE.....	112
Tableau 10 : Bilan des anticorps monoclonaux purifiés anti-OspA.....	114
Tableau 11 : Bilan des anticorps monoclonaux purifiés contre la région C6 de la protéine VlsE. .....	115
Tableau 12: Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-OspA.....	116
Tableau 13 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-VlsE. ....	117
Tableau 14 : Paramètres cinétiques des anticorps monoclonaux pour les protéines OspA et VlsE. ....	120
Tableau 15 : Résultats des tests ELISA sérologiques réalisés par le laboratoire Cerba Xpert. .....	127
Tableau 16 : Seuil de positivité pour les différents dosages ELISA des réponses en IgG et IgM. .....	128
Tableau 17 : Echantillons de sérums humains sélectionnés pour le passage en SPIE-IA.....	133
Tableau 18 : Collection bactérienne de <i>Borrelia</i> .....	143
Tableau 19 : Amorces forward utilisées. ....	144
Tableau 20 : Amorces utilisées. . ....	149
Tableau 21 : Tests sérologiques utilisés par le laboratoire Cerba Xpert. ....	167

# *Introduction générale*

La maladie de Lyme ou Borréliose de Lyme est la maladie infectieuse à transmission vectorielle la plus courante dans l'Hémisphère Nord<sup>1</sup>. Elle est causée par le spirochète *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.)<sup>2</sup>. Cette infection est transmise par l'intermédiaire d'une piqûre de tique appartenant au genre *Ixodes*. Cette zoonose a une grande diversité d'hôte. Les animaux réservoirs sont nombreux (rongeurs, oiseaux, lézards, etc.), l'homme quant à lui est un hôte accidentel<sup>3</sup>.

La Borréliose de Lyme se distingue par des manifestations cliniques variées (cutanées, neurologiques et articulaires)<sup>4</sup>. Les symptômes peuvent être répartis selon trois stades de la maladie : précoce, disséminé et tardif. Le stade précoce de la maladie est caractérisé par une éruption cutanée typique nommée érythème migrant présent dans 70% à 80% des cas<sup>5</sup>, souvent accompagné de fièvre et de fatigue. Si elle n'est pas traitée, la bactérie peut se propager dans l'organisme et atteindre différents organes et tissus. Les manifestations tardives peuvent survenir plusieurs mois à plusieurs années après le début de l'infection<sup>6</sup>. La plupart du temps, les personnes atteintes de la Borréliose de Lyme sont traitées efficacement avec des antibiotiques appropriés, à condition que le diagnostic soit posé correctement<sup>7</sup>.

En absence d'érythème migrant, l'approche recommandée pour le diagnostic biologique de la maladie de Lyme comprend un test immuno-enzymatique indirect (ELISA) visant à détecter la présence d'anticorps dirigés contre la bactérie, suivi d'un western blot<sup>8</sup> de contrôle. Cependant, ces tests ne prouvent pas l'existence d'une infection active et ne sont pas recommandés dans la phase précoce de la maladie<sup>9</sup> puisque la réponse immunitaire antibactérienne n'est pas encore établie.

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de cas de personnes atteintes ne cesse d'augmenter. Rien qu'en France, le nombre de nouveaux cas chaque année serait d'environ 50 000 personnes<sup>10</sup>.

La maladie de Lyme est donc un véritable enjeu de santé publique. Au cours de mon travail de thèse, je me suis focalisée sur la problématique du diagnostic avec pour objectif le développement d'un diagnostic direct visant à améliorer, par la suite, la prise en charge des patients.

# I. La Borréliose de Lyme

## 1. Historique

Les premières descriptions de la maladie de Lyme remontent à la fin XIX - début XX<sup>ème</sup> siècle tout d'abord en Europe puis aux États-Unis<sup>11</sup>. En 1883, le Docteur Buchwald décrivait en Allemagne des lésions au niveau de la peau, il qualifia ses liaisons d'acrodermatite chronique atrophiante (ACA)<sup>12</sup>, sans pour autant faire de lien avec la Borréliose.

Quelques années plus tard, le dermatologue suédois Afzelius rapporte en 1907 la persistance d'une lésion cutanée suite à une piqûre de tique, Lipschütz (1913) l'appellera *erythema chronicum migrans*<sup>13,14</sup>.

Deux autres médecins français, Charles Garin et Charles Bujadoux de Lyon, rapportent en 1922 des troubles neurologiques avec des paralysies, également survenus après une piqûre de tique<sup>15</sup>.

C'est ensuite dans les années 50 qu'est évoquée pour la première fois l'origine infectieuse de la maladie<sup>16</sup> de par sa sensibilité à la pénicilline durant le traitement des érythèmes. Le rôle de la tique du genre *Ixodes*, comme agent vectoriel de cette maladie est encore inconnu<sup>17</sup>.

C'est dans les années 1970 que la Borréliose Lyme a été réellement décrite, dans la localité de Lyme dans l'Etat du Connecticut aux États-Unis<sup>18</sup>. Les auteurs ont constaté une épidémie d'arthrite majoritairement infantile, les patients rapportent presque systématiquement avoir été piqué par une tique les quelques mois précédant le début des douleurs articulaires<sup>18</sup>.

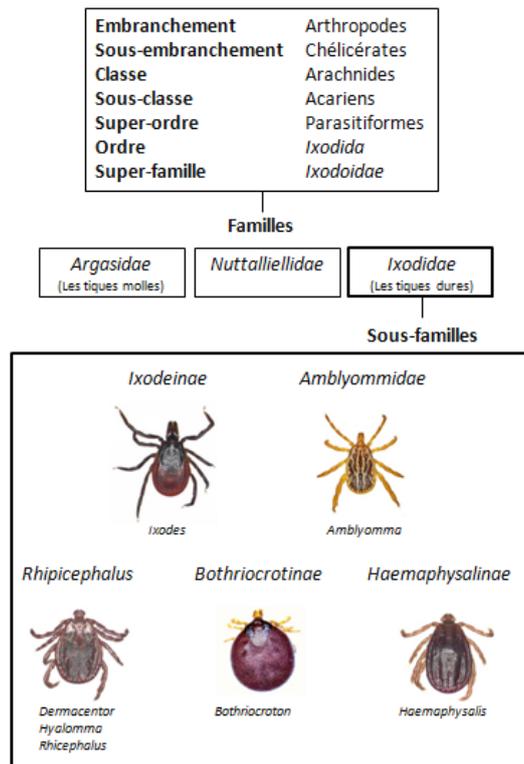
Une description clinique est ensuite réalisée en 1977 par le Dr. Allen Steere, avec la présence d'un érythème migrant, d'un épisode grippal, et d'arthrose. L'ensemble de ces symptômes est regroupé sous le nom d'« arthrite de Lyme »<sup>19</sup> puis de « maladie de Lyme » après la reconnaissance des symptômes cardiaques et neurologiques.

L'étude de la maladie se poursuit en 1982 avec l'isolement et l'identification de l'agent causal de la maladie. William Burgdorfer identifie au sein de l'intestin de la tique *Ixodes dammini*<sup>20</sup> une spirochète correspondant à une nouvelle espèce de *Borrelia*, cette bactérie sera baptisée *Borrelia burgdorferi*<sup>21</sup>. La découverte de l'agent causal de la maladie de Lyme est donc relativement récente.

## 2. Le vecteur : la tique du genre *Ixodes*

### 2.1 Taxonomie

Les tiques font partie de l'embranchement des Arthropodes, du sous-embranchement des Chélicérates, de la classe des Arachnides et du superordre des Parasitiformes<sup>22</sup> (figure 1). Ces parasites sont des hématoiphages stricts<sup>23</sup>, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas survivre sans repas sanguin sur un hôte.



**Figure 1 : Classification des tiques dures.**

<sup>24</sup>(Modifiée d'après Boulanger et McCoy (2020)). Représentation des principales espèces de tiques dures, à ce jour plus de 249 espèces d'*Ixodes* ont été référencées.

Il existe plus de 900 espèces de tiques à travers le monde<sup>25</sup>, les deux principaux types de tiques capables d'infecter l'homme sont les tiques dures de la famille des *Ixodidae* et les tiques molles de la famille *Argasidae*<sup>23</sup>. Les tiques molles possèdent un tégument sans sclérisation contrairement aux *Ixodidae* qui possèdent des zones de tégument chitinisé dures<sup>23</sup>.

Les tiques sont capables de transmettre de nombreux pathogènes, y compris ceux responsables de la maladie de Lyme ; les tiques transmettant la maladie appartiennent au genre *Ixodes*<sup>26</sup>. Parmi ces tiques, *Ixodes ricinus* est le principal vecteur de la Borréliose de Lyme en Europe<sup>27</sup>. La systématique bien que relativement stable est toujours susceptible d'évoluer notamment grâce aux avancées dans le domaine de la biologie moléculaire<sup>28,24</sup>.

## 2.2 Anatomie de la tique : les caractéristiques

Les tiques sont des hématophages de grande taille pouvant atteindre jusqu'à 3 cm. Elles se présentent sous un aspect globuleux en deux segments : une partie antérieure appelée le capitulum et une partie postérieure l'idiosome. Elles possèdent également un exosquelette avec des appendices articulés (figure 2)<sup>29</sup>.

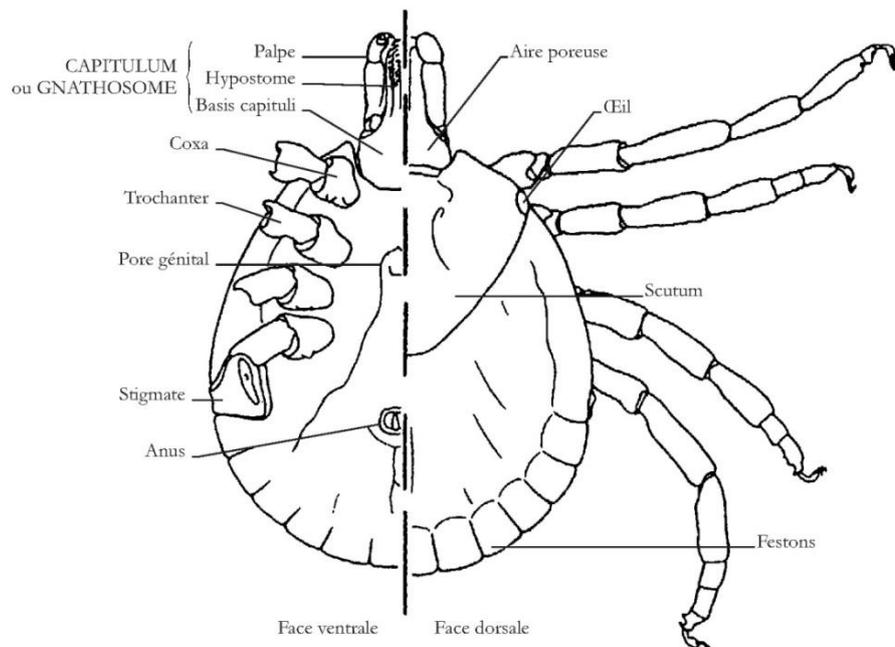
Sur le capitulum, on retrouve tous les organes nécessaires à la fixation sur l'hôte. Ce capitulum est composé d'une paire de pédipalpes qui joue un rôle sensoriel, d'un hypostome correspondant aux dents et d'un rostre pour perforer et s'ancrer solidement dans la peau de l'hôte<sup>30</sup>.

L'idiosome correspond au reste du corps de la tique. Il est composé de pores, de soies, des pattes, de l'orifice génital ainsi que des stigmates respiratoires au niveau dorso-latéral lors du stade nymphe et adulte de la tique<sup>29</sup>.

L'écusson recouvre partiellement ou presque totalement chez le mâle adulte, la face dorsale des tiques. L'exosquelette correspond le plus souvent à une plaque chitineuse et rigide. Ce critère permet notamment de distinguer les tiques mâles et femelles<sup>30</sup>.

Les tiques qui nous intéressent ici, du genre *Ixodes*, sont relativement petites entre 2 et 10 mm avec un rostre très long. Leurs sillons péri-anaux contournent l'anus par l'avant et on ne constate pas la présence de festons ni d'yeux. De plus, un dimorphisme sexuel est présent. La femelle s'avère beaucoup plus grosse que le mâle et la rigidification du scutum chez le mâle diminue sa capacité à fixer l'hôte et donc limite fortement son gorgement.

Concernant l'anatomie interne, elle est relativement similaire entre les différentes tiques. L'hémocèle est la cavité la plus importante contenant une grande partie des organes (intestins, glandes salivaires, système nerveux, synganglion, système reproducteur), elle est également remplie d'hémolymphe : un liquide jouant un rôle essentiel dans l'immunité innée de la tique. Les tiques sont aussi constituées d'un système digestif, excréteur et respiratoire (chez la larve et l'adulte) complet<sup>24</sup>.



**Figure 2 : Morphologie générale schématique d'une tique ixodidée.**

<sup>31</sup>(D'après Bonnet *et al.* (2015)).

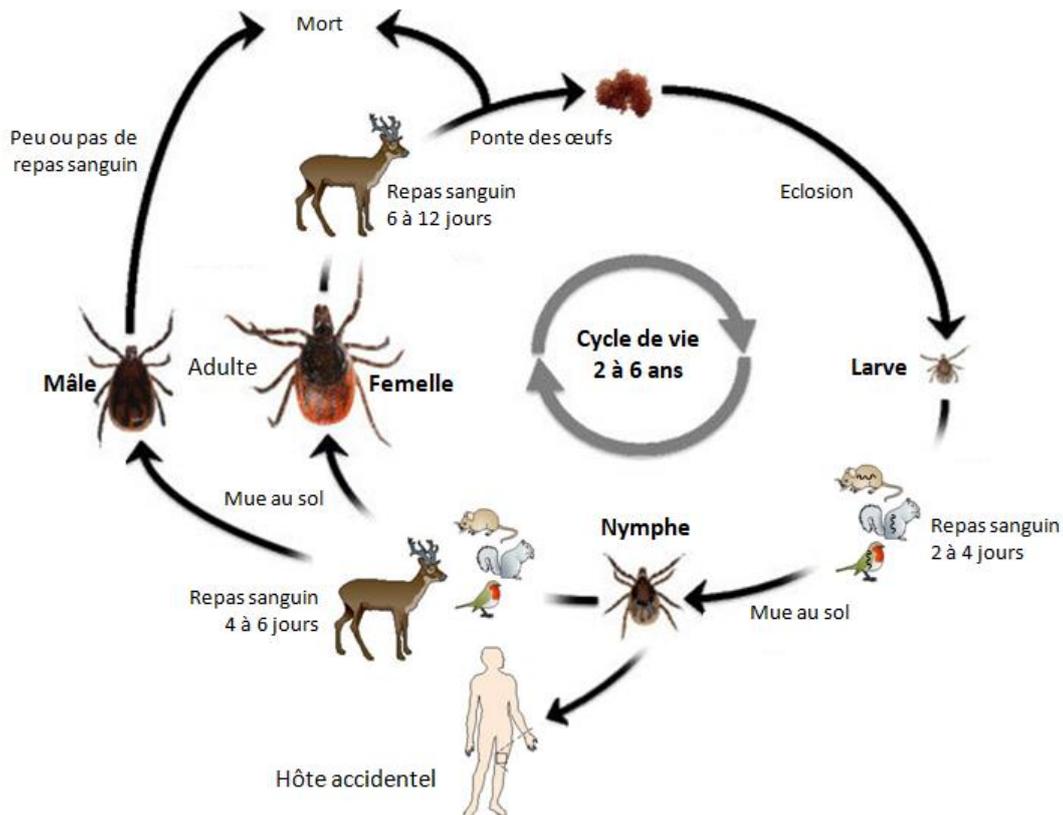
### 2.3 Le cycle de développement

Le cycle de vie d'une tique se déroule généralement en 3 phases et dure entre 2 et 3 ans<sup>31</sup>. Après s'être fixée sur l'hôte, la tique va effectuer son repas sanguin. Ces repas sont nécessaires à la survie de la tique ainsi qu'à son évolution d'une stase à l'autre. Après chaque repas, la tique va tomber au sol pour passer au stade supérieur c'est ce qu'on appelle « la mue ». Entre chaque repas, la tique est capable de survivre longtemps sans hôte c'est un stade dit « inactif ». Au cours de son cycle de développement, la tique consacre très peu de temps aux repas sanguins (environ 15 jours) par rapport au temps passé au sol à muer ou sur la végétation.

Le premier stade de développement est le stade larvaire. La larve mesurant moins d'un millimètre est différenciable car elle possède seulement 3 paires de pattes et aucun stigmate respiratoire, car la respiration de la tique se fait par la cuticule qui est fine. La larve procède à un repas sanguin d'environ 2 à 3 jours sur un hôte de petite taille.

La larve mue ensuite en nymphe. La nymphe se présente sous la même forme que l'adulte, elle est juste plus petite. La nymphe se nourrit à son tour entre 5 à 6 jours.

La tique passe enfin au stade adulte. Les tiques mesurent de trois à cinq millimètres et se différencient en mâle et femelle. Seule la femelle effectuera systématiquement un dernier repas de 6 à 12 jours afin de terminer son stade de développement. Elle tombera ainsi au sol pour pondre jusqu'à 2000 œufs et mourir<sup>32,24</sup> (figure 3).



**Figure 3 : Cycle de vie d'*Ixodes ricinus*.**

<sup>3,33</sup>(Modifié d'après Herrmann *et al.* (2015) et Radolf *et al.* (2012)). Le cycle de vie de cette tique dure est triphasique. La larve se nourrit de petits mammifères (rongeurs), elle tombe ensuite au sol pour muer. La nymphe se nourrit aussi sur des mammifères ou des oiseaux. L'homme n'est qu'un hôte accidentel (particulièrement piqué par les nymphes). La tique adulte se nourrit principalement des grands mammifères comme des cervidés.

La tique est donc toujours en quête d'un hôte, car celui-ci est nécessaire à son développement. Il peut s'agir de 3 hôtes différents, pour ces 3 différentes phases, tant qu'il s'agit de vertébrés. À ce jour, beaucoup d'animaux sont référencés comme hôte des tiques. Plus de 300 espèces animales différentes sont connues (lézard, passereaux, rongeurs, écureuils, hérissons, sangliers, chevreuils, bétails...)<sup>34</sup>.

L'homme quant à lui est un hôte accidentel, car il ne semble pas jouer de rôle dans la survie à long terme du vecteur et du pathogène. Certains hôtes sont également appelés réservoirs, car ils nourrissent la tique et peuvent acquérir à leur tour l'agent infectieux s'il y a une piqûre. L'hôte réservoir laisse ainsi le pathogène se multiplier au sein de son organisme et à son tour l'hôte peut infecter des tiques dites naïves (non infectées)<sup>35</sup>.

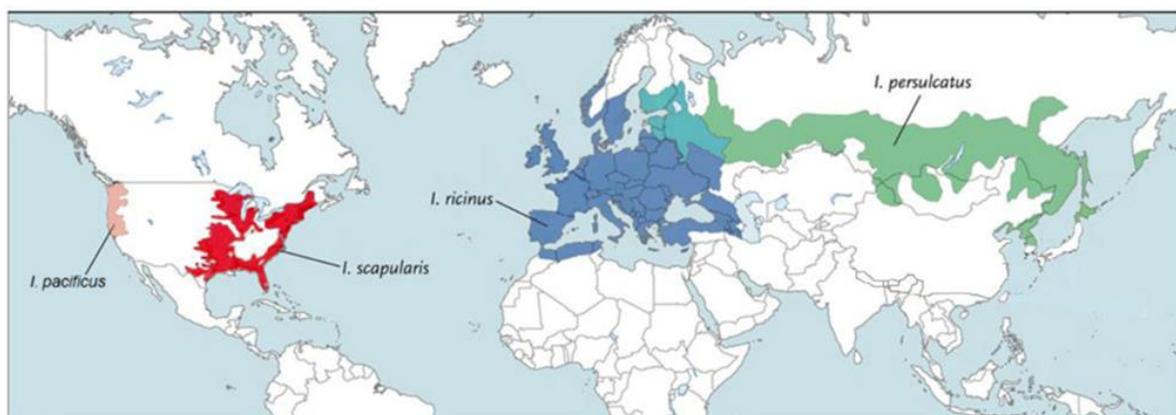
Il est important de signaler que la tique ne va pas nécessairement piquer directement l'hôte, mais elle peut se déplacer plusieurs heures sur l'hôte. La tique va repérer l'hôte *via* des organes sensoriels, comme par exemple l'organe de Haller<sup>36</sup>, situé sur la première paire de pattes qui est sensible à l'humidité et aux phéromones, mais aussi grâce à des stimuli

mécaniques. Il semblerait que les tiques possèdent également des cellules photosensibles à leur surface qui joueraient un rôle important sur l'activité et le cycle de développement de la tique<sup>37</sup>.

Les tiques ont une activité saisonnière maximale du printemps à la fin de l'automne. Parfois des cas de piqûres ont été rapportées en hiver lors de périodes où les températures sont douces<sup>24</sup>.

## 2.4 Biotope et répartition géographique

L'habitat ou le biotope des tiques est variable. En ce qui concerne la famille d'*Ixodidae*, principal vecteur de la maladie de Lyme on la retrouve sur les différents continents. Aux États-Unis, *Ixodes scapularis* (= *Ixodes dammini*) se trouve majoritairement sur la côte Est alors qu'*Ixodes pacificus* sur la côte Ouest. En Europe, on retrouve majoritairement *Ixodes ricinus*<sup>38</sup> (figure 4). En France, les tiques existent sur tout le territoire métropolitain. Sa répartition va dépendre de la température, de l'hygrométrie et de la végétation<sup>38</sup>. Les tiques sont hygrophiles et apprécient un taux d'humidité relatif d'au moins 80%. Elles se trouvent généralement dans la végétation à hauteur d'hôte (strate herbacée) pour s'accrocher lorsque l'occasion se présente<sup>37</sup>. Les tiques se retrouvent principalement dans les bois, mais aussi dans les prairies. En règle générale, la tique peut survivre dans des zones moins favorables, cela aura pour conséquence un cycle de développement beaucoup plus long<sup>39</sup>.



**Figure 4 : Cartographie de la distribution des tiques du complexe *Ixodes ricinus*.**

<sup>38</sup>(D'après Diuk-Wasser *et al.* (2017)). Quatre espèces du complexe *Ixodes* transmettent des agents pathogènes à l'homme. Sa répartition est hétérogène à la surface du globe.

## 2.5 Transmission des pathogènes

La transmission du ou des pathogènes se fait durant le repas sanguin, les agents infectieux multipliés dans l'intestin de la tique migrent vers les glandes salivaires et sont ainsi transmis lors de la piqûre<sup>40</sup>. Parfois, les pathogènes sont déjà présents au niveau des glandes salivaires pouvant ainsi être injectées immédiatement après l'attachement<sup>41</sup>. La transmission lors d'une piqûre se fait en moyenne en 24 heures, mais l'efficacité maximale de transmission est atteinte en 72 heures<sup>42</sup>.

Le vecteur de type *Ixodes* transmet les bactéries *Borrelia burgdorferi* sensu lato, causant la maladie de Lyme. Les tiques peuvent contenir en moyenne  $10^3$  à  $10^4$  bactéries dans leur intestin<sup>43</sup>. Mais la quantité de *Borrelia* transmise à l'hôte est à ce jour inconnue. Cependant, les tiques ne transmettent pas seulement les bactéries responsables de la maladie de Lyme, elles peuvent aussi transporter d'autres bactéries, virus ou protozoaires causant d'autres maladies. Les autres pathogènes transmis par les tiques en France sont responsables de maladies comme la méningo-encéphalite à tique, la tularémie, la babésiose, l'anaplasmose granulocytaire humaine ou encore d'infections à *Candidatus neohhrlichia mikurensis*<sup>44</sup>. La tique peut alors transmettre plusieurs agents infectieux en même temps, on appelle cela les co-infections<sup>45</sup>.

Les co-infections les plus courantes avec la Borréliose de Lyme sont : la Babésiose (causée par un protozoaire du genre *Babesia* qui infecte les globules rouges), la Bartonellose (due à la bactérie *Bartonella* infectant les muqueuses et les vaisseaux sanguins), la Rickettsiose (due à la bactérie *Rickettsia*), les ehrlichioses (regroupant plusieurs maladies bactériennes dont l'anaplasmose). Toutes ces maladies peuvent donner des symptômes similaires, dont une forte fièvre et une fatigue importante<sup>11,46</sup>.

## 3. Les bactéries *B. burgdorferi* sensu lato

### 3.1 Taxonomie et répartition

La maladie de Lyme est une infection bactérienne transmise par une piqûre de tique. La bactérie appartient au complexe bactérien *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bbsl*)<sup>47</sup>. Ces bactéries font partie de l'ordre des *Spirochaetales* et de la famille des *Borreliaceae*. Parmi l'ordre des *Spirochaetales*, on trouve également la famille des *Treponemataceae*, des *Spirochaetaceae* et des *Sphaerochaetaceae*. Cet ordre comprends les espèces du genre

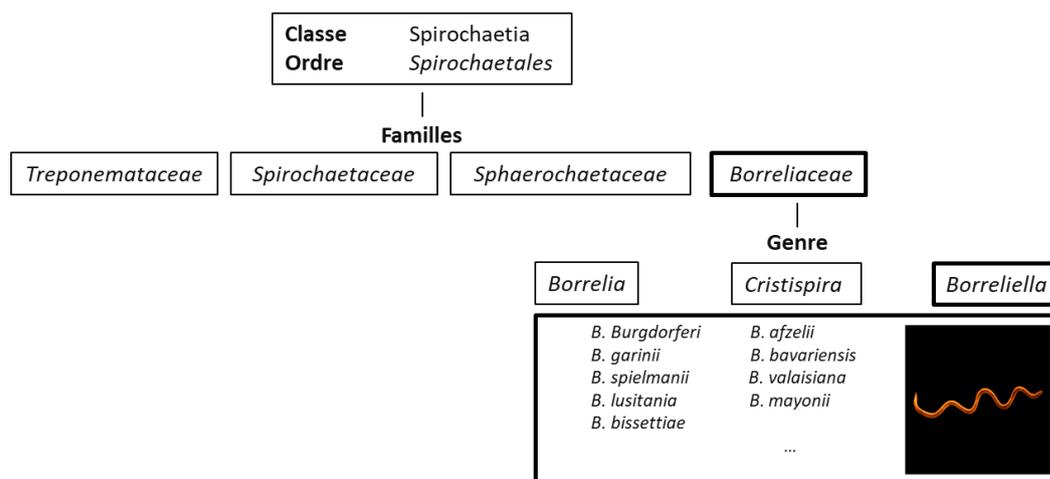
*Leptospira* ou encore l'espèce *Treponema pallidum*<sup>48</sup> responsables respectivement de la Leptospirose et de la Syphilis (tableau 1).

**Tableau 1 : Les bactéries de l'ordre des *Spirochaetales* associées à des pathologies humaines.**

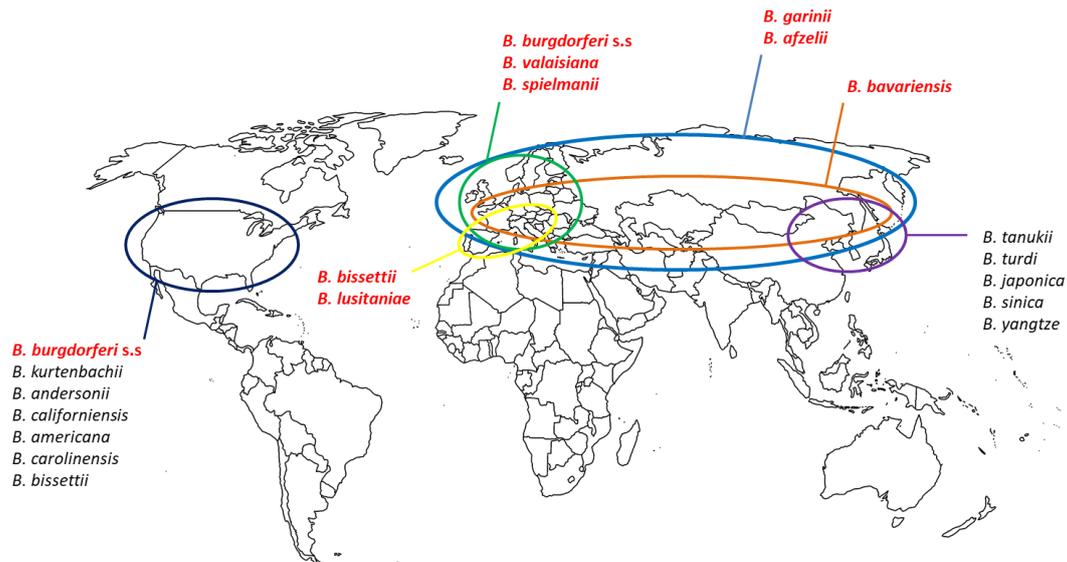
<sup>48</sup>(Créé d'après Eldin *et al.* (2019)).

Genres	Espèces	Maladies associées	Transmissions	Symptômes caractéristiques
<b>Treponema</b>	<i>T. pallidum</i> subsp. <i>Pallidum</i>	Syphilis	Sexuelle / Trans placentaire / Transfusion	Lésions / "Chancres d'inoculation"
	<i>T. pallidum</i> subsp. <i>endemicum</i>	Béjel	Contact cutané direct	Lésions cutanées et des muqueuses
	<i>T. pallidum</i> subsp. <i>pertenue</i>	Pian	Contact cutané direct	Papillomes / Ulcères cutanés
	<i>T. carateum</i>	Pinta	Contact cutané direct	Lésions cutanées
<b>Leptospira</b>	<i>L. interrogans</i>	Leptospirose	Contact avec l'animal / Eau ou aliments contaminés	Ictère / Etat pseudo-grippal
<b>Borrelia</b>	<i>B. recurrentis</i> <i>B. hermsii</i> (+ autres espèces)	Fièvres récurrentes	Poux Tiques ( <i>Ornithodoros</i> / <i>Ixodes</i> )	Fièvre / Nausées / Myalgie / Fatigue
	<b>Borreliella</b>	<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	Maladie de Lyme	Tiques ( <i>Ixodes</i> )

Un changement taxonomique est effectué en 2014, deux nouveaux genres ont été créés parmi l'embranchement des *Spirochaetae* : les *Borrelia* pour les fièvres récurrentes et *Borreliella* pour la Borréliose de Lyme<sup>49,50</sup> (figure 5).



À ce jour, plus de 22 espèces sont comptabilisées dans le complexe *Bb* s.l.<sup>51,52</sup>. Aux États-Unis, une seule espèce est référencée comme pathogène, il s'agit de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (également récemment découvert *B. mayonii*) alors qu'en Europe au moins cinq espèces ont été référencées comme pathogène pour l'homme : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* et *B. spielmanii*<sup>53</sup>. Parmi les trois principales, *B. afzelii* causerait majoritairement des manifestations cutanées, *B. burgdorferi* des manifestations articulaires et *B. garinii* des atteintes neurologiques<sup>54,55</sup> (figure 6).



**Figure 6 : Répartition mondiale des espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato.**

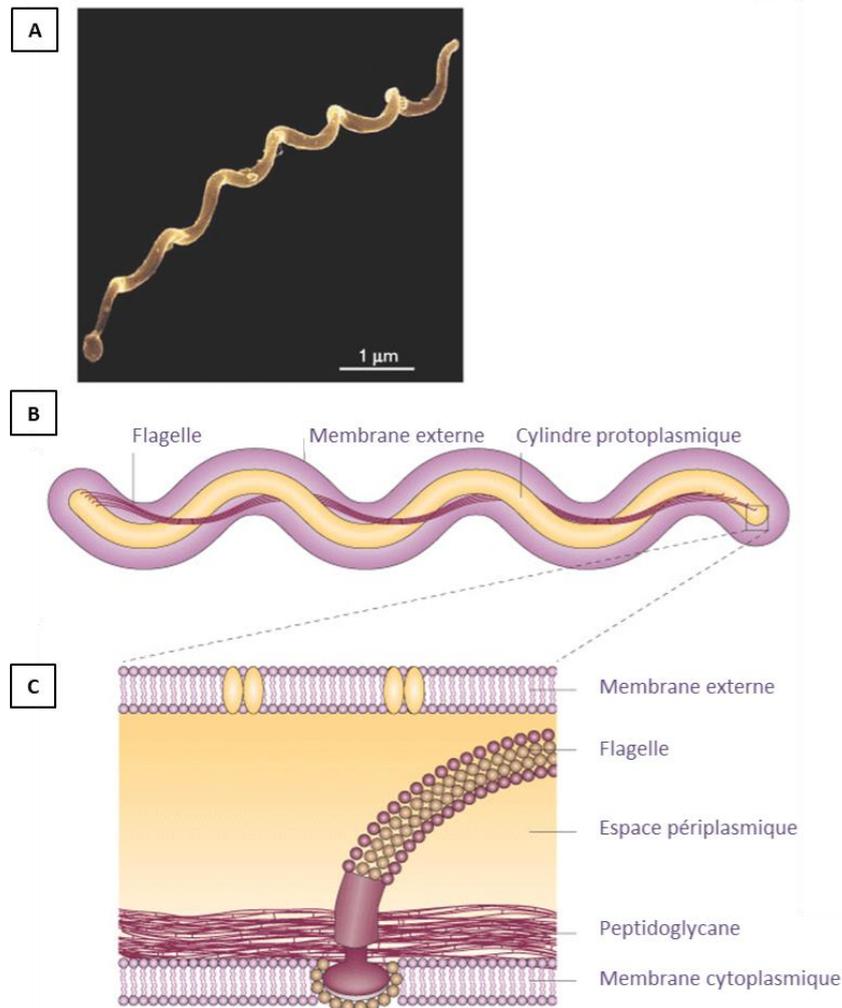
<sup>56</sup>(Modifié d'après Margos *et al.* (2011)).

### 3.2 Caractéristiques morphologiques

*Borrelia burgdorferi* sensu lato sont des bactéries très mobiles de forme hélicoïdale, facilement reconnaissables lors de l'observation en microscopie à fond noir ou en contraste de phase. Elles mesurent entre 10 et 30 µm de longueur et 0,1 et 0,5 µm de largeur<sup>57</sup>.

Elles sont caractérisées par une structure très particulière. Elles possèdent au centre un cylindre protoplasmique entouré par un espace périplasmique, lui-même délimité par une membrane externe. C'est dans cet espace périplasmique que l'on retrouve les flagelles qui sont eux-mêmes ancrés dans la membrane cytoplasmique (figure 7). Ces flagelles enroulés autour du cylindre confèrent une grande mobilité et la forme spiralée à cette bactérie, ce qui lui permet de se mouvoir dans des environnements complexes<sup>58</sup>. La flagelline est un de ses composants majoritaires<sup>6</sup>.

En coloration de Gram, l'observation est très complexe et les *Borrelia* apparaissent comme des bactéries à Gram-négative. Pourtant la structure générale de l'enveloppe externe est exceptionnelle et diffère considérablement de celles des bactéries Gram-négatives typiques. En effet, *Bbsl* ne possède pas de lipopolysaccharide<sup>59</sup>, mais plutôt des glycolipides immunoréactifs<sup>60</sup>.

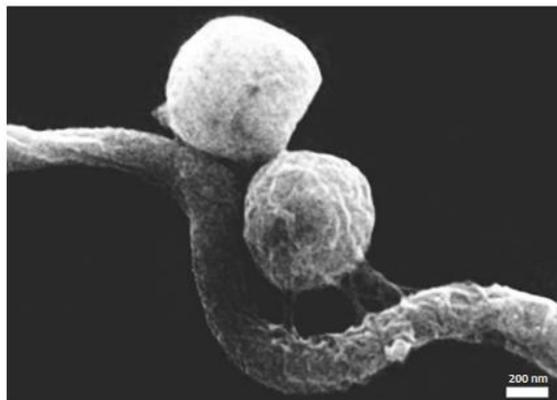


**Figure 7 : Structure et morphologie de *Borrelia burgdorferi*.**

<sup>58</sup>(Adapté d'après Rosa *et al.* (2005)). (A) En microscopie électronique à balayage. (B) Représentation globale du spirochète. (C) Représentation détaillée de l'insertion des flagelles dans la membrane cytoplasmique.

Sous certaines conditions, les bactéries du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato pourraient prendre une autre forme que la forme spiralee. Cependant, ces différentes formes alternatives sont encore mal comprises. Bien que controversé, la bactérie pourrait *a priori* former des corps ronds souvent nommés « kystes », être en forme de L, ou encore former des agrégats de types biofilms<sup>61</sup>.

En ce qui concerne les corps ronds, on trouve de nombreuses descriptions dans la littérature sous divers termes : coccoïdes, globulaires, sphériques, granulaires, kystiques ou vésiculaires. Cette forme dite « kystique » en raison de sa morphologie ne correspond pas à un kyste au sens strict du terme en microbiologie (qui correspond au développement d'une enveloppe épaisse résistant à la sécheresse comme chez *Azotobacter*<sup>62</sup>). Chez *Borrelia*, il s'agit d'un corps central entouré d'une enveloppe indétectable du système immunitaire. Elle évoluerait sous cette forme afin d'échapper à des conditions environnementales défavorables (changement de milieu, de pH, de température, de la composition en gaz, en eau, présence d'un stress oxydatif). La bactérie sous forme de corps rond serait capable de revenir *in vitro* sous forme de spirochètes mobiles et réguliers, lors de la remise en condition de culture favorable<sup>63</sup>. Ce système de dormance pouvant durer des mois voire des années est très controversé<sup>64</sup>, pour certains il s'agit d'artéfacts obtenus en culture *in vitro* qui n'existeraient pas *in vivo* (figure 8).



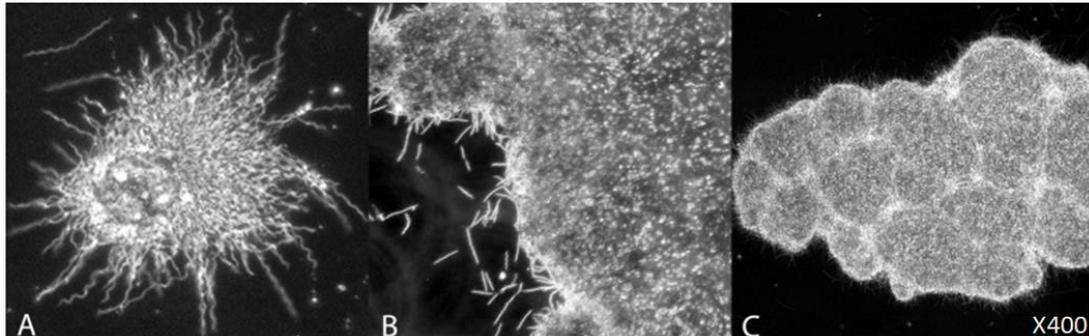
**Figure 8 : Corps sphériques de *Borrelia burgdorferi* induits par la pénicilline.**

<sup>65</sup>(Adapté d'après Mursic *et al.* (1996)). Image en microscopie électronique à balayage. La formation de ces formes « kystiques » se fait après 48h d'incubation avec l'antibiotique en milieu MKP à 33°C.

La bactérie peut aussi adopter une forme de L, lorsqu'elle présente une déficience phénotypique de la paroi cellulaire rigide. Cette forme est généralement décrite dans le contexte d'une exposition aux antibiotiques ou d'une altération génétique de la bactérie suite à un environnement nocif<sup>65</sup>.

*Bbsl* peut également former des biofilms. Les biofilms correspondent à une ou des communautés de micro-organismes spatialement organisés qui adhèrent entre eux et/ou à une surface. Les cellules s'entourent ainsi d'un gel de polymères complexes autoproduits appelé la matrice (substance polymère extracellulaire = EPS). Le biofilm se forme sur une surface biotique ou abiotique en 24 à 72 heures<sup>66,67</sup>.

Pour *B. burgdorferi*, le biofilm a déjà été décrit dans l'intestin moyen de nymphes infectées<sup>67</sup>. Les agrégats sont majoritairement composés d'alginate avec du calcium et de l'ADN extracellulaire, qui joue un rôle central dans le déclenchement de la compétence naturelle des bactéries du biofilm<sup>67</sup> (figure 9). Le biofilm et sa persistance contribueraient à une résistance aux antibiotiques et donc favoriseraient l'infection bactérienne chronique<sup>68</sup>. Cependant, lorsque les bactéries sont sous la forme « planctonique », la maladie est plus sévère.



**Figure 9 : Formation *in vitro* d'un biofilm de *Borrelia burgdorferi*.**

<sup>67</sup>(Adapté d'après Sapi *et al.* (2012)). Images en microscopie à force atomique avec un champ sombre (grossissement x400). Les images représentent la formation d'agrégats par la souche *B. burgdorferi* B31 dans des tubes en polystyrène sans ajout de matrice supplémentaire, à différents temps de culture (A) 0 à 2 jours (B) 3 à 6 jours (C) 7 à 21 jours.

### 3.3 Caractéristiques métaboliques et culturelles

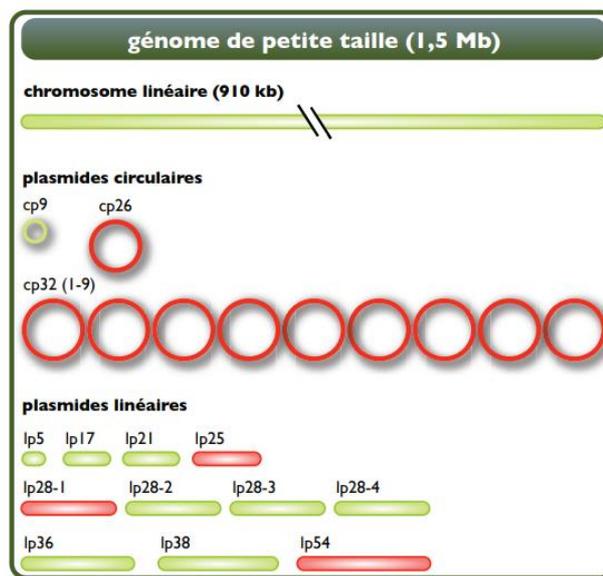
Les *Borrelia* sont des bactéries microaérophiles, avec une température de croissance optimale comprise entre 33 et 35°C. Ceux-ci sont des spirochètes auxotrophes<sup>69</sup>, c'est-à-dire qui sont incapable de synthétiser certains composés organiques essentiels à leur croissance. Ses besoins nutritifs sont donc complexes<sup>70</sup>. La culture de *Borrelia*, se fait depuis les années 90 dans un milieu semi-synthétique : le milieu Barbour Stoenner Kelly modifié (BSK-II). Ce milieu contient de nombreux acides aminés, de l'albumine de sérum bovin et est supplémenté par 6% de sérum de lapin afin d'apporter les acides gras nécessaires à la composition des membranes<sup>71,72</sup>.

Il est également possible d'ajouter des antibiotiques afin de rendre le milieu sélectif, ce qui s'avère utile lorsque l'on recherche la bactérie dans les liquides biologiques ou dans des organes cibles. La culture doit être contrôlée régulièrement en faisant attention aux contaminations qui sont relativement faciles dans un milieu riche d'autant plus lorsqu'il y a très peu de spirochètes<sup>73</sup>. Dans ces bonnes conditions, leur temps de génération est de 8 à 12 heures<sup>74</sup>.

### 3.4 Génomique bactérienne

Le génome de ces bactéries est également complexe. Les *Borreliella* possèdent un chromosome linéaire ainsi que plusieurs plasmides circulaires et linéaires<sup>75</sup> (figure 10). C'est la souche *B. burgdorferi* s.s. B31 qui fut la première séquencée par Fraser *et al.* en 1997. Ce génome est constitué de 21 plasmides comprenant 12 plasmides linéaires et 9 circulaires.

À ce jour, 16 souches de *Borreliella burgdorferi* sensu lato ont été séquencées d'après la base de données NCBI.



**Figure 10 : Structure génomique de *Borreliella burgdorferi* sensu stricto.**

<sup>76</sup>(D'après Schramm *et al.* (2013)). Les structures représentées en rouge sont essentielles à la virulence de la bactérie en particulier lp25 et lp28-1.

Le chromosome linéaire, d'environ 900 kb, contient la majorité des gènes de ménage indispensable à la vie cellulaire. Il possède également des gènes organisationnels et structurels. Le chromosome linéaire est relativement constant en contenu et en structure entre les différentes espèces de *Borreliella*<sup>77</sup>.

L'ensemble des plasmides constitue à eux seul environ 40% du génome bactérien total<sup>78</sup>. Leur taille est comprise entre 5 et 56 kb. Les plasmides qu'ils soient linéaires ou circulaires codent majoritairement pour des protéines de virulence en particulier des lipoprotéines de surface externe exprimées de manière différentielle. Par exemple, le plasmide cp26 porte le gène *ospC* essentiel pour la dissémination de la bactérie chez la souris<sup>3</sup>.

La présence de ces gènes sur les plasmides justifie notamment qu'il puisse avoir une perte du pouvoir pathogène chez ces bactéries<sup>79</sup>. Les plasmides linéaires sont une exception chez les

procaryotes. Ils correspondent à des structures ADN double brin, avec des extrémités simples brins repliées en épingle à cheveux et fermées de manière covalente. Leur origine est potentiellement virale<sup>80,81</sup>. Les plasmides présentent une variabilité beaucoup plus grande de contenu génétique que le chromosome linéaire et ils ne sont pas représentés de manière égale dans toutes les souches.

### 3.5 La pathogénie

*Borrelia burgdorferi* sensu lato est classée dans le groupe 2 des agents biologiques, elle est ainsi capable de provoquer une maladie humaine, mais sans engendrer une contamination de la collectivité, il existe une prophylaxie et des traitements efficaces. Ainsi, ce n'est pas une maladie infectieuse à déclaration obligatoire en France<sup>82</sup>.

#### 3.5.1 Le point d'entrée des bactéries

La transmission du pathogène au vertébré survient après le repas de sang de la tique *Ixodes*. Avant la piqûre de l'hôte, les bactéries se situent au niveau du tube digestif de la tique. Elles expriment la protéine OspA (Outer surface protein A) à leur surface, qui permet l'adhérence du spirochète à la surface des cellules épithéliales intestinales<sup>83</sup> de la tique *Ixodes*, à travers son interaction avec la protéine de tique TROSPA (*tick receptor for OspA*). OspA permet également la persistance de la bactérie dans l'environnement physiologique hostile que constitue l'intestin et son contenu<sup>84</sup>.

Lors de l'afflux sanguin dans la tique, un changement d'expression protéique est réalisé, le mécanisme qui guide ce changement est complexe, mais la température et le pH semblent être un des principaux facteurs. Des études *in vitro* ont montré que l'augmentation de température à 37°C entraîne une régulation à la baisse de l'expression de la protéine OspA au profit de la protéine OspC (Outer surface protein C)<sup>85</sup>. De même, lors de l'ingestion du sang, le pH au sein de l'intestin de la tique baisse de 7,4 à 6,8 induisant une augmentation de la protéine OspC<sup>86,87</sup>.

La protéine OspA intervient au début l'afflux sanguin en se liant au plasminogène<sup>88</sup>, le convertissant ainsi en plasmine dont l'activité enzymatique permet à la bactérie de franchir la barrière intestinale de la tique<sup>89,90</sup>. Ces modifications contribuent au « décrochement » des spirochètes de l'intestin de la tique. Les bactéries deviennent mobiles et progressent *via* l'hémolymphe<sup>91</sup> afin d'atteindre les glandes salivaires de la tique et d'infecter l'hôte<sup>92</sup>.

Lors du passage des glandes salivaires à l'hôte vertébré, la lipoprotéine OspC est surexprimée. OspC<sup>93</sup> semble jouer un des rôles les plus importants dans la transmission bactérienne, sachant que la délétion du gène *ospC* dans des bactéries mutantes rendent les bactéries incapables d'infecter les souris<sup>94</sup>. La protéine OspC se lie à une protéine salivaire de tique, Salp15 (*salivary protein 15*), permettant de « camoufler » la bactérie du système immunitaire. La salive de la tique joue un rôle prépondérant dans le passage du pathogène à l'hôte. Les facteurs salivaires de tiques perturbent localement la réponse immunitaire et confèrent des propriétés anticoagulantes, anti-inflammatoires et vaso-actives<sup>95</sup>.

Le premier tissu de l'organisme que *Borrelia* rencontre est le derme, une des trois parties protectrices de la peau. Le derme est irrigué par de nombreux vaisseaux sanguins, il abrite les glandes sébacées, les glandes sudoripares ainsi que les follicules pileux. Le derme est composé de nombreuses cellules comme les fibroblastes et protéines notamment de la matrice extracellulaire (ECM), de composants polysaccharidiques, d'élastine et de collagène<sup>95</sup>. Une fois dans le derme, les bactéries se disséminent dans l'organisme afin d'atteindre un organe cible<sup>96</sup>.

### 3.5.2 La dissémination du pathogène

La dissémination du pathogène se fait principalement par la voie hématogène<sup>6</sup>. Cette voie de propagation est parfois controversée, car la bactérie est éliminée très rapidement de la circulation sanguine<sup>97</sup>. Lors de la dissémination hématogène, les bactéries se déplacent à travers l'endothélium et la matrice extracellulaire du système vasculaire, traversant ainsi les barrières tissulaires. Les bactéries se localisent ensuite dans différents organes : comme la peau, le cœur, les articulations ou elles traversent la barrière hémato-encéphalique<sup>95</sup>. Il existe aussi d'autres voies potentielles, non hématogènes, pour la propagation du pathogène *via* le système lymphatique, la voie tissulaire (et notamment par les tissus mous conjonctifs<sup>97</sup>), ou encore le long des nerfs périphériques<sup>98</sup>. Le déplacement est *a priori* dépendant de l'espèce de *Borrelia*. Par exemple, *Borrelia garinii* présente une prévalence plus importante en ce qui concerne l'atteinte des nerfs périphériques<sup>99</sup>.

Lorsque les bactéries empruntent la voie hématogène, en se déplaçant dans les capillaires puis les veinules, elles vont rencontrer l'endothélium vasculaire. Les bactéries vont ainsi se lier aux cellules endothéliales et suivre le flux sanguin de l'organisme<sup>95</sup>. Les bactéries se lient ensuite à l'ECM du système vasculaire grâce à ces lipoprotéines qui vont interagir avec différentes molécules. La liaison avec la fibronectine<sup>100</sup> se fait par l'intermédiaire de la protéine BBK32, RevA, RevB, OspC et BB0347.

Les bactéries se lient aussi à la décorine, protéine de l'hôte, à l'aide des « decorin-binding protein » DbpA et DbpB par l'intermédiaire des chaînes de glycosaminoglycane (GAG). Il a également été suggéré que les spirochètes étaient capables de se lier directement au collagène intact par l'intermédiaire de ses protéines de surface<sup>101</sup>.

Après l'adhésion à l'endothélium, le pathogène traverse les monocouches de cellules endothéliales afin de coloniser les tissus cibles<sup>97</sup> par divers mécanismes moléculaires.

Par exemple, quand le spirochète cible les articulations, *Bb* s.l. exprime la protéine p66 qui adhère aux intégrines des jonctions serrées et qui forme des porines permettant ainsi au pathogène de se déplacer au sein des jonctions cellulaires. Cette protéine p66, s'associe également aux lipoprotéines OspA et OspB<sup>102</sup> qui interagissent avec le plasminogène induisant la conversion en plasmine et l'activation de métallo-protéinases matricielles dégradant ainsi les composants de l'ECM. La bactérie peut également envahir les tissus articulaires en ciblant l'aggrécane, un protéoglycane du cartilage<sup>95</sup>.

Dans le cas d'une atteinte neurologique, le pathogène pénètre la barrière hémato-encéphalique par le système para et trans-cellulaire. En effet, une hypothèse est que les *Borrelia* induisent l'expression d'activateurs du plasminogène et des métallo-protéinases, comme lors de la colonisation des articulations, entraînant un point de passage pour la bactérie<sup>103</sup>.

### 3.5.3 Une bactérie capable d'échapper au système immunitaire

En réponse à un organisme pathogène, l'organisme va développer deux types de réponses immunitaires : la réponse immunitaire innée qui permet une défense immédiate contre l'agent infectieux et la réponse immunitaire adaptative qui confère une protection plus tardive, mais durable. Le système immunitaire inné est constitué de barrières physiques, de mécanismes de reconnaissance du pathogène, de recrutement des cellules immunitaires et d'activation de l'immunité adaptative. La réponse immunitaire adaptative correspond au recrutement des lymphocytes T (médiation cellulaire) et des lymphocytes B (médiation humorale). Mais, pour échapper à ce système immunitaire, la bactérie a développé de nombreux mécanismes spécifiques<sup>104</sup>.

### ***Échappement du système immunitaire inné***

Le système du complément joue un rôle essentiel dans les processus inflammatoires en agissant en première ligne contre les agents pathogènes. Il est formé par un réseau coopératif avec plus de 30 précurseurs. Les trois fonctions principales du système du complément consistent à déclencher l'inflammation, opsoniser les agents pathogènes et former le « complexe d'attaque membranaire » (MAC)<sup>105</sup>. Trois voies distinctes peuvent initier la signalisation : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Indépendamment du déclencheur initial, toutes les voies conduisent à la formation d'une protéase : la convertase C3, qui convertit le composant du complément C3 en des composants actifs : C3a (un médiateur inflammatoire) et C3b (une opsonine et une protéine de stimulation immunitaire).

Le composant C3b peut également former avec d'autres composants la C5 convertase, une autre protéase clivant le composant du complément C5 conduisant à la formation du MAC.

*Borrelia burgdorferi* a développé de nombreux mécanismes complexes pour échapper au système du complément. *Bbsl* interfère avec le système du complément grâce à des protéines de surfaces externes comme OspA, OspC, BBA70<sup>106</sup> et BBK32<sup>107</sup> qui inhibent principalement l'activation de la voie classique et des lectines. Des protéines bactériennes (Erp et CRASP)<sup>108</sup> se lient également à des régulateurs du complément afin d'interférer avec les voies d'activation<sup>104</sup>.

Les protéines salivaires de tiques sont également connues pour interférer avec l'activation de la voie alterne du complément<sup>109</sup>. Il existe une grande variété de protéines salivaires de tiques qui inhibent la formation du complexe entre le facteur B et le C3b, inhibant ainsi la C3 convertase alterne<sup>110</sup>. On retrouve les protéines Salp20 (*salivary protein 20*)<sup>110</sup>, ISAC (*Ixodes scapularis* Anti-complement protein) et IRAC (*Ixodes ricinus* anti complement protein)<sup>84</sup>. En effet, les tiques fournissent les premières défenses de *B. burgdorferi* contre le système immunitaire de l'hôte.

En plus de jouer un rôle sur l'activation du complément, les protéines salivaires de tiques inhibent la production de cytokines, des protéines au rôle essentiel dans la communication cellulaire et des chimiokines (soit des cytokines chimiotactiques), qui contrôlent les motifs de migrations et de positionnement des cellules immunitaires et donc le recrutement des granulocytes au niveau du site de la piqûre<sup>109</sup>.

Les mastocytes semblent être aussi des cibles directes d'une protéine salivaire, la sialostatine L, qui inhibe la production d'interleukine 9 (IL-9) connue comme un régulateur important des réponses immunitaires induites<sup>111</sup>.

La protéine salivaire la plus étudiée se nomme Salp15<sup>112</sup>, elle possède de nombreux homologues. Trois protéines homologues de Salp15 ont été identifiées chez *Ixodes ricinus* : Salp15 Iric-1, Salp15 Iric-2 et Salp15 Iric-3<sup>113</sup>. En plus de sa liaison avec la protéine OspC, qui protège la bactérie de l'action du complément et de la lyse médiée<sup>114</sup>, Salp15 possède de nombreux mécanismes qui permettent à la bactérie de s'échapper du système immunitaire :

- une action protectrice contre les anticorps anti-*Borrelia* présents dans le sang de l'hôte vertébré ;

- l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T en se liant au récepteur CD4 à la surface des cellules T CD4 + (auxiliaires) ;

- l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et des interleukines IL-6 et IL-12) ;

- l'inhibition de l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques<sup>115</sup> en se liant aux récepteurs DC-SIGN.

*B. burgdorferi* sensu lato résiste également aux différentes protéines et peptides antimicrobiens, comme à la lactoferrine<sup>104</sup> ou encore à la cathélicidine<sup>116</sup>, sécrétés par l'organisme.

De plus, il s'agit d'une bactérie relativement rapide qui se déplace en moyenne à 4  $\mu\text{m/s}$  dans les tissus<sup>112</sup> évitant ainsi l'ingestion par les phagocytes, qui sont des cellules plutôt lentes. En effet, leur vitesse en milieu liquide a été estimée à 255  $\mu\text{m/min}$  et en milieu visqueux (de type gels) leur vitesse peut atteindre 2000  $\mu\text{m/min}$  alors que les neutrophiles se déplacent seulement à 20  $\mu\text{m/min}$ <sup>117</sup>.

La bactérie possède aussi des mécanismes pour se cacher assez profondément dans les tissus<sup>118</sup>, *B. burgdorferi* peut induire à des cellules hôtes telles que les macrophages la sécrétion des métallo protéases matricielles permettant potentiellement la dégradation de la matrice extracellulaire<sup>119</sup>. Toutes ces stratégies permettent à la bactérie de persister dans l'organisme.

### ***Échappement au système immunitaire adaptatif***

La réponse immunitaire adaptative est également détériorée. L'IgM est le premier isotype d'anticorps sécrété lors d'une réponse immunitaire. Il est important dans le contrôle de la bactériémie et dans l'activation de la voie classique du complément. La commutation de classe des immunoglobulines en IgG se produit généralement peu de temps après une infection, et les sous-types d'IgG fonctionnent ensemble pour éliminer la plupart des agents pathogènes<sup>120</sup>.

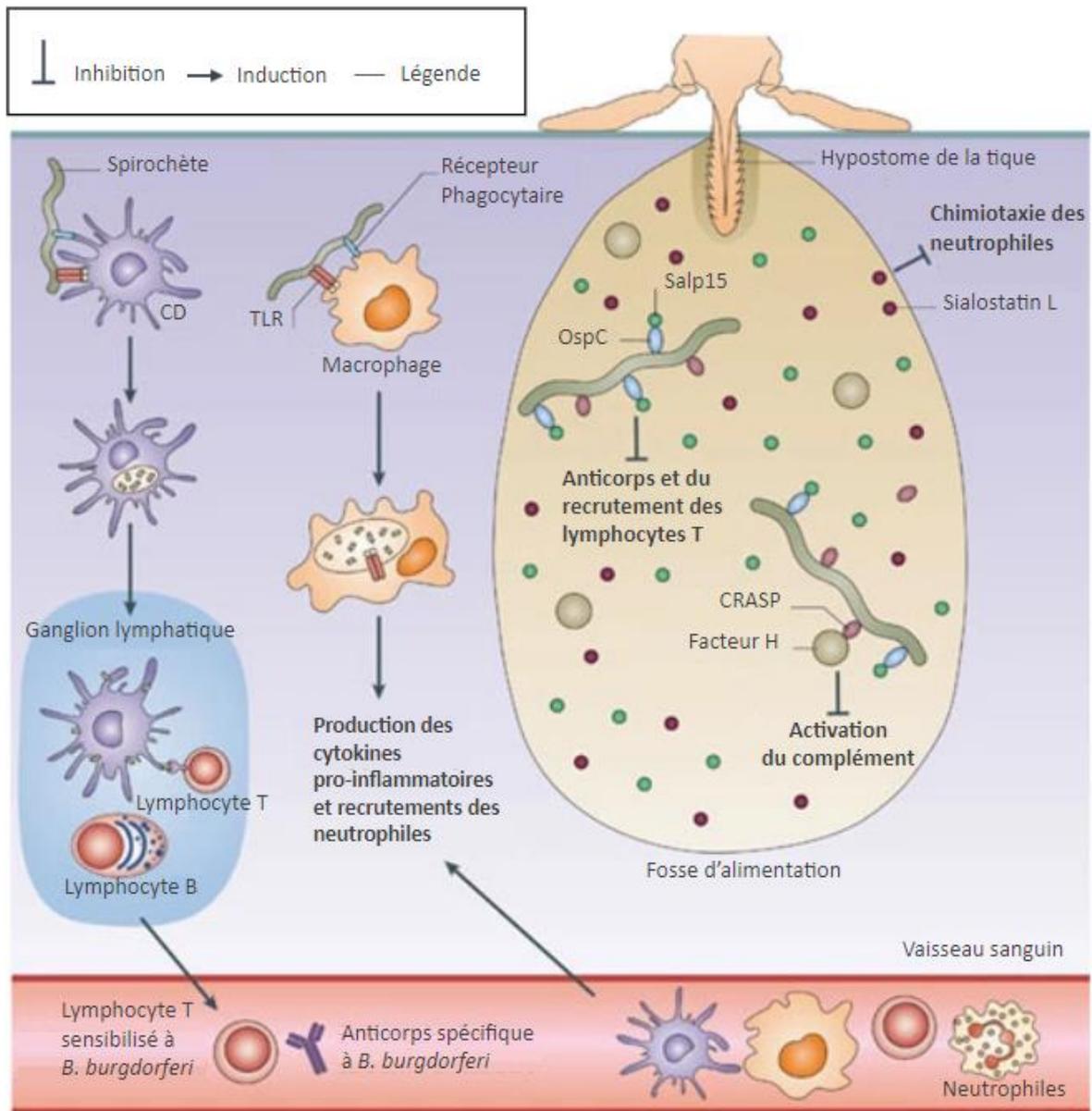
L'infection par *B. burgdorferi* induit une réponse en anticorps qui se caractérise par la production continue d'IgM et d'IgG<sup>121</sup>. Compte tenu du rôle important des lymphocytes T dans la régulation de la commutation, cela montre que *Borrelia burgdorferi* induit une déficience dans l'activation et/ou la fonctionnalité des cellules T auxiliaires<sup>122</sup>. La commutation des classes est un processus qui se produit généralement dans les centres germinatifs qui se situent dans les tissus lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques. Les réponses du centre germinatif conduisent au développement de deux populations cellulaires distinctes : les cellules B mémoires et les plasmocytes. Or l'invasion de ces tissus par la bactérie entraîne une hypertrophie des ganglions lymphatiques<sup>121,123</sup>, conduisant à une altération de la qualité et de la maturation des anticorps ayant une forte affinité pour l'antigène<sup>124</sup>. *B. burgdorferi* interfère alors avec l'induction et le maintien des réponses immunitaires adaptatives en modifiant ou en détournant les voies de signalisation immunitaire innées<sup>121</sup>. Cependant, les mécanismes ne sont pas connus en détail et des études sont encore à faire pour déterminer précisément les différents modes d'actions de la bactérie.

La bactérie est aussi capable de se « camoufler » et d'éviter les cellules immunitaires par des processus de variation antigénique. Il s'agit d'un processus par lequel un agent pathogène modifie la séquence d'une protéine exprimée afin d'éviter les effets des anticorps dirigés contre elle<sup>125</sup>. Le génome *B. burgdorferi* contient le locus de l'antigène de surface VlsE (variable major protein (VMP)-like sequence E lipoprotein)<sup>126</sup>, lequel peut subir une variation antigénique importante et rapide chez les hôtes<sup>127</sup>, ce qui en fait une protéine essentielle à l'interaction hôte pathogène.

La salive d'*Ixodes* agit aussi sur l'immunité adaptative de l'hôte, en effet certains des composants salivaires agissent sur la réponse humorale en inhibant la prolifération des lymphocytes<sup>116</sup>.

Les *Borrelia* ont également développé des stratégies pour affecter l'efficacité des réponses humorales<sup>112</sup> et de contrôle des cellules dendritiques<sup>128</sup>.

Tous ces mécanismes d'action permettent la mise en place d'une infection durable (figure 11).

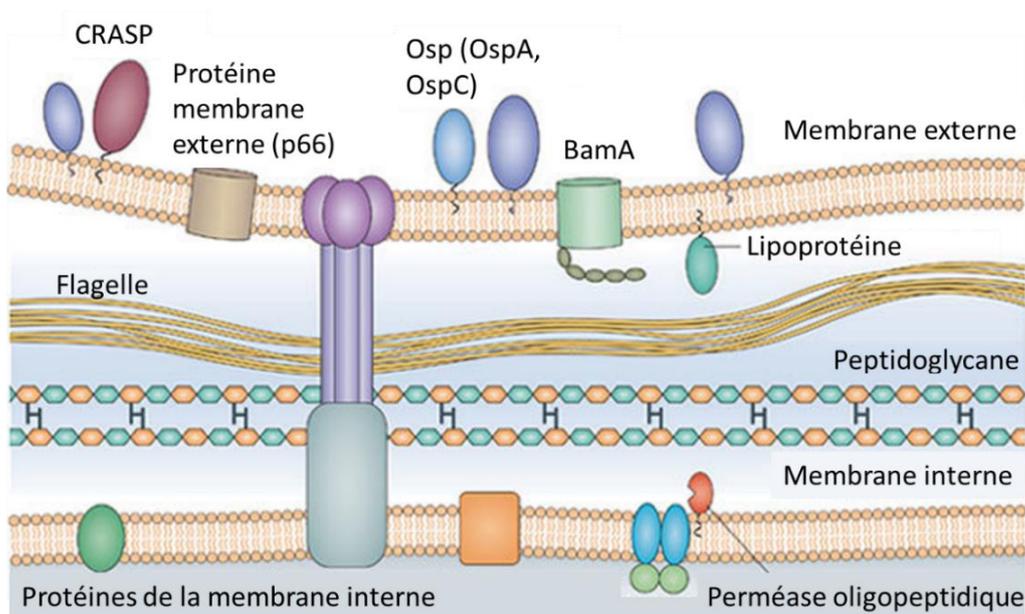


**Figure 11 : Interface entre la tique et l'hôte.**

<sup>3</sup>(Adapté d'après Radolf *et al.* (2012)). La tique crée une fosse d'alimentation avec ses pièces buccales, en utilisant son hypostome. La tique produit de grandes quantités de salive contenant une pléthora d'agents bioactifs que *Borrelia burgdorferi* s.l. exploite pour aider à établir l'infection. Le schéma représente quelques-uns de ces mécanismes d'actions mis en place lors de l'infection, y compris ceux avec les protéines salivaires Salp15 et la sialostatine L. Des lipoprotéines de surface des *Borrelia* se lient également à des facteurs du complément empêchant l'activation de celui-ci. Les bactéries sont reconnues par les cellules effectrices du système immunitaire inné telles que les cellules dendritiques (CD), les neutrophiles et les macrophages. L'activation de ces cellules augmente l'internalisation et la dégradation des spirochètes. Les CD qui ont absorbé les spirochètes migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes bactériens aux cellules T et B. Les lymphocytes T sensibilisés pénètrent dans la circulation et sont recrutés sur le site de l'infection, ils sécrètent des anticorps spécifiques. La production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages entraîne le recrutement de neutrophiles, de cellules T, de macrophages et de CD supplémentaires sur le site de la piqûre.

### 3.5.4 Les antigènes bactériens : les protéines de surface

La bactérie va exprimer des protéines différentes au cours de sa vie, dont certaines avec un pouvoir antigénique très important<sup>129,130</sup>. *B. burgdorferi* sensu lato exprime de manière différentielle les protéines selon si la bactérie se trouve dans l'intestin de la tique, au niveau des glandes salivaires ou dans l'hôte. Puisque l'interface entre *B. burgdorferi* et son hôte est sa surface externe, les protéines localisées à la membrane externe jouent un rôle important dans la dissémination, la virulence, le tropisme tissulaire et l'évasion du système immunitaire (figure 12).



**Figure 12 : L'enveloppe de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.**

<sup>3</sup>(Adapté et modifié d'après Radolf *et al.* (2012)). Le schéma représente l'enveloppe de *Borrelia*, elle montre la membrane externe, les filaments flagellaires, le peptidoglycane et la membrane interne. La membrane externe contient des lipoprotéines de surface externe (Osp) comme OspA, OspC en haute densité et des protéines en forme de « barillet » comme BamA en basse densité. Les protéines CRASP sont des protéines régulatrices du système du complément. La membrane interne est riche en protéines membranaires dont beaucoup sont des transporteurs. La perméase oligopeptidique a 5 variants, elles permettent le transport des peptides dans les bactéries.

#### ***Outer surface protein (Osp) A et B***

Les lipoprotéines de surface OspA et OspB (outer surface protein A et B) constituent les protéines majeures de la surface bactérienne situées au niveau de l'enveloppe externe. Ces deux protéines sont étroitement liées, car elles sont co-transcrites, c'est-à-dire que les deux gènes ont leur promoteur en commun. Ces gènes sont codés sur le plasmide linéaire lp54<sup>131,132</sup>.

Ces protéines présentent un haut degré d'identité de séquence (50% d'identité de séquence)<sup>133</sup> et une similitude structurale assez importante<sup>134</sup>. Les régions C-terminales d'OspA et OspB sont caractérisées par une fente chargée positivement avec une cavité adjacente tapissée de résidus hydrophobes<sup>135,136</sup>. OspA est une protéine spécifique aux bactéries du complexe *B. burgdorferi* s.l., son poids moléculaire est compris entre 31 et 33 kDa selon l'espèce. OspB est quant à elle d'environ 34 kDa, *a priori* elle n'est pas présente chez *B. garinii*.

Le rôle d'OspA et d'OspB dans le cycle de vie infectieux de *B. burgdorferi* n'a été élucidé que récemment. Ces protéines de surfaces sont exprimées *in vitro* lors de la culture de la bactérie et *in vivo* dans l'intestin moyen des tiques et chez l'hôte lors de phases plus tardives de la maladie<sup>137</sup>.

OspA et OspB jouent un rôle dans la colonisation et la persistance dans l'intestin de la tique en agissant sur la médiation et l'attachement<sup>134</sup>. Leurs expressions sont ensuite régulées à la baisse lors du repas sanguin de la tique comme expliqué dans le paragraphe I.3.5.1. OspA n'est d'ailleurs pas détectée dans un modèle murin dans des phases très précoces de l'infection (jusqu'à 17 jours)<sup>138</sup>. D'après une étude d'Hodzic *et al.*<sup>139</sup>, le gène *ospA* est transcrit en ARN dans la peau au point d'inoculation de souris 1 jour après fixation de la tique, mais pas par la suite. Dans l'organisme, lors d'un stade d'infection plus tardif, OspA et OspB protégeraient les spirochètes des composants nocifs du sang de l'hôte, OspA établirait par ailleurs une liaison avec le plasminogène<sup>88</sup> ce qui engendrerait une régulation négative du système du complément<sup>140</sup>.

### ***Outer surface protein (Osp) C***

La lipoprotéine OspC est codée sur le plasmide circulaire cp26. L'expression d'OspC est régulée par la voie Rrp2-RpoN-RpoS, une voie cascade avec différents facteurs sigma<sup>141</sup>. Son poids moléculaire est d'environ 20 à 22 kDa<sup>134</sup>. La protéine sous sa forme active, existe aussi sous forme de dimères de 44 kDa, présents à la surface de la membrane externe des *Borrelia*<sup>142</sup>.

Son expression au cours du cycle biologique a été décrit dans le paragraphe précédent (I.3.5.2). Dans la tique cette protéine n'est peu voire pas exprimée au sein de l'intestin puis sa production est induite lors du repas sanguin. OspC se lie ensuite à la protéine salivaire de tique : Salp15<sup>143</sup>, cette liaison joue un rôle dans la transmission et/ou la survie au début de la colonisation de l'hôte<sup>144</sup>.

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les fonctions potentielles de cette protéine, mais la fonction précise d'OspC au cours de l'infection précoce n'est à ce jour pas connue. Cependant, il est clair qu'OspC constitue l'un des principaux facteurs de virulence<sup>145</sup>. En effet, des études ont montré que des souches mutantes déficientes en OspC étaient incapables d'induire une infection chez la souris<sup>94,146</sup>. Cette déficience entraîne soit une perte d'infectiosité de la bactérie soit une mauvaise dissémination du pathogène chez la souris<sup>147</sup>. Il a également été montré que la protéine OspC est essentielle dans les stades très précoces de l'infection de la souris<sup>146</sup>. Ceci est cohérent avec le niveau de transcription du gène *ospC* qui est revu à la baisse deux semaines après le début de l'infection<sup>85,148</sup>.

Cette protéine, très immunogène, présente une grande variabilité antigénique, même au sein d'une même espèce en particulier chez *B. garinii*<sup>149,150</sup>. En comparant les séquences d'ADN d'*opsC* de différentes souches, une classification a pu être réalisée<sup>151,152</sup>. Au moins 25 groupes phylogénétiques<sup>153</sup> d'OspC ont pu être identifiés pour les trois espèces de *Borrelia* pathogènes, désignés par les lettres A à U<sup>151</sup>.

### ***Decorin binding protein (Dbp) A et B***

Deux autres protéines de surface jouent un rôle important dans la virulence et la colonisation de l'hôte. Il s'agit de DbpA et DbpB (decorin-binding protein) codées sur le plasmide linéaire lp54. Ces protéines de surfaces d'environ 20kDa<sup>154</sup> se lient à la décorine un protéoglycane qui interagit avec le collagène que l'on retrouve dans de nombreux tissus de l'hôte, notamment dans les tissus conjonctifs<sup>134</sup>. Ces deux protéines sont régulées positivement à la surface des organismes *B. burgdorferi* par un changement de température de 23° à 37°C et par une diminution du pH, ce qui suggère un rôle important de ces protéines dans l'environnement des mammifères<sup>86,155</sup>. DbpA et DbpB n'auraient pas de rôle direct dans la virulence, mais possiblement un rôle essentiel dans la liaison avec les différents tissus lors des stades plus tardifs de la maladie, notamment dans les tissus riches en décorine<sup>134</sup>.

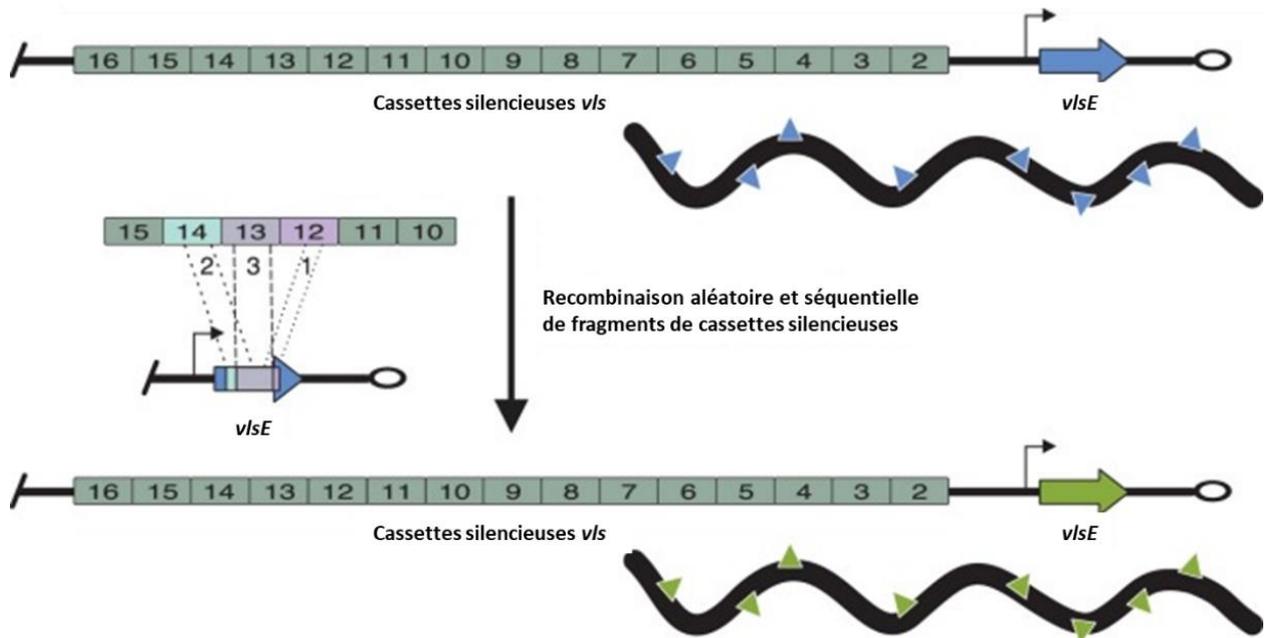
### ***Variable major protein (VMP)-like sequence E***

VlsE (Variable major protein (VMP)-like sequence E) est une protéine de 35 kDa. Elle est codée par un gène situé sur le plasmide linéaire lp28-1<sup>156</sup>. Cette protéine est très similaire à VMP (variable major protein), protéine très documentée, des *Borrelia* causant les fièvres récurrentes<sup>157</sup>. Pour persister dans l'organisme et pour échapper au système immunitaire la bactérie va mettre en place un mécanisme de variation antigénique de VlsE.

Le gène *vlse* est organisé sous forme de cassettes d'expressions dites « silencieuses » avec six régions variables et six régions hautement conservées. Il existe 15 cassettes silencieuses chez *B. burgdorferi* s.s. B31<sup>158</sup>. Il est important de noter que les régions variables de VlsE sont situées sur la partie distale de la membrane de la protéine, qui sont plus susceptibles d'entrer en contact avec les anticorps produits par l'hôte pendant l'infection <sup>127</sup>.

Au cours de l'infection, des recombinaisons génétiques interviennent et engendrent ainsi l'expression de différents variants de VlsE. La bactérie va alors produire de nouvelles protéines jusque-là inconnues au système immunitaire. Cependant, même si le processus de recombinaison de VlsE a été étudié<sup>10</sup>, il n'est pas encore connu précisément (figure 13). Chez la souris, les variations de VlsE sont observées dès le quatrième jour après l'infection<sup>159</sup>. Ces changements se poursuivent pendant toute la durée de l'infection, mais ils se produisent à une fréquence plus élevée à des moments plus tardifs de l'infection<sup>159</sup>. Fait intéressant, *B. burgdorferi* cultivé *in vitro* ou dans les tiques conserve la séquence parentale VlsE<sup>159</sup>. Une autre étude a montré que la variation de séquence chez les souris immunocompétentes se produit à un taux plus élevé que chez les souris immunodéprimées<sup>159</sup>. Ces données suggèrent que les recombinaisons génétiques dépendent de l'environnement et de la présence d'une réponse immunitaire intacte<sup>156,159</sup>.

La protéine VlsE est également un facteur de virulence important de *B. burgdorferi*, qui permet aux bactéries d'infecter et de persister chez la souris<sup>160</sup>. En plus de son importance dans l'infectiosité<sup>161</sup>, la protéine VlsE a également un rôle d'adhésine facilitant l'interaction du spirochète à l'endothélium<sup>162</sup>.



**Figure 13 : Variation antigénique de VlsE.**

<sup>163</sup>(Modifié et adapté d'après Stone et Brissette (2017)). Le locus d'expression (*vlsE*) (flèche bleue ou verte) est situé près du télomère (ovale) sur le plasmide linéaire lp28-1. Le promoteur est indiqué par une flèche noire. Les cassettes silencieuses *vls* sont situées en amont et dans l'orientation opposée de *vlsE*. La variation antigénique se produit par l'insertion aléatoire et séquentielle de fragments de cassettes silencieuses (nommées 1, 2, 3 ici).

Toutes ces protéines de surface, décrites ci-dessus, constituent des marqueurs potentiels pour le diagnostic direct de la maladie. Il existe de nombreuses autres protéines impliquées (comme BBK32, et d'autres protéines encore inconnues à ce jour) dans les rôles de virulence. Ces protéines sont exprimées de façon différentielle selon l'environnement de la bactérie (dans la tique, l'hôte ou en culture) et le stade de la maladie<sup>134</sup>.

### 3.5.5 Les modèles animaux

Pour étudier la physiopathologie d'une maladie infectieuse, comme ici la maladie de Lyme, il est nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux. Il n'existe pas de modèle animal parfait, chacun à ses limites. Cependant, ils s'avèrent utiles à condition de définir précisément l'objectif de l'étude. Dans le cas de la maladie de Lyme, aucun des modèles actuels n'est capable de reproduire parfaitement les symptômes observés chez l'homme<sup>164</sup>.

Un des modèles le mieux décrits est un modèle de primate non humain : le macaque rhésus. Suite à une piqûre par une tique infectée, le singe rhésus présente une grande variété de symptômes comme l'homme<sup>165</sup>. L'érythème migrant est observable chez le primate lors d'une infection à *Bb* s.l., il dure environ une semaine et est histologiquement proche de l'humain<sup>166</sup>. Le primate peut aussi développer une arthrite, principalement aux genoux et aux coudes<sup>166</sup>.

Des atteintes neurologiques périphériques peuvent être observées, comme une démyélinisation ou encore des fibroses des gaines nerveuses<sup>167</sup>, causées par la neuroborréliose de Lyme. Comme l'humain, le singe immunocompétent développe une réponse humorale lors d'une infection à *Borrelia*<sup>167</sup>. Ce modèle a été très utilisé pour déterminer l'efficacité de traitements antibiotiques<sup>168</sup>. Bien que ce modèle présente de nombreux avantages, son accès est très limité pour des questions d'éthiques et de coût.<sup>169</sup>

Un autre modèle utilisé est le chien<sup>55</sup> (le beagle)<sup>171</sup>. Les chiens développent des arthrites sévères avec la présence de fièvre (bien que parfois ils soient asymptomatiques). Ils ont notamment été utilisés pour le développement de vaccins<sup>164</sup>.

Les lagomorphes et plus particulièrement le lapin blanc de Nouvelle-Zélande ont également été utilisés en tant que modèle pour l'étude de la maladie de Lyme. Les lapins sont plutôt réceptifs à l'infection, ils développent des lésions cutanées avec la présence d'un érythème migrant qui dure environ 7 jours<sup>172</sup>. Cependant, il a été montré que douze semaines après l'infection par *B. burgdorferi* en intradermique, les biopsies de peaux devenaient négatives en culture<sup>172</sup>. En dehors de l'érythème migrant, le lapin ne développe aucun autre symptôme<sup>173</sup>. Les lapins ne constituent donc pas le modèle le plus intéressant dans le cadre des infections « chroniques ».

Les rongeurs sont les animaux les plus utilisés dans les laboratoires. Leur intérêt tient à leur facilité d'entretien (soin, nourriture, descendance nombreuse) et leur petite taille. Chez le rat, il a été montré que la bactérie est capable de se disséminer et provoquer des symptômes articulaires. Le rat a été notamment utilisé pour étudier l'expression différentielle des protéines<sup>174</sup>.

Des changements antigéniques similaires à ceux survenant lors d'une infection d'un mammifère<sup>174</sup> ont été obtenus en implantant dans la cavité péritonéale du rat des chambres à membranes de dialyse contenant *B. burgdorferi* sensu stricto<sup>174</sup>.

Ils existent d'autres modèles rongeurs comme le hamster<sup>175</sup>, le cobaye<sup>176</sup>, la gerbille<sup>177</sup> et la souris. Le modèle murin est le plus couramment utilisé pour les recherches sur la maladie de Lyme. C'est un hôte naturel de *Bbsl*, il s'agit même du réservoir principal<sup>178</sup>. Différentes lignées de souris sont utilisées en laboratoire, certaines sont plus sensibles que d'autres à la maladie. Parmi les souches les plus sensibles, la souche C3H/HeN a été décrite. Cette souche peut développer une arthrite sévère<sup>179</sup>, des néphrites, des cardites ou encore des hépatites<sup>164,180</sup>. Les souris C3H possèdent des charges bactériennes plus élevées dans les tissus par rapport à d'autres souches de souris, comme les souris BALB/c plutôt résistantes à la pathogénie<sup>179</sup>. Un

autre modèle très utilisé correspond aux souris immunodéprimées, dites SCID. Ces souris vont développer des symptômes graves avec une inflammation chronique et progressive des articulations, du cœur et du foie<sup>181</sup>. D'autres atteintes peuvent être également retrouvées dans les reins, les poumons, le cerveau et les muscles striés<sup>181</sup>. Un des avantages à l'utilisation de ces souris immunodéficientes est que l'on peut induire une spirochetémie persistante, car l'absence d'immunité permet une charge bactérienne élevée dans l'organisme par rapport à une infection chez les animaux immunocompétents<sup>139,182</sup>. L'âge auquel les souris sont infectées est également important dans l'établissement d'une infection<sup>183</sup>, les jeunes souris étant plus sensibles à l'infection que les adultes.

En plus de l'espèce animale utilisée pour étudier la maladie de Lyme, le mode d'inoculation de la bactérie va influencer le processus d'infection. *Borrelia burgdorferi* s.l. peut-être injecté via une aiguille (par voie intradermique, sous-cutanée, intraveineuse, intrapéritonéale) ou *via* une tique infectée. L'injection à la seringue va présenter un des biais les plus importants dans l'étude de la maladie de Lyme avec les modèles animaux, car on ne prend pas en compte le rôle de la salive de tique dans la transmission du pathogène. D'autant plus que la salive de tique s'avère essentielle dans la pathogénie (cf. partie I.3.5). Le mode d'interaction hôte - pathogène est donc essentiel pour caractériser correctement le modèle<sup>164</sup>.

#### **4. L'épidémiologie de la Borréliose de Lyme**

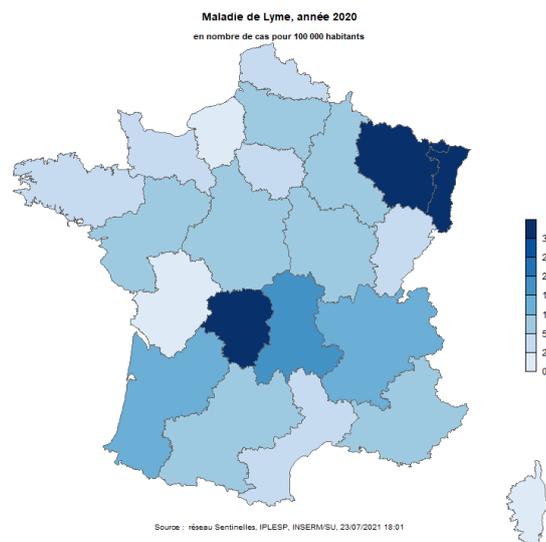
La Borréliose de Lyme est la maladie vectorielle la plus répandue dans l'hémisphère Nord<sup>11</sup>. On retrouve ainsi la maladie principalement en Europe, en Amérique du Nord et dans les zones tempérées d'Asie. Les nouvelles infections dépendent de la variation saisonnière avec un pic d'infection de mai à octobre. La transmission des agents pathogènes responsables de la maladie de Lyme se fait exclusivement par une piqûre de tique. D'après le haut conseil de la santé publique, il n'existe aucun cas rapporté de transmission à l'homme par transfusion sanguine, par greffe, par la voie materno-fœtale ou encore par la voie sexuelle<sup>184</sup>.

Aux États-Unis, l'incidence de la maladie est relativement bien renseignée au sein du CDC (Center for disease control and prevention), car c'est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1991. En 2019, 34 945 nouveaux cas ont été déclarés, cependant des estimations suggèrent qu'environ 300 000 personnes<sup>185</sup> contracteraient la maladie de Lyme chaque année<sup>186</sup>.

En Europe, l'European Concerted Action against Lyme Borreliosis (EUCALB) financé par l'Union Européenne récolte les données épidémiologiques. Cependant, elles ne sont pas normalisées, ce qui rend la comparaison entre les différents pays compliquée<sup>187</sup>. Ainsi, on sous-estimerait de 2 à 3 fois le nombre de personnes touchées.

*A priori*, en Europe plus de 360 000 personnes auraient contractées la maladie au cours des deux dernières décennies. Certains pays européens présentent une incidence plus élevée comme l'Allemagne, la Slovénie, l'Autriche, l'Estonie, la Finlande ou encore la Suède<sup>188</sup>.

En France, un système de surveillance nationale de la maladie a été mis en place. Mais, il est difficile d'estimer le nombre réel de cas, la Borréliose de Lyme n'étant pas une maladie à déclaration obligatoire. La prévalence serait d'environ 300 000<sup>189</sup> avec en 2018 et 2019 une incidence de 68 530 et 50 133 cas respectivement. Il existe au sein de notre territoire une grande disparité d'incidence, dans l'Est et le centre (Alsace, Lorraine, Limousin par exemple) le taux d'incidence estimé est relativement élevé avec plus de 100 cas pour 100 000 habitants contre moins de 50 cas pour 100 000 dans le Sud et à l'Ouest (figure 14).



**Figure 14 : Taux d'incidence de la maladie de Lyme en France métropolitaine en 2020.**

<sup>190</sup>(D'après le réseau sentinelles, carte consultée le 27/07/2021). Les cartes d'activités sont réalisées chaque année par le réseau sentinelles, il s'agit d'un réseau de recherche et de veille en soins de premier secours en France métropolitaine. Le suivi de la maladie de Lyme a commencé en 2009.

L'incidence de la maladie de Lyme, à l'échelle mondiale, ne cesse d'augmenter depuis quelques années notamment à cause du réchauffement climatique<sup>191</sup> et de l'interdiction du dichloro-diphényl-trichloroéthane comme insecticide et acaricide, dans les années 70 en France et aux États-Unis.

## 5. Le coût économique

Il est très difficile d'estimer précisément les coûts engendrés par la maladie de Lyme, sachant qu'il faut prendre en compte les différents frais médicaux ainsi que les frais indirects. Il y a donc très peu d'études à ce sujet<sup>192</sup>. Concernant le coût indirect de la maladie, notamment au niveau sociétal, il existe quatre études en Europe (Écosse, Suède, Allemagne et Pays-Bas) et deux études aux États-Unis<sup>193</sup>.

Les études en Europe estiment une charge économique annuelle et nationale allant de 650 000 d'euros (Écosse et Suède) jusqu'à 37 millions d'euros pour l'Allemagne (21 millions d'euros pour les Pays-Bas)<sup>192</sup>.

Aux États-Unis, les études ont été réalisées de manières irrégulières entre 1998 et 2015. Les coûts par patient sont estimés à 3 900 euros pour les coûts directs (ceux relatifs aux processus de soins eux-mêmes) et à 6 884 euros pour les coûts indirects (ceux en conséquence de la maladie ou de l'action de santé comme par exemple un arrêt de travail)<sup>194</sup>. Les frais médicaux, associés à la maladie de Lyme, sont estimés entre 682 millions et 1,15 milliards d'euros par an<sup>195</sup>.

En France, des associations essaient d'estimer les coûts directs. Pour l'association Lyme sans frontières, un malade correctement diagnostiqué et soigné coûte en moyenne 35 fois moins cher qu'un malade en errance médicale. Le coût annuel d'un citoyen en errance est de 7 400 euros avec la majeure partie prise en charge par la sécurité sociale (92 à 97%). En 5 ans, le coût d'un patient en errance (actes d'imageries, actes techniques, généralistes, spécialistes, hospitalisation) est de 37 000 euros. D'après cette étude, la dépense par an en France est de 215 millions d'euros notamment dus au problème de diagnostics et de soins.

La maladie de Lyme est reconnue comme une maladie professionnelle en France. Les personnes concernées sont celles exposées aux vecteurs sur les zones présentant un couvert végétal comme de la forêt, du bois, du bocage, steppe ou Landes. Il peut s'agir d'une personne réalisant une expertise agricole et foncière, d'une personne travaillant sur la pose et l'entretien des lignes électriques, etc. La sécurité sociale agricole (MSA) possède un système de prise en charge des maladies professionnelles, dont la maladie de Lyme depuis 1999. Ainsi, la reconnaissance en tant que maladie professionnelle donne droit à une indemnisation par l'assurance maladie ainsi qu'une prise en charge à 100% des frais médicaux<sup>196</sup>.

## 6. Les manifestations cliniques

*Borrelia burgdorferi* sensu lato est un organisme complexe capable d'envahir différents types de tissus<sup>197</sup>, ce qui entraîne une grande variété de symptômes. La Borréliose de Lyme présente généralement trois phases bien qu'il existe parfois des formes atypiques<sup>198</sup>.

### 6.1 La phase précoce localisée

La phase primaire survient quelques jours après transmission du pathogène par une tique infectée. Cette phase se caractérise principalement par l'apparition d'une lésion cutanée appelée érythème migrant, présent dans 70%<sup>5</sup> des cas. Cette atteinte se décrit par l'apparition d'une lésion rouge avec ou sans décoloration centrale qui s'étend de manière centrifuge pouvant atteindre jusqu'à 30 cm de diamètre (figure 15), souvent cette manifestation est circulaire. Elle est due à une réaction inflammatoire<sup>199</sup>. Même sans traitement, l'érythème migrant disparaît seul au bout de 3 à 30 jours<sup>200,201</sup>. Le patient peut également présenter un état grippal avec de la fièvre modérée, des myalgies, des céphalées ou alors une fatigue très importante. Lorsque l'érythème n'est pas présent, il est beaucoup plus difficile pour le médecin de poser le diagnostic de la maladie de Lyme<sup>202,204 205</sup>.



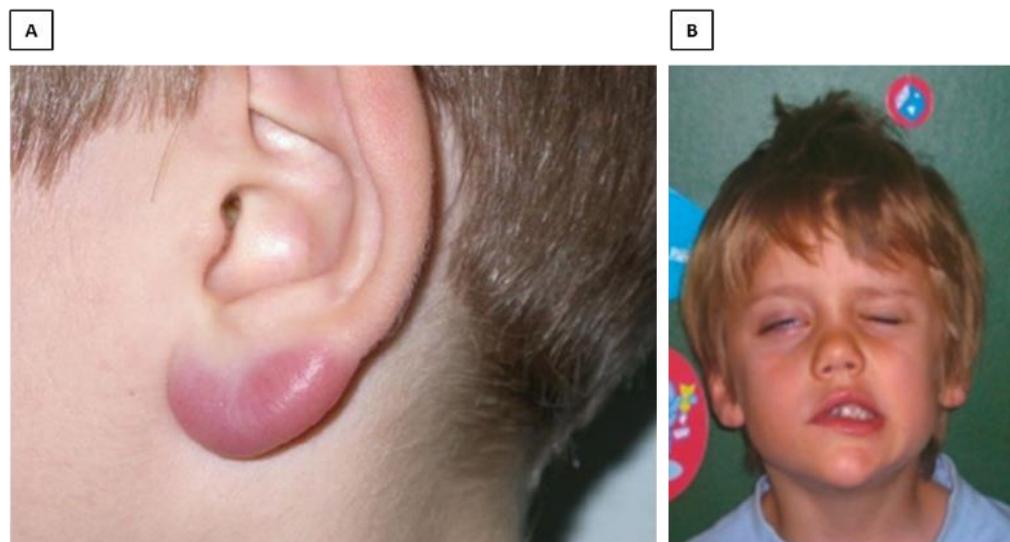
**Figure 15 : Manifestation clinique précoce de la maladie de Lyme.**

<sup>206</sup>(D'après Barton-Forbes *et al.* (2015)). Photographie d'un érythème migrant. Dans ce cas, il s'agit de la manifestation typique de la maladie de Lyme au stade précoce.

## 6.2 La phase disséminée

Après le premier stade s'ensuit la phase disséminée<sup>200</sup>. Le pathogène, après le passage par la peau, va se disséminer pour se localiser vers des organes plus distants et profonds selon son tropisme. Quatre grandes manifestations cliniques caractérisent cette phase : les lésions cutanées, rhumatologiques, cardiaques et neurologiques. Il peut également y avoir d'autres atteintes au niveau hépatique, musculaire ou rénale, mais cela est plus rare<sup>207</sup>.

Une lésion disséminée au niveau cutané correspond à la présence d'un érythème migrant multiple, présent dans 50 % des cas aux États-Unis alors qu'il est plus rare en France. Il s'agit de lésions multiples qui ne sont pas forcément localisées autour de la piqûre de tique<sup>208</sup>.



**Figure 16 : Manifestations cliniques de la maladie de Lyme au stade disséminé.**  
<sup>209,210</sup>(Modifié et adapté d'après Palmen *et al.* (2010) et Nau *et al.* (2009)). (A) Photographie d'un lymphocytome du lobe d'oreille. (B) Photographie d'une paralysie faciale périphérique chez un enfant.

Une autre manifestation, uniquement observée en Europe est le lymphocytome borrélien (seulement 0,3 à 3% des cas)<sup>4</sup> (figure 16A). Le patient présentera alors un nodule violacé autour du lobe d'oreille, du nez ou alors de l'aréole. Il s'agit d'une prolifération bénigne de cellules lymphoïdes de type B dans le derme ou dans le tissu sous-cutané.

Concernant les atteintes rhumatologiques, il s'agit de la manifestation qui a permis de décrire dans un premier temps la maladie. Le patient peut présenter des atteintes articulaires en moyenne 24 jours après la contamination<sup>95</sup>. Le patient peut aussi développer de l'arthrite plus tardivement, environ 2 mois après<sup>211</sup>.

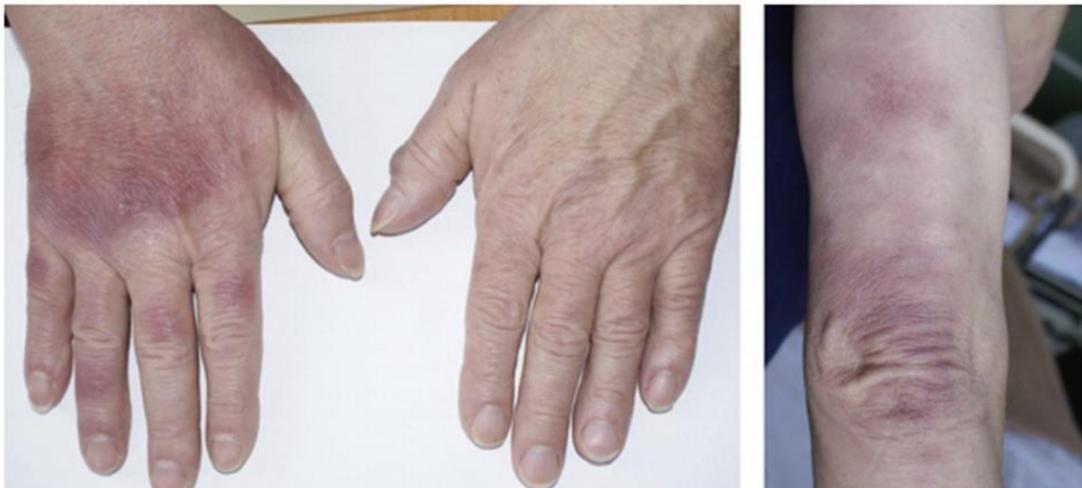
L'atteinte cardiaque se manifeste par des palpitations, de la dyspnée souvent c'est le bloc auriculo-ventriculaire qui est touché<sup>207</sup>.

Les neuroborrélioses, quant à elles, se manifestent dans 15% à 40% des cas<sup>212</sup>. C'est une des formes les plus fréquentes en Europe. Les atteintes neurologiques peuvent être périphériques au niveau de la motricité ou des nerfs (centraux, oculaires) avec la présence de conjonctivite ou méningées. Le syndrome méningé est généralement commun à l'ensemble de ces manifestations <sup>213</sup>. Une des manifestations cliniques caractéristiques est notamment la paralysie bilatérale chez l'enfant<sup>214</sup> (figure 16B).

### 6.3 La phase tardive ou « chronique »

Survient ensuite la phase tertiaire ou tardive qui est très difficile à déterminer. Elle peut apparaître des années après l'infection même après une période de rémission et peut être aggravée par la présence d'une co-infection. Ce sont majoritairement des atteintes articulaires avec l'arthrite chronique ou des atteintes cutanées (ACA).

L'acrodermatite chronique atrophiante (ACA) est un syndrome inflammatoire qui se caractérise par la présence d'un érythème violacé et œdémateux au niveau des mains, des pieds ou des genoux. Ce syndrome évolue vers une atrophie avec une peau plus fine à l'aspect luisant qui laisse notamment apparaître les vaisseaux sanguins<sup>207</sup> (figure 17).



**Figure 17 : Manifestation clinique tardive de Lyme , l'acrodermatite chronique atrophiante.**

<sup>215</sup>(D'après Zajkowska *et al.* (2011)). Photographie d'une ACA (mains et genou) due à une infection par *Borrelia*.

L'arthrite quant à elle se manifeste par des crises en poussées successives, pouvant devenir continue<sup>95</sup>. Le diagnostic biologique pour cette manifestation peut être réalisé à partir d'un prélèvement de liquide synovial, ce que nous décrirons après.

D'autres complications sont référencées : comme les encéphalomyélites qui provoquent un trouble de la marche, de la mémoire et de la concentration ou des démyélinisation<sup>72</sup>, ou encore le syndrome post-Lyme (SPL). Il s'agit d'un syndrome controversé, touchant les patients ayant souffert de la maladie, mais qui ont été traités. Les personnes présentent des céphalées, des myalgies, des labilités émotionnelles, des troubles du sommeil ou encore une rigidité au niveau du cou. Souvent le SPL est confondu avec le syndrome de fatigue chronique ou fibromyalgique. Cependant, les études à ce sujet sont très contradictoires et ces syndromes ne sont pas reconnus<sup>216</sup>.

## 7. Le traitement et la prévention

### 7.1 Le traitement curatif

Le retrait d'une tique doit être réalisé le plus rapidement possible. Il est recommandé de retirer la tique mécaniquement avec un « tire-tique », par rotation-traction de façon perpendiculaire à la peau, en faisant attention de retirer la tique entière. Après désinfection de la zone de piqûre, le patient surveille l'apparition des symptômes. Si ceux-ci apparaissent (notamment l'érythème migrant), il devra être traité rapidement. L'efficacité des antibiotiques contre cette pathologie a été démontrée dès les années 50<sup>217,218</sup>.

Le traitement préconisé pour la maladie est l'antibiothérapie, les principales classes d'antibiotiques vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi* sont les  $\beta$ -lactames (amoxicilline, ceftriaxone), les macrolides (azithromicine), les tétracyclines (doxycycline)<sup>219</sup>.

En cas d'érythème migrant isolé sans autre signe clinique, le traitement de première intention recommandé est la doxycycline (200 mg/ jour en 2 prises) ou amoxicilline (1 à 2 g 3 fois par jour) pendant 14 jours. Si le patient présente un érythème multiple avec des signes extracutanés, le traitement doit se faire pendant 21 jours. L'amoxicilline est un antibiotique très intéressant, car il peut être utilisé chez l'enfant de moins de 8 ans et la femme enceinte contrairement aux autres antibiotiques, la posologie recommandée dans ce cas est 1 à 2 g 3 fois par jour chez l'adulte et 50 à 100 mg/kg/j en 3 prises chez l'enfant pour une durée de 21 jours,

également. Si le traitement de première ligne est impossible, la haute autorité de la santé préconise l'utilisation de l'azithromycine pendant 10 jours.

Pour les phases secondaires et tertiaires, le traitement se fait au cas par cas : l'antibiotique, la dose et son mode d'administration (oral, parentéral, *per os*, intraveineux ou intramusculaire) vont dépendre de la manifestation clinique. Le traitement peut s'étendre jusqu'à 28 jours<sup>61</sup> (tableau 2).

**Tableau 2 : Traitements de la Borréliose de Lyme chez l'adulte.**

<sup>220</sup>(Modifié d'après la haute autorité de la santé (2018)).

Stade	Formes cliniques	Traitement
Phase localisée	Erythème migrant	> doxycycline (200 mg/j) ou amoxicilline (1 gx3/j) pendant 14 jours > azithromycine (1000 mg) pendant 7 jours
	Atteintes neurologiques	> ceftriaxone (2 g/j) ou la doxycycline (200 mg/j) pendant 21 jours
Phase précoce disséminée	Atteintes articulaires	> doxycycline (200 mg/j) ou amoxicilline (1 gx3/j) pendant 28 jours > ceftriaxone (2 g/j) pendant 28 jours
	Acrodermatite chronique atrophiante	> doxycycline (200 mg/j sauf chez la femme enceinte) pendant 28 jours > ceftriaxone (2 g/j) pendant 28 jours

À ce jour, aucun cas clinique d'antibiorésistance n'a été documenté<sup>221</sup>, bien que des études ont montré la possibilité d'émergence de souches résistantes en culture *in vitro*<sup>222,223</sup>. En effet, l'utilisation excessive, répétée et/ou inappropriée des antimicrobiens en médecine humaine peut contribuer au développement de systèmes de défense et de résistance des bactéries.

## 7.2 La prévention

Un moyen de prophylaxie envisagée dans la maladie de Lyme est la vaccination<sup>224</sup>. L'entreprise GSK (Glaxo Wellcome et Smithkline Beecham) a obtenu en 1998 une autorisation de mise sur le marché américain par la FDA (Food drug and administration) pour leur vaccin LYMERix® qui ciblait la lipoprotéine OspA. Cependant, ce vaccin a été controversé, notamment en raison de l'apparition de nombreux effets secondaires. Il a donc été retiré du marché au bout de quatre ans sans jamais être commercialisé en Europe<sup>225</sup>. Bien que de nombreuses équipes de recherche proposent de nombreux candidats vaccins, un seul programme clinique est actif. Il s'agit du candidat vaccin de l'entreprise Valneva VLA15. VLA15 est une protéine recombinante multivalente ciblant six sérotypes de la Borréliose.

Ce vaccin cible aussi la protéine de surface externe OspA. Deux essais cliniques de phase 2 sont déjà terminés. Une collaboration est en cours avec Pfizer pour le dernier stade de développement. En revanche, ils existent de nombreux vaccins canins sur le marché en Amérique du Nord (MERIAL, RecombitekND Lyme, INTERVET NobivacND Lyme et ZOETIS LymevoxND)<sup>226</sup> avec des protéines recombinantes ou des isolats de *Borrelia burgdorferi* inactivés stimulant la production d'anticorps anti-OspA et anti-OspC.

Un autre moyen de prévention de la maladie est la lutte contre les vecteurs en épandant des acaricides (comme chlorpyrifos 600g/ha, interdit en Europe seulement depuis avril 2020), des répulsifs, des antiparasitaires organochlorés, des organophosphorés ou des carbamates<sup>227</sup>. Cependant, l'épandage de ces molécules est mauvais pour les biotopes, l'environnement et pour la santé humaine. Ainsi lorsqu'elles sont utilisées, elles ne visent donc pas spécifiquement/seulement les tiques, mais un panel d'insectes et d'arachnides.

Le meilleur moyen de lutte contre la maladie reste la prévention primaire avec la minimisation de fréquentation des zones à risques. Lorsque l'on se trouve dans une zone critique, il est recommandé de porter des vêtements couvrants de préférence de couleur claire afin de mieux repérer la présence potentielle du vecteur, de porter des chaussures montantes et fermées et si besoin d'utiliser sur les vêtements et la peau des répulsifs de types DEET. Après exposition, l'inspection visuelle minutieuse de la peau est indispensable surtout dans les zones à plis plutôt humides (tels que les aisselles, les plis du genou, les zones génitales, le nombril) et le cuir chevelu. En effet, si la tique est constatée rapidement après piqûre (moins de 12h) et enlevée suivant les recommandations, il y a très peu de risque que le pathogène soit transmis<sup>187</sup>.

## ***II. Le diagnostic de la maladie de Lyme***

On considère généralement qu'il existe trois grandes catégories de diagnostic pour une maladie infectieuse : le diagnostic clinique, le diagnostic biologique direct et le diagnostic biologique indirect<sup>4</sup>. Le diagnostic de la maladie de Lyme est un sujet à controverse. Le diagnostic clinique est difficile à poser en raison du polymorphisme de la maladie, des manifestations cliniques non systématiques et souvent non spécifiques. Le diagnostic biologique, quant à lui, est également complexe en raison de la très faible quantité de pathogènes dans les échantillons biologiques ainsi que les variations antigéniques entre les espèces ou même les souches de *Borrelia*<sup>228</sup>.

## 1. Le diagnostic clinique

La première étape dans le diagnostic clinique de la maladie de Lyme est la description des différentes manifestations cliniques. Une manifestation caractéristique de la maladie, qui suffit à établir avec certitude le diagnostic est la présence de la lésion cutanée : l'érythème migrant<sup>205</sup>. Parfois, l'érythème peut avoir une forme plus atypique ou être multiple<sup>229</sup>, ainsi il sera nécessaire de mettre en relation ces manifestations avec la piqûre d'une tique ou de rechercher le potentiel contact avec le vecteur.

Ce diagnostic est souvent différentiel. C'est-à-dire qu'on cherche à différencier la maladie d'autres pathologies présentant des symptômes similaires, afin d'établir un diagnostic plus sûr. Ce processus de diagnostic est souvent complété par des tests de diagnostics biologiques directs ou indirects.

## 2. Les diagnostics biologiques

### 2.1 Les généralités

Il est nécessaire avant de parler de diagnostic de définir les notions essentielles à la compréhension de l'utilisation de chaque approche de diagnostic.

La sensibilité est la capacité d'un test à identifier les patients atteints de la maladie, c'est également la probabilité d'avoir une réponse positive chez un malade ; c'est le taux de vrais positifs. La sensibilité correspond au nombre de vrais positifs divisé par le nombre de personnes malades (vrais positifs additionnés au nombre de faux négatifs).

La spécificité est la capacité d'un test à identifier les sujets sains, c'est également la probabilité d'avoir une réponse négative chez les non-malades. C'est le taux de vrais négatifs soit le nombre de vrais négatifs divisés par l'ensemble des sujets sains.

Ces qualités définissent la validité et la fiabilité d'un test. Lorsqu'il s'agit d'un test quantitatif, la valeur seuil entre également en compte.

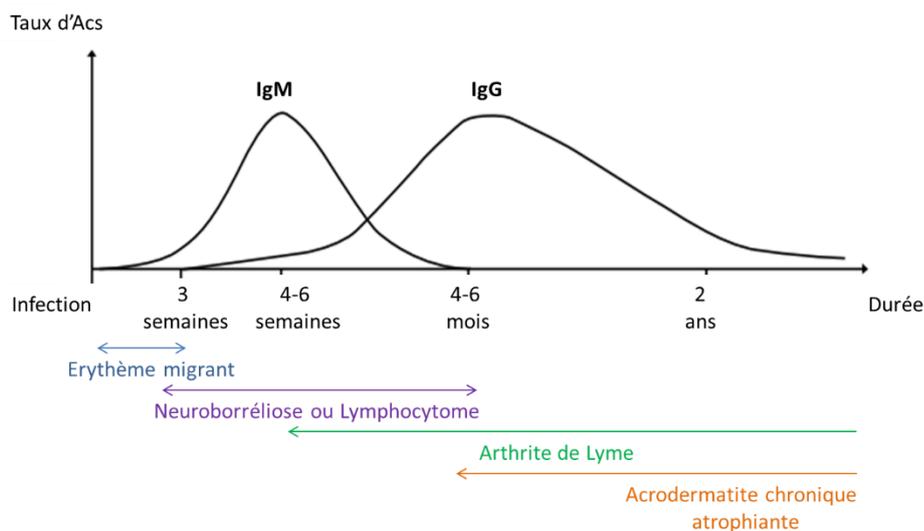
La maladie de Lyme peut être dépistée *via* les prélèvements de différents échantillons selon les tissus atteints : prélèvement de sang, biopsie cutanée en périphérie de l'érythème, prélèvement de liquide céphalo-rachidien (LCR), prélèvement de liquide synovial ou d'urines<sup>230</sup>. Les prélèvements se font dans des conditions d'asepsies.

## 2.2 Le diagnostic indirect

Dans la pratique, la majorité des tests réalisés sont des tests indirects. Ils reposent sur la recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre *Borrelia burgdorferi*. Ces tests sont réalisés en deux temps. Dans un premier temps, un test immuno-enzymatique, souvent de type ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), permet de mettre en évidence des anticorps spécifiques dirigés contre la bactérie et de mesurer un titre de façon quantitative. Dans un deuxième temps, un test d'immunoempreinte confirmera la spécificité des anticorps détectés.

Les anticorps recherchés ou immunoglobulines (Ig) sont des IgG et des IgM. Suite à l'introduction dans l'organisme d'un agent reconnu comme étranger, les plasmocytes produisent des anticorps dirigés contre cet agent. Les IgG sont les immunoglobulines majoritaires dans le sérum, elles représentent presque 75% des Ig totales. Elles sont caractérisées par une chaîne lourde de type  $\gamma$ . Les IgM, caractérisées par une chaîne lourde de type  $\mu$ , représentent quant à elles environ 10% des immunoglobulines totales.

Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître. Ils apparaissent 4 à 6 semaines après la piqûre et sont suivis par l'apparition des IgG 2 à 3 semaines plus tard<sup>8</sup>. Généralement, les taux d'IgM les plus élevés sont observés 6 à 8 semaines après l'infection, ils vont ensuite diminuer progressivement après 3 mois<sup>8</sup>. Alors que les taux d'IgG les plus élevés sont constatés à des stades tardifs de la maladie vers le sixième mois de l'infection (notamment dans des cas d'ACA ou d'arthrites)<sup>231</sup>. La décroissance des anticorps peut se prolonger sur plusieurs années (figure 18).



**Figure 18 : Évolution du taux d'IgM et IgG après infection par la maladie de Lyme.**

<sup>232</sup>(Modifié et adapté d'après Olesen *et al.* (2006)). Le graphique représente l'évolution des IgM et IgG, les manifestations cliniques potentielles sont représentées ici au cours du temps.

Lors de la phase très précoce de la maladie, pendant la présence d'un érythème migrant, seulement 50% des patients vont développer des IgM<sup>233,234</sup>. La sensibilité sera bien meilleure dans la phase secondaire avec la présence d'anticorps dans 70 à 90% des cas. Dans les phases tardives de la Borréliose, les IgM sont rarement détectés alors que la réponse en IgG sera très importante sauf dans le cas de la neuroborréliose tardive où il peut y avoir une absence d'IgG et une présence d'IgM<sup>197</sup>. L'interprétation des tests sérologiques est donc très complexe et doit se baser à la fois sur les résultats des tests ELISA et du western blot.

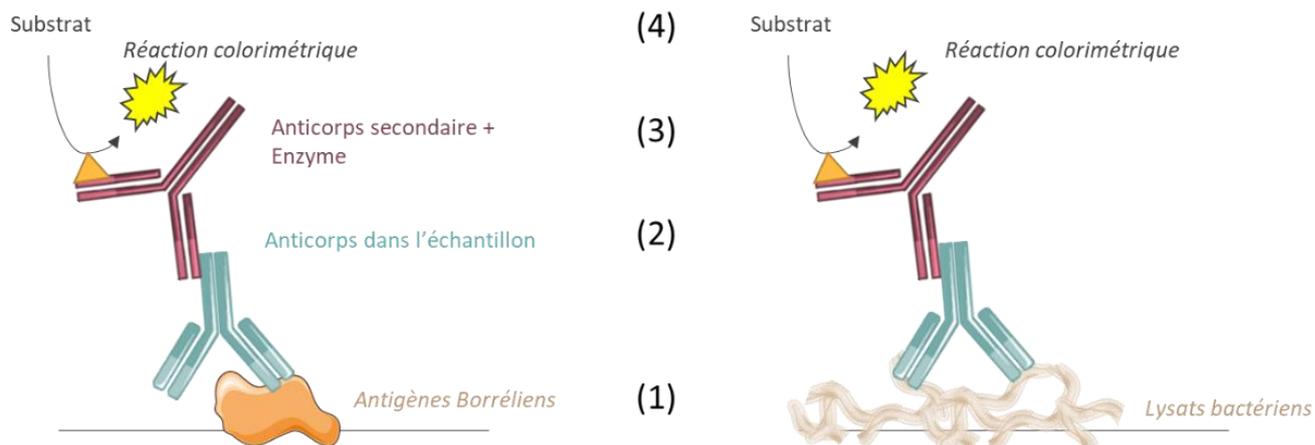
### 2.2.1 Le test immuno-enzymatique ELISA

Le test sérologique de première intention pour la maladie de Lyme est un test EIA (*Enzyme ImmunoAssays*). D'une manière générale, les tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, littéralement « technique d'immunoabsorption par enzyme liée ») présentent de nombreux avantages. Cette méthode requiert de petits volumes d'échantillons, le temps d'exécution est relativement rapide (environ 2h), son coût est assez faible et peut-être réalisé à grande échelle sur automate. Dans les analyses de la Borréliose de Lyme, il s'agit d'ELISA indirect.

La technique est réalisée en quatre étapes (figure 19) :

- (1) La fixation de l'antigène ou des antigènes représentatifs de la bactérie sur un support solide (généralement il s'agit de plaques 96 ou 384 puits en polystyrène). Cette étape n'est pas réalisée par le clinicien.
- (2) Le dépôt et la réaction avec l'échantillon à analyser. Les anticorps spécifiques présents dans l'échantillon vont se lier à ou aux antigènes.
- (3) Le dépôt et la réaction avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme (anticorps traceur). Les anticorps traceurs correspondent à des anti-immunoglobulines (soit des anti-IgG ou anti-IgM, selon la classe d'anticorps recherché) couplées à un marqueur (enzyme), ceux-ci vont se fixer aux anticorps spécifiques.
- (4) La révélation grâce à l'ajout d'un substrat de l'enzyme permettant d'obtenir une réaction colorée qui traduit la présence de l'anticorps secondaire et, donc, des anticorps spécifiques.

Des étapes de lavage sont nécessaires, après chaque étape d'incubation, afin d'éliminer les liaisons non spécifiques.



**Figure 19 : Principe de l'ELISA indirect.**

(Créé avec des images tirées de Servier Medical Art, Creative Commons Attribution 3.0 Unported License). L'ELISA peut être réalisé avec différents antigènes fixés aux supports : comme des recombinantes ou des lysats bactériens.

Couramment dans ces ELISA, le support solide est revêtu (i) soit d'un lysat bactérien (mélange possible des trois principales souches en Europe : *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. et *B. garinii*), (ii) soit de protéines recombinantes, telles qu'OspA, OspC, BmpA, DbpA, VlsE<sup>8</sup> (tableau 3).

**Tableau 3 : Principaux antigènes entrant dans la composition des tests sérologiques.**

(Modifié d'après la haute autorité de la santé (2018)).

Les antigènes	Souches plus couramment ciblées	Réponse sérologique
OspC (24kDa p22 à 25) - Outer surface protein C	PKo ( <i>B. afzelii</i> ) B31 ( <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto) PBi ( <i>B. bavariensis</i> ) 20047 ( <i>B. garinii</i> )	Réponse IgM stades précoces
DbpA (p21) - Decorin-binding protein A (Osp17)	PKo B31 PBi PBr ( <i>B. garinii</i> )	Réponse IgG (Neuroborréliose et arthrites de Lyme)
VlsE (35 kDa) - Variable major protein like sequence	PKo PBi PKa2 ( <i>B. burgdorferi</i> sensu lato)	IgM et IgG tous les stades de la maladie
P83/100	PKo	IgG stades avancés
BmpA (39kDa) - Borrelial membrane recombinant protein A	PKo B31 PBi	IgG
OppA p58 - Perméase oligopeptidique A	PBi	IgG stades avancés
Flagelline (p41)	PKo PBi	IgM et IgG tous les stades de la maladie
OspA (p31)	PKo ( <i>B. afzelii</i> )	IgG

Les tests ELISA les plus utilisés en France sont les tests Biomérieux VIDAS® Lyme IgG et VIDAS® Lyme IgM (52% du marché en France)<sup>235</sup>. Ces tests utilisent une combinaison de protéines recombinantes chimériques de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (DbpA, OspC et VlsE).

La sensibilité de l'ELISA va dépendre du stade de la maladie, il sera de l'ordre de 54% en présence d'un érythème migrant, 81% dans le cas de la neuroborréliose et de 96 à 97% dans le cas d'arthrite de Lyme ou d'acrodermatite chronique atrophique<sup>236</sup> (tableau 4).

La valeur de spécificité souhaitée pour ces tests ELISA par l'EUCALB est de 90%. Afin de réaliser un état des lieux des tests ELISA disponibles sur le marché, le centre national de référence (CNR) des *Borrelia / Borrelia* a évalué les différents tests sur une population bien caractérisée (personnes avec un érythème migrant, atteintes d'une neuroborréliose, ou atteintes d'une arthrite de Lyme). Il s'avère que dans les cas de neuroborréliose de Lyme, lorsque la sensibilité est relativement élevée, seuls neuf tests sur quatorze avaient une spécificité supérieure à 90% ne considérant que les IgG ou les Ig totales. Lors du stade précoce avec la présence d'un érythème migrant, trois tests sur dix avaient une sensibilité supérieure ou égale à 60% et des réactions croisées avec d'autres pathogènes étaient retrouvées dans 81 à 85%<sup>184</sup>.

Si le test ELISA est positif ou suspicieux, un test de confirmation est réalisé : l'immunoempreinte (western-blot) dont la spécificité est meilleure.

### **2.2.2 Le test de confirmation : l'immunodot ou western blot**

Ce test de deuxième intention est réalisé afin d'identifier les antigènes reconnus par les anticorps et de confirmer la spécificité de la réponse immunitaire. Le principe de ce test est basé sur la séparation de protéines en fonction de leur poids moléculaire (par électrophorèse sur gel d'agarose). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF (polyfluorure de vinylidène) afin de les rendre accessibles à la détection par des anticorps.

Les premiers tests utilisaient des lysats bactériens de *Borrelia*<sup>8</sup> séparée par électrophèse, aujourd'hui il s'agit principalement de dot-blot, membrane sur laquelle sont déposées différentes protéines d'intérêt (soient des protéines recombinantes de *Borrelia burgdorferi*). Les laboratoires n'ont donc plus à réaliser l'électrophorèse sur gel d'agarose, mais des bandelettes sont prêtes à l'emploi. L'optimisation des tests permet d'obtenir de meilleures performances (sensibilité et spécificité) avec une meilleure standardisation.

Les principales protéines recombinantes utilisées dans ces tests pour la détection des IgG sont : p100 (une protéine du cytoplasme bactérien), VlsE, p58 (une protéine de *B. garinii*), p39 (une protéine membranaire), la protéine OspA p31, la protéine OspC p24, la protéine DbpA p18 et pour les IgM : p41 (la flagelline) et p24 (OspC).

Leur détection permet d'affecter un score en fonction de la spécificité de reconnaissance de ces protéines<sup>237</sup>. L'EUCALB estime qu'un immunoblot en IgM est positif si au moins 2 bandes sont reconnues parmi OspC, BmpA et la flagelline et qu'un immunoblot IgG est positif si au moins 5 bandes sont positives parmi p17, p18, DbpA, OspC, OspD, p30, OspA, OspB, p58, p83/100, VlsE<sup>184</sup>.

L'interprétation du western blot est délicate, car une bande d'intensité trop faible peut être interprétée comme positive ou négative faussant ainsi le résultat<sup>238</sup>. Compte tenu de la diversité des géoespèces impliquée dans la Borréliose de Lyme en Europe, de plus en plus de kits utilisent des combinaisons d'antigènes recombinants, représentant les cinq principales espèces pathogènes retrouvées en Europe (*B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. bavariensis*, *B. spielmanii*). La sensibilité moyenne des immunoblots varie de 52% à 61% au stade précoce de la maladie, de 69% à 81% dans les cas de neuroborréliose. Concernant, la spécificité, elle est également variable de 86 à 97% en général<sup>236</sup>, alors que la spécificité préconisée par EUCALB doit être de 95%.

### 2.2.3 Autodiagnostic

Il existe également des autotests simples et rapides disponibles en pharmacie pour le diagnostic indirect de la maladie de Lyme. C'est le cas des tests sérologiques comme Alere™ Lyme Home Test d'Abbott ou MyTestLyme test de Mylan qui permettent de détecter la présence d'IgM spécifique. Le test consiste à prélever au bout du doigt une petite goutte de sang et de la déposer sur une bandelette pour la détection d'anticorps anti-*Borrelia* sans spécifier lesquels. Mais, ces tests manquent de sensibilité et il ne faut pas se baser uniquement sur la présence unique d'IgM pour poser un diagnostic. Ainsi les autorités mettent en garde sur leur utilisation en invoquant notamment une mauvaise balance-bénéfice/risque.

## 2.2.4 Les limites

Les sensibilités et spécificités de ces tests indirects sont variables (tableau 4). Ils présentent de nombreuses limitations.

**Tableau 4 : Performance des tests de diagnostics actuellement recommandés.**

<sup>239</sup>(Modifié d'après la haute autorité de la santé (2018)). nd : non déterminé, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'étude dans la littérature. Les sensibilités et les spécificités sont des moyennes.

Stade	Formes cliniques	Sensibilité	Spécificité
Phase localisée	Erythème migrant	Sensibilité 30 à 40%	nd
Phase précoce disséminée	Atteintes neurologiques	Sensibilité 77 à 90 %	Spécificité 92%
	Atteintes articulaires	Sensibilité 96 à 99%	Spécificité 94%
Phase tardive disséminée	Acrodermatite chronique atrophiante	Sensibilité de 97%	nd
	Autres atteintes neurologiques ou articulaires	Comme phase précoce disséminée	

### *Les réactions croisées*

Les tests sérologiques sont susceptibles de produire de faux positifs. En effet, les antigènes utilisés pour capturer les anticorps dans le test ELISA ou même dans l'immunoblot peuvent être communs à différentes bactéries et maladies. Un des antigènes ubiquitaires les plus connus est la flagellin B (FlaB) p41.

Il existe aussi des réactions croisées avec d'autres spirochètes comme celles responsables des fièvres récurrentes, de la syphilis (*Treponema pallidum*), ou de la leptospirose, etc<sup>240</sup>.

Il existe aussi des réactions croisées avec des agents auto-immuns, des anticorps antinucléaires ou des facteurs rhumatoïdes trouvés lors de pathologies inflammatoires. Les réactions croisées peuvent aussi se faire avec des maladies virales (comme le VIH, ou Epstein-Barr) ou avec d'autres pathologies transmises par les tiques comme l'ehrlichiose ou l'anaplasmose<sup>8</sup>. En général, ce sont surtout les sérums de patients atteints de syphilis qui donnent lieu à un grand nombre de réactions croisées. Ainsi, lors de l'interprétation du western blot, il faut bien faire attention aux bandes immunoréactives détectées et vérifier la spécificité de chacune.

### ***La diversité de souches européennes***

En Amérique du Nord, la souche *Borrelia burgdorferi* sensu stricto est la seule retrouvée alors qu'en Europe plus de 5 espèces sont connues comme pathogènes pour l'homme.

Certains antigènes présentent de fortes variabilités de séquence selon l'espèce de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. L'exemple le plus connu est l'antigène OspC. Rien que parmi les 3 espèces majoritaires en Europe (*B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. et *B. garinii*), au moins vingt-cinq groupes distincts ont été reportés<sup>153</sup>. Les protéines peuvent donc présenter de fortes différences dans les séquences et donc ne pas être reconnues par les anticorps. Actuellement, il existe une insuffisance de standardisation des tests dans le choix des antigènes, chaque fabricant utilise des réactifs et des antigènes qui lui sont propres.

### ***La « fenêtre » de séronégativité***

Ces tests peuvent aussi conduire à des faux négatifs. Lors de la phase précoce de l'infection, lorsque les anticorps sont absents ou en très faibles quantités, une sérologie négative ne permet pas d'écarter une infection de la Borréliose de Lyme. En effet, il existe un décalage entre l'apparition des anticorps et le début de l'infection, on appelle cela la « fenêtre » de séronégativité. Les anticorps sont produits 2 à 4 semaines après l'infection<sup>241</sup>. C'est pour cela que la sensibilité au stade précoce ne dépasse pas 50%. Il existe aussi de rares cas de séronégativité dans les stades plus tardifs de la maladie, mais aussi chez les patients immunodéprimés<sup>8</sup>.

### ***Les complexes immuns***

Également, il a été montré que les anticorps spécifiques à *Borrelia* peuvent être impliqués dans les complexes immuns de patients atteints de la maladie de Lyme notamment dans les phases très précoces de la maladie<sup>242</sup>. La sérologie peut alors s'avérer négative en raison du faible nombre d'anticorps libres<sup>243</sup>. En isolant et en dissociant les complexes immuns chez des patients séronégatifs avec un érythème migrant, Schutzer *et al.* ont trouvé des anticorps spécifiques anti-*Borrellia*<sup>243</sup>. La dissociation des complexes immuns est donc une solution afin de libérer les anticorps réactifs.

### ***La « cicatrice sérologique »***

Les tests sérologiques ne permettent pas de différencier une infection active d'une exposition antérieure. Des cas de réinfection existent et ont déjà été décrits dans la littérature<sup>244</sup>.

Même si l'infection a été traitée efficacement, le patient peut présenter une sérologie positive, car la réponse humorale est durable. Les IgM et les IgG spécifiques peuvent persister des années dans l'organisme, c'est la « cicatrice sérologique »<sup>245</sup>. Cela pose notamment un problème dans les professions particulièrement exposées à la nature et aux animaux, pour lesquels il y a un risque de ne pas faire la différence entre une infection ancienne et une réinfection. De même, les tests sérologiques ne seront pas utiles dans le cadre de suivi post-traitement afin de vérifier l'efficacité d'un traitement antibiotique.

## 2.3 Les tests non conventionnels

Au vu des différentes limitations des tests sérologiques, des tests non conventionnels<sup>246</sup> sont envisagés afin d'améliorer les diagnostics et le suivi de la Borréliose de Lyme précoce et tardive.

### 2.3.1 Réponse inflammatoire et auto-immune

Récemment la mesure de la chimiokine CXCL13 dans les échantillons de patients suspectés d'être atteints de la maladie de Lyme a été identifiée comme un nouvel outil de diagnostic potentiel. CXCL13 est chimiotactique pour des lymphocytes B produits dans les organes lymphoïdes secondaires<sup>247</sup>. Dans le cas des neuroborrélioses de Lyme, de nombreuses études ont montré une concentration élevée en CXCL13 dans le liquide céphalo-rachidien<sup>248,249</sup>. Cette chimiokine est détectable de quelques jours à quelques semaines avant les anticorps et son taux diminue rapidement après traitement aux antibiotiques<sup>248</sup>. La sensibilité moyenne de ces tests est comprise entre 89 et 97% et la spécificité moyenne est de 96%<sup>246</sup>.

Actuellement peu de kits sont disponibles sur le marché afin de doser cette chimiokine et aucun seuil n'a été fixé dans le cadre du diagnostic de la maladie de Lyme, laissant ainsi le laboratoire déterminer son propre seuil.

De plus, le niveau de CXCL13 peut être élevé dans d'autres troubles du système nerveux comme lors de méningites<sup>250</sup>. CXCL13 ne peut donc pas être utilisée en routine, mais constitue un potentiel marqueur complémentaire dans le cas du diagnostic des neuroborrélioses de Lyme.

D'autres marqueurs ont été décrits : comme la chimiokine CCL-19<sup>251</sup> ou encore l'apolipoprotéine B-100<sup>252</sup>. L'apolipoprotéine B-100 a été décrite comme un épitope des lymphocytes T dans le cas de l'arthrite de Lyme. Cependant, aucune étude à ce jour ne montre leur réelle utilité dans le diagnostic, ces marqueurs restent donc à être validés.

### 2.3.2 Réponse immunitaire cellulaire

Une autre approche consiste en l'évaluation de l'immunité cellulaire. Cette exploration peut se réaliser par le biais d'un test de transformation lymphocytaire<sup>253</sup>. Ce test permet de détecter une réponse immunitaire des lymphocytes T contre les antigènes de *Borrelia*<sup>254</sup>. Ces tests ont été évalués lors des différents stades de la maladie, la sensibilité moyenne est comprise entre 45 et 89,4% et la spécificité moyenne entre 33 à 98,7%<sup>246</sup>. À l'heure actuelle, aucune recommandation n'a été faite sur l'utilisation de ces tests en raison de leur manque de spécificité<sup>255</sup>, les études ont montré des résultats très hétérogènes et d'une qualité mitigée.

La libération interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dans le sang a été également évaluée pour explorer l'activation des lymphocytes T après infection par *B. burgdorferi*. Il a été montré que le taux IFN- $\gamma$  circulant était élevé chez les patients atteints de la maladie de Lyme à un stade encore précoce,<sup>256</sup> mais également dans les phases plus tardives<sup>257</sup>. Le dosage par ELISPOT de l'IFN- $\gamma$  n'est pas très sensible dans les phases précoces de la maladie de Lyme avec une sensibilité moyenne de 36 à 69%, de plus une seule étude rapporte une spécificité de 82%<sup>257</sup>. Dans les phases plus tardives, la sensibilité et la spécificité moyenne augmentent pour atteindre respectivement 84% et 96%<sup>258</sup>. La sécrétion d'interféron- $\gamma$  a également été étudiée dans d'autres tissus/liquides biologiques (biopsies cutanées, liquide synovial, LCR) pour évaluer son rôle dans la réponse inflammatoire à *Borrelia*, mais elle n'est pas considérée comme un outil de diagnostic. Actuellement, l'ELISPOT de l'IFN- $\gamma$  ne peut être utilisé en routine, car son rôle n'a pas été clairement établi en tant que témoin d'infection à *Borrelia*. La spécificité, les seuils et la reproductibilité nécessitent plus d'investigations. Un test similaire a été également envisagé concernant la libération interféron- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), mais des études supplémentaires sont à envisager.

Une méthode d'immunophénotypage a également été envisagée en complément de diagnostic afin de déterminer la réponse en cellule CD57+. En effet, la Borréliose de Lyme « chronique » s'accompagne d'une altération des défenses immunitaires cellulaires se traduisant par une diminution du nombre de cellules tueuses naturelles (lymphocytes NK) CD57+<sup>259</sup>. Cependant, aucune donnée de sensibilité ni de spécificité n'a été rapporté<sup>246</sup>. Ainsi la mesure des CD57+ ne semble pas encore utile.

### 2.3.3 Le xénodiagnostic

Le xénodiagnostic a également été décrit dans la littérature comme une méthode non conventionnelle<sup>260</sup>. Cette technique de laboratoire consiste à faire piquer le sujet soupçonné d'être atteint de la maladie de Lyme par une tique non infectée (dite saine), afin de rechercher

dans cette tique la présence de la bactérie. Le xénodiagnostic permet de détecter de faible niveau de *B. burgdorferi* sensu stricto, même après l'administration d'antibiotiques. En effet, si le pathogène est transmis à la tique, la bactérie sera détectée par PCR. Les performances actuellement disponibles sont insuffisantes pour évaluer son utilité dans le diagnostic<sup>260</sup>.

## 2.4 Le diagnostic direct

Seul le diagnostic direct avec la mise en évidence de la bactérie elle-même constitue un diagnostic de certitude. Les diagnostics directs permettent de pallier les différents problèmes des tests sérologiques, décrits dans le paragraphe (II.2.2.4), pour savoir par exemple s'il s'agit ou non d'une infection active. Ces tests peuvent être effectués sur différents échantillons : sang, liquide céphalo-rachidien (LCR), liquide synovial ou articulaire et même sur des biopsies<sup>261</sup>. Cependant, les très faibles quantités de *Borrelia* dans les échantillons rendent difficile la détection.

### 2.4.1 Culture et examen microscopique

La mise en évidence de *B. burgdorferi* s.l. après culture est la méthode de référence pour confirmer le diagnostic. Pour ce faire, l'échantillon est mis en culture dans le milieu spécifique BSK-II en présence ou non d'antibiotiques à 32-34°C. Les cultures sont repiquées hebdomadairement pendant un minimum de 2 mois et observées régulièrement en microscopie à fond noir ou en contraste de phase pour identifier la *Borrelia*. Il est également possible de faire une coloration de Gram (apparence de Gram négatif) ou de faire de l'immunofluorescence directe. Il faut au minimum 2 semaines pour déclarer une culture positive et en règle générale jusqu'à 8 semaines pour poser le diagnostic<sup>262</sup>.

Une étude a estimé qu'une croissance à un niveau de  $10^6$  spirochètes par millilitre était nécessaire pour une détection microscopique fiable<sup>263</sup> et un minimum de dix bactéries dans l'échantillon pour être considéré comme positif. De plus, l'isolement de la bactérie pour poser un diagnostic précis en déterminant la souche bactérienne est rarement possible en raison de la faible quantité de bactéries présente dans l'échantillon<sup>238</sup>.

L'hémoculture (culture de sang) est une technique courante en microbiologie aussi utilisée dans le cadre du diagnostic de la maladie de Lyme. Cependant, le pourcentage d'hémoculture qui s'avère positive est très faible, généralement inférieur à 5%<sup>241</sup>. Des pistes d'amélioration sont envisagées afin d'augmenter la sensibilité de l'hémoculture notamment en

mettant en culture des plus gros volumes de sang 9 à 18mL (mais cette méthode n'est pas applicable aux enfants)<sup>264</sup>. La sensibilité de la culture à partir de grands volumes de plasma de patients atteints précocement de la maladie de Lyme est d'environ 50%<sup>265</sup>. Ces rendements de la culture s'expliquent par la très faible quantité de *Borrelia burgdorferi* par millilitre de sang : soit environ 0,1 spirochète par mL dans une phase précoce de la maladie<sup>265</sup>.

La culture peut être également réalisée sur des biopsies cutanées de patients avec un érythème migrant, la sensibilité moyenne est comprise entre 40 et 70%<sup>266</sup>.

La culture d'échantillons autres que la peau et le sang est très limitée en raison de la rareté des organismes pathogènes dans d'autres types d'échantillons comme le LCR. La culture du LCR est peu sensible entre 3 et 17 %<sup>266</sup>. Cependant la spécificité de la culture est de 100%.

Cette méthode n'est pas pratique pour une utilisation clinique de routine, car elle est coûteuse en raison du milieu spécifique, elle est longue et très sensible aux contaminations. Ce diagnostic est plutôt réservé à quelques laboratoires spécialisés qui maîtrisent la technique (permettant de distinguer les potentiels artéfacts de culture pouvant être confondus avec des spirochètes<sup>267</sup>) et qui le réalisent sur des échantillons cliniques pertinents, comme par exemple la mise en culture d'une biopsie de peau suite à l'apparition d'une lésion cutanée<sup>268</sup> ou encore de liquide céphalo-rachidien dans le cas d'atteintes neurologiques<sup>269</sup>. Souvent la culture est couplée avec une méthode d'amplification de l'ADN : la PCR (*polymerase chain reaction*) permettant ainsi d'augmenter la sensibilité.

#### 2.4.2 L'amplification de l'ADN par PCR

Comme il s'agit d'un organisme à la culture difficile, les tests d'amplifications géniques se présentent comme une alternative intéressante. La PCR permet d'amplifier *in vitro* une séquence d'ADN de façon exponentielle.

Cette méthode peut se réaliser directement sur un prélèvement clinique ou après avoir mis en culture l'échantillon. Le premier test PCR pour la détection spécifique de l'ADN de *B. burgdorferi* sensu lato a été décrit en 1989<sup>270</sup>. Divers autres protocoles de PCR ont ensuite été développés pour la détection de l'ADN de *Borrelia* dans les échantillons cliniques<sup>271</sup>.

La PCR peut être qualitative (PCR conventionnelle ou et PCR nichée dite PCR Nested) ou quantitative (PCR en temps réel). La PCR qualitative mesure la quantité de produits de PCR accumulés à la fin des cycles de PCR, l'amplicon est visualisé sur un gel alors que la PCR quantitative permet de mesurer l'amplification au fur et à mesure qu'elle se produit. Les

données de la PCR quantitative sont recueillies au cours de la phase exponentielle de croissance (log) lorsque la quantité de produits de PCR est directement proportionnelle à la quantité d'acide nucléique. L'efficacité de la PCR dépend de plusieurs facteurs, dont la sélection d'un gène cible et d'un ensemble d'amorces appropriées pour l'amplification. En général, l'amplicon produit est compris entre 100 et 300pb car il permet d'obtenir de meilleure efficacité d'amplification et de réduire les effets de la fragmentation de l'ADN pendant le traitement des échantillons.

Les cibles les plus utilisées sont (i) le gène de la flagelline B (*flaB*), composant du flagelle bactérien, (ii) le gène *recA* (iii) le gène de la protéine *OspA* (iv) ou encore le gène de la protéine *p66*<sup>271,272</sup>.

La PCR est utilisée pour détecter *Borrelia burgdorferi* dans les biopsies cutanées<sup>273</sup>. Les cibles PCR utilisées dans ce cas sont : le gène de l'ARNr 16S<sup>274</sup>, le gène de l'ARNr 23S<sup>275</sup>, le gène *fla*<sup>276</sup>, le gène *recA*<sup>277</sup> et le gène *OspA*<sup>278</sup>. La sensibilité de la PCR pour la détection dans les érythèmes migrants est comprise entre 36% et 88%<sup>241</sup>.

La PCR est aussi intéressante chez les patients atteints d'une arthrite de Lyme. Dans ces études les cibles sont : le gène *OspA* et le gène codant pour l'ARNr 16S<sup>241</sup>. L'analyse PCR du liquide synovial est sensible, on l'estime entre 60 et 85%<sup>241</sup>.

En dehors de ces échantillons, la PCR est difficilement applicable sur les autres fluides et tissus en raison de leur faible sensibilité. En effet, dans les échantillons sanguins, la sensibilité de la PCR est très faible entre 10 et 18% en raison du faible niveau de spirochètes dans le sang et des nombreux inhibiteurs présents dans le sang comme les immunoglobulines G<sup>279,280</sup>.

Dans le cas d'atteintes neurologiques, la PCR peut être réalisée sur le liquide céphalo-rachidien, mais la sensibilité est comprise entre 15 et 30%<sup>241</sup>.

Un des avantages de la PCR est qu'il est possible de multiplexer les cibles<sup>281,282</sup>, par exemple la PCR peut être réalisée en ciblant le gène *flaB* des différentes espèces de *B. burgdorferi* sensu lato afin de différencier les espèces présentes dans un échantillon en une seule réaction. Ces techniques moléculaires peuvent donc être utilisées pour confirmer le diagnostic clinique, pour identifier les espèces moléculaires, et/ou pour réaliser un typage des spirochètes, et/ou pour détecter de potentielles co-infections.

Cependant, en plus d'être une méthode coûteuse notamment en raison de l'optimisation des amorces (dans le cas du multiplexage), un résultat de PCR positif ne prouve pas une infection active<sup>283</sup>.

### 2.4.3 La détection d'antigènes bactériens dans les fluides et dans la peau

Quelques études ont rapporté la détection d'antigènes de *Borrelia* chez un petit nombre de patients dans des échantillons d'urine<sup>6,284</sup> et de liquides céphalorachidiens<sup>285</sup>. En 1995, Harris *et al.* ont rapporté le développement d'un test de compétition utilisant des antigènes de *Borrelia* immobilisés sur une phase solide et des anticorps polyclonaux ayant une réactivité contre les antigènes de 31, 34, 39 et 93 kDa, pour la détection d'antigènes bactériens dans les urines<sup>286</sup>. Ce test initialement évalué par les auteurs sur une cohorte de 425 patients avec une sensibilité de 30%, a été, par la suite, invalidé par un autre groupe en raison de sa faible précision, sensibilité et spécificité<sup>287</sup>.

Plus récemment, en 2015, Cheung *et al.* ont rapporté la détection d'OspA dans le sérum d'un patient non traité, en utilisant une méthode d'ultracentrifugation suivie d'une détection par LC-MS/MS (chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem) de potentiels fragments bactériens circulants. Cette étude demande clairement à être confirmée sur un grand nombre d'échantillons de patients<sup>288</sup>.

Une autre étude basée également sur la détection de OspA a été rapportée par Magni *et al.* en 2015<sup>289</sup>. La méthode se base sur la technologie nanotrap, qui consiste en une concentration/capture d'antigène de *Borrelia* dans un échantillon d'urine (40mL) au moyen d'un gel, suivi d'une détection de la protéine OspA par western blot<sup>289</sup>. Cette méthode a été évaluée sur 151 échantillons d'urines de patients d'Amérique du Nord, suspectés d'être atteints de la maladie de Lyme à un stade précoce. Les performances annoncées sont de 100% en sensibilité et 100% en spécificité chez les patients avec une éruption cutanée de type érythème migrant.

Bien que ce test semble prometteur, une validation robuste est nécessaire, notamment par d'autres groupes de recherche. La société Ceres Nanosciences, Inc. (Ceres) et le laboratoire Innatoss (Innatoss) ont d'ailleurs annoncé en 2018 le lancement d'un partenariat pour évaluer le test *Nanotrap® Lyme Antigen* chez des patients de l'Union européenne. Chez ces patients, le test s'est avéré systématiquement négatif<sup>290</sup>. Une explication avancée serait que l'OspA des souches de *Borrelia* européennes ne serait pas bien reconnue par l'anticorps utilisé en détection et/ou que le niveau d'OspA circulant serait trop faible. Quoiqu'il en soit, le CDC ne recommande pas l'utilisation de tests de capture d'antigènes dans l'urine, car leur précision et leur utilité clinique n'ont pas été suffisamment établies.

Le CNR des *Borrelia / Borreliella* de Strasbourg a également rapporté la détection directe d'antigènes de *Borreliella* dans des biopsies de peau à des phases précoces de la maladie<sup>291</sup>. La détection de protéines de *Borreliella* a été réalisée par spectrométrie de masse et ce à partir de biopsies cutanées de patients atteints d'érythèmes migrants. Cette méthode présentait néanmoins encore une limitation, en raison de la lidocaïne utilisée lors des biopsies de peau qui affectait négativement la viabilité des *Borreliella* et donc impactait la sensibilité de la protéomique<sup>292</sup>. Une étape de culture supplémentaire est donc envisagée pour récupérer la sensibilité et transposer cette technique à l'homme<sup>292</sup>.

### **3. La problématique générale du diagnostic**

La problématique du diagnostic de la maladie de Lyme est un enjeu très médiatique. Notamment, parce que les tests actuels présentent de nombreuses limitations et que l'utilisation des kits et des tests n'est pas standardisée. Le haut conseil de la santé publique a publié un rapport en 2014 sur l'état des lieux du diagnostic en France. Rien que pour la sérologie, il y a actuellement 42 tests ELISA sur le marché réalisés par 15 fabricants différents et 13 tests de western blot par 6 fabricants, utilisant pour certains des antigènes bactériens différents. Cette problématique de diagnostic de la maladie de Lyme se retrouve aussi dans le diagnostic d'autres maladies causées par des spirochètes : syphilis, leptospirose ou les fièvres récurrentes<sup>48</sup>. En effet, pour ces bactéries, les méthodes de détections directes ne sont pas optimales<sup>240</sup>. La culture est toujours fastidieuse en routine, avec la nécessité de milieux complexes. La commercialisation des techniques de PCR en temps réel a représenté une avancée majeure<sup>293-295</sup>, car elles sont plus sensibles que la culture et peuvent être plus facilement standardisées. Cependant la probabilité d'un résultat positif de la PCR dépend du stade de l'infection (bactériémie pour la leptospirose ou fièvre pour les *Borrelia*) et dépend du type de prélèvement (biopsie de l'érythème migrant pour la maladie de Lyme ou chancre génital pour la syphilis). Concernant le diagnostic indirect, des résultats faussement négatifs sont principalement observés au stade précoce de ces infections lorsqu'il n'y a pas ou peu d'anticorps spécifiques produits. Les tests sérologiques sont également tous associés à des réactions croisées, avec un risque de faux positifs et par conséquent un risque de diagnostics et de traitements excessifs. De plus, avec les tests actuels, il n'est pas possible de distinguer une infection active d'une réinfection ou d'une infection guérie (cf. paragraphe II.2.2.4).

## ***Projet de thèse***

La Borréliose de Lyme est la maladie infectieuse transmise par les tiques la plus fréquemment signalée en Europe et en Amérique du Nord. Cette infection bactérienne est due à une bactérie du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Les manifestations cliniques sont diverses et la maladie évolue en trois phases : (i) le stade primaire avec l'observation dans 50 % des cas d'une manifestation spécifique, l'érythème migrant (EM), (ii) le stade secondaire correspondant à la dissémination du pathogène et (iii) le stade tardif (souvent associé à des symptômes chroniques multisystémiques).

En France la maladie de Lyme touche plus de 50 000 nouvelles personnes chaque année. En 2016, le ministère de la Santé a lancé un plan national de lutte contre la maladie de Lyme en concertation avec de nombreux partenaires (ARS, équipe de recherche, association de patients...). L'objectif du plan est de renforcer l'information de la population et des professionnels de santé, d'améliorer le diagnostic et de mobiliser la recherche afin d'améliorer les connaissances sur la maladie.

En absence d'érythème migrant, l'approche recommandée pour le diagnostic de la maladie de Lyme est une stratégie en deux temps qui comprend un test immuno-enzymatique indirect (ELISA) suivi d'un western blot (WB) plus sensible et spécifique. Cependant, les diagnostics actuels présentent de nombreuses limitations. Ces tests ne prouvent pas l'existence d'une infection active et ils ne sont pas recommandés dans la phase précoce et localisée de la maladie. Pourtant poser un diagnostic est essentiel pour une meilleure prise en charge des patients et éviter le développement d'une forme disséminée de la maladie, mais aussi éviter l'errance thérapeutique des patients.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail. L'objectif de cette thèse est de développer des **outils et méthodes de diagnostic spécifiques et sensibles basés sur la détection d'antigènes bactériens** pour pallier les différentes problématiques actuelles.

Dans un premier temps, mon travail a consisté à **rechercher et identifier des marqueurs** de la maladie en utilisant un modèle murin. Pour ce faire, j'ai dû mettre en place un modèle d'infection de la maladie de Lyme dans le laboratoire. J'ai développé des méthodes de détection (ELISA et PCR) pour évaluer l'infectiosité des souches de *Borrelia* en notre possession.

Puis à l'aide de la stratégie InMAD (*in vivo* Microbial Antigen Discovery)<sup>296</sup>, qui consiste en une analyse de la réponse immunitaire d'animaux immunisés avec le sérum d'animaux infectés, j'ai procédé à l'identification d'antigènes circulants.

Dans le même temps, nous avons **développé des tests immunologiques sensibles et spécifiques** contre 4 marqueurs décrits comme des antigènes immunodominants se retrouvant à différents stades de la maladie. Cela a impliqué tout d'abord la production d'anticorps monoclonaux (AcMs) spécifiques contre chacune de ces 4 cibles. Deux stratégies ont été menées pour l'immunisation :

- Une stratégie d'immunisation avec des protéines recombinantes pour les antigènes conservés entre les espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. C'est ainsi que des anticorps monoclonaux ont été produits contre les deux protéines : FlaB (Flagellin B) et OspA (Outer surface protein A).
- Une stratégie d'immunisation peptidique pour les cibles protéiques présentant une grande variabilité entre les différentes espèces et souches de *Borrelia*. Ainsi des anticorps ont été produits contre un peptide C-terminal d'OspC (Outer surface protein C) et un peptide de VlsE (variable major protein (VMP)-like sequence E lipoprotein).

Après production, caractérisation et sélection des meilleurs AcMs, nous avons mis en place différentes méthodes de dosages ELISA et western blot. Ces méthodes ont ensuite été appliquées à la détection des antigènes dans les tissus et le sérum de souris infectées. Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique intitulé « Detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in tissues and plasma during early infection in a mouse model » publié en septembre 2021 dans le journal Scientific Report.

Dans un dernier temps, nous avons utilisé **les outils d'immunodiagnostic développés pour rechercher dans des sérums de patients séropositifs la présence de l'antigène OspC**. Ces résultats sont présentés et discutés dans le chapitre 3 de mon manuscrit de thèse.

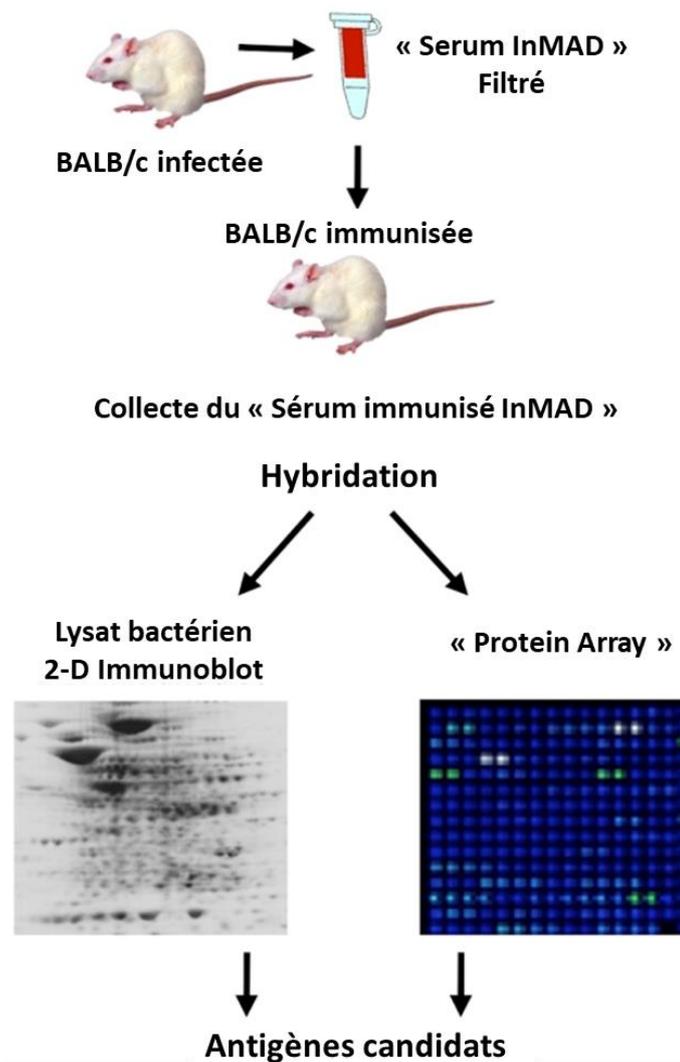
# ***CHAPITRE I :***

## ***Recherche et identification d'antigènes circulants***

## ***I. Introduction***

La première partie de la thèse porte sur la recherche et l'identification d'antigènes bactériens circulants lors d'une infection par *B. burgdoferi* s.l., pouvant servir de biomarqueur de la maladie de Lyme. Avant le développement d'un test diagnostique, il est en effet indispensable d'avoir identifié un ou des biomarqueurs de la maladie dont la détection ou la mesure nous renseigneront sur des processus infectieux. Idéalement ces biomarqueurs devront présenter une spécificité et une sensibilité cliniques élevées, ne pas nécessiter de prélèvements invasifs et être faciles à mesurer.

Pour identifier de potentiels antigènes circulants, nous nous sommes basés sur la stratégie : InMAD pour *in vivo microbial antigen discovery*<sup>297</sup>. Cette technique s'appuie sur la réponse immunitaire humorale d'animaux immunisés pour identifier des antigènes microbiens circulants. La première étape consiste à produire du sérum « InMAD » correspondant à du sérum filtré provenant d'animaux infectés par la bactérie pathogène. Ce sérum contient de potentiels antigènes microbiens circulants, mais il est dépourvu de bactérie entière grâce à une étape de filtration (filtre 0,22 µm). Dans une deuxième étape, le sérum « InMAD » est mélangé à de l'adjuvant et utilisé pour immuniser d'autres animaux. Les animaux immunisés vont ainsi développer des anticorps contre les potentiels antigènes circulants ou débris bactériens présents dans le sérum « InMAD ». Dans une troisième étape, le sérum immun issu des animaux immunisés est collecté et utilisé pour réagir avec un lysat du pathogène par immunoblot. La réactivité des sérums immuns peut être évaluée par un western-blot classique (1D) ou un western-blot 2D pour une meilleure résolution. Les antigènes microbiens, dont les positions ont été localisées par immunoblot, sont *in fine* excisés à partir d'un gel SDS-PAGE dupliqué, puis identifiés par spectrométrie de masse. L'immunoréactivité des sérums immuns peut également être analysée par protein array, une technique sur puce à haut débit permettant de cribler 250 à 1740 protéines du pathogène<sup>298</sup> (figure 20).



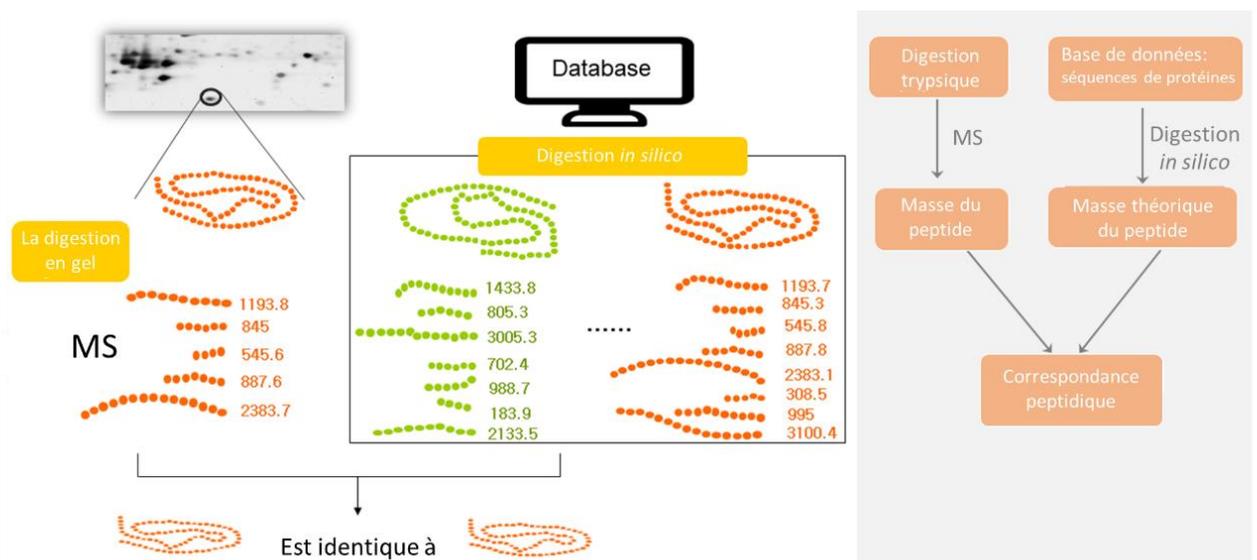
**Figure 20 : Principe de la stratégie InMAD.**

<sup>297</sup>(Adapté d'après Nuti *et al.* (2011)). Les sérums « InMAD » sont récoltés à partir de souris infectées, filtrés puis mélangés à un adjuvant pour immuniser des souris syngéniques. Les sérums des souris immunisées sont récoltés et utilisés pour détecter des protéines d'intérêt contenu dans un lysat bactérien par western blot ou avec des protéines bactériennes par une technique de protéomique sur puce.

Dans le cas de notre étude pour l'identification et la caractérisation des marqueurs, nous avons utilisé la technique du « Peptide mass fingerprinting » (PMF) ou empreinte de masse peptidique. Il s'agit d'une technique d'identification des protéines basée sur la comparaison de la carte peptidique d'une protéine d'intérêt obtenue expérimentalement avec celles de protéines digérées *in silico*. La masse des peptides issus des protéines digérées est déterminée par spectrométrie de masse, ici par MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption -time of flight*). En MALDI-TOF les ions de masse et de charge différentes, soumis à un champ électrique, se déplacent et la distance parcourue en un temps donné dépend du rapport de masse sur charge (m/z).

Dans le cadre de nos travaux, après séparation des protéines par électrophorèse sur gel et digestion par une enzyme spécifique, ici la trypsine, les masses expérimentales des peptides ont été comparées avec les masses théoriques des protéines de la base de données Swiss-Prot à l'aide du logiciel MS-Fit (figure 21). L'approche statistique utilisée lors de l'analyse des résultats est le score de MOWSE<sup>299</sup>, basé sur la fréquence d'apparition des masses de peptides dans la banque de protéines. Pour une identification significative, le score MOWSE devra être élevé<sup>301</sup> et une correspondance de 5 peptides minimum sera nécessaire<sup>302</sup>. Les résultats nous donnent également accès au pourcentage de recouvrement de la séquence protéique. Il s'agit du pourcentage de la protéine théorique qui est recouverte par les masses de peptides expérimentales<sup>301</sup>. Bien qu'il dépend de la taille de la protéine, le recouvrement de séquence doit être d'au moins de 20%<sup>303,304</sup>.

L'empreinte obtenue par la technique PMF est donc d'une grande spécificité et permet d'identifier la protéine à partir de cette seule information.



**Figure 21 : Principe du « Peptide mass fingerprinting » (PMF).**

<sup>305</sup>(Adapté d'après Creative proteomics). Les protéines sont d'abord séparées par électrophorèse sur gel (ici un gel 2D). La protéine d'intérêt est ensuite digérée par la trypsine. Les peptides ainsi obtenus sont analysés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), une liste de pics correspondant aux poids moléculaires des différents fragments est produite. Afin d'identifier la protéine, une comparaison est réalisée entre la liste de pics obtenue par spectrométrie de masse et la liste de pics théoriques obtenue à partir d'un logiciel (MS-Fit) qui effectue une digestion *in silico* sur les protéines de la base de données avec la même enzyme.

Afin de prendre en compte la diversité des espèces de *Borrelia* retrouvées en Europe, associées en partie à différentes manifestations cliniques, nous avons entrepris d'appliquer la stratégie InMAD pour les 3 espèces majoritaires de *Borrelia* responsable de la maladie de Lyme en Europe : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*<sup>53</sup>, représentées par les souches suivantes :

- *B. afzelii* BO23 ATCC® 51992™
- *B. burgdorferi* s.s. B31 ATCC® 35210™
- *B. bavariensis* PBi ATCC® BAA-2496™

Ces souches proviennent de l'américain type culture collection (ATCC). Seule la souche *B. burgdorferi* s.s. B31 a été caractérisée par séquençage du génome chez ATCC. De plus, l'infectivité de ces 3 souches dans les souris n'a pas été confirmée par ATCC.

**Tableau 5 : Origines et infectivités des différentes souches de *B. burgdorferi* s.l. utilisées dans cette étude.**

Nom	Espèce	Origine	Isolement	Tropisme préférentiel
BO23	<i>B. afzelii</i>	Allemagne	Humain (Biospsie de peau)	Peau
B31	<i>B. burgdorferi</i>	Amérique du Nord	l. scapularis	Articulation
PBi	<i>B. bavariensis</i>	Allemagne	Humain (LCR)	Système nerveux

Chaque espèce est associée à un tropisme préférentiel et différentiel<sup>306</sup>. La souche *B. burgdorferi* s.s. B31 causerait chez l'homme plutôt des atteintes articulaires, la souche *B. afzelii* BO23, isolée d'une biopsie de peau d'un patient infecté, des lésions cutanées et *B. bavariensis* PBi, isolée d'un liquide céphalo-rachidien, des atteintes neurologiques<sup>307</sup> (tableau 5).

D'autre part, afin de prendre en compte l'expression différentielle des antigènes de *Borrelia* au cours de l'infection, nous avons entrepris de rechercher et d'identifier des antigènes présents à 3 différents temps d'infection à 5, 15, et à 40 jours correspondants respectivement aux stades précoce, disséminé et disséminé-tardif chez la souris<sup>306</sup>.

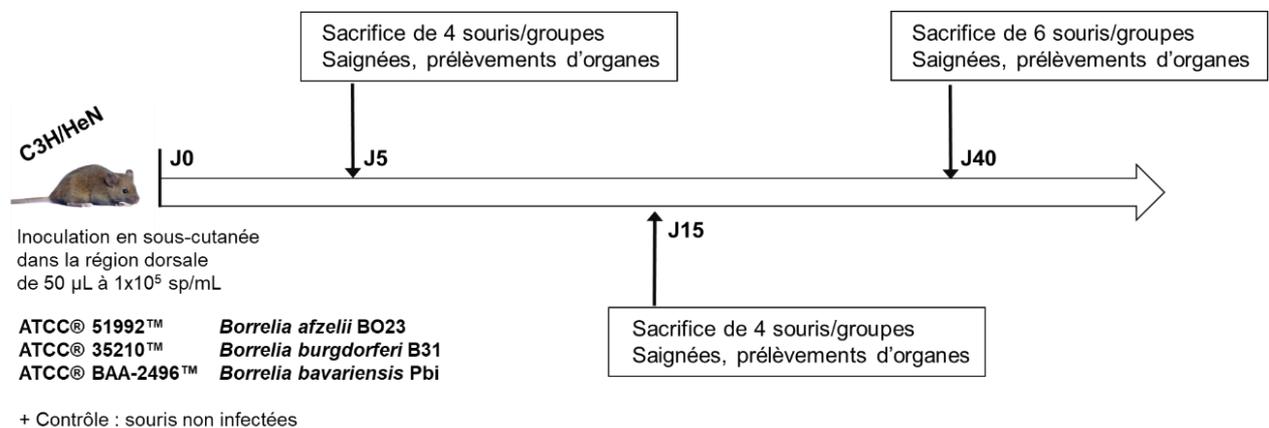
## II. Résultats & discussion

### 1. Modèle murin d'infection : lignée immunocompétente C3H/HeN

À ce jour il n'existe pas de modèle animal standardisé pour l'étude de la maladie de Lyme. Il existe une forte disparité entre les études, notamment en termes d'espèces bactériennes utilisées, de mode d'infection et de quantité de l'inoculum. Cette hétérogénéité se retrouve aussi dans les résultats (ex. dissémination du pathogène)<sup>183</sup>.

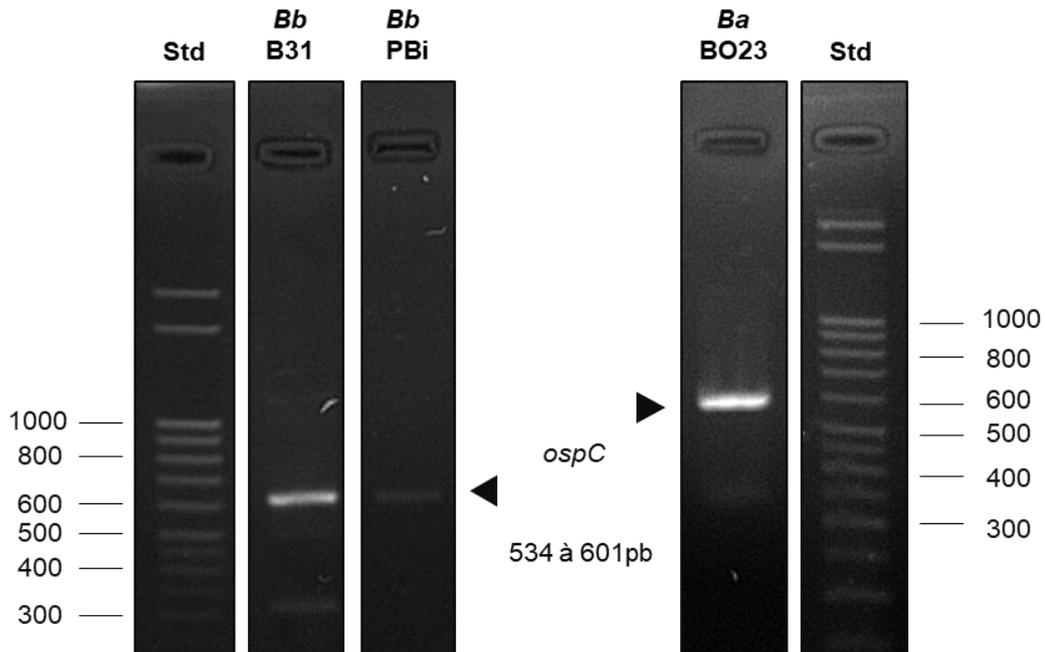
Cependant, le modèle le plus couramment utilisé est le modèle murin avec la lignée C3H/HeN<sup>179</sup>. Ces souris ont été décrites comme sensibles à l'infection, elles développent notamment des atteintes articulaires, des atteintes cardiaques sévères<sup>308</sup>, mais ne développent pas d'érythème migrant ni d'acrodermatite<sup>179</sup>. Les souris C3H/HeN développent également une bonne réponse immunitaire contre *Bbsl* avec des titres en anticorps élevés<sup>183</sup>.

Pour comparer nos expérimentations aux études antérieures publiées, nous avons décidé d'utiliser le modèle murin C3H/HeN selon un protocole d'infection et de prélèvement décrit dans la figure 22.



**Figure 22 : Protocole d'infection des souris C3H/HeN avec les trois espèces majoritaires retrouvées en Europe de *B. burgdorferi* sensu lato.**

Avant d'inoculer les souris, nous avons vérifié que les souches de *B. burgdorferi* s.l. utilisées possédaient bien le gène codant pour la protéine OspC, un facteur de virulence majeur<sup>20</sup>. En effet, le plasmide cp26, porteur du gène OspC, peut être perdu lors des repiquages successifs *in vitro*<sup>309,310</sup>. De plus, une baisse d'expression d'OspC peut être associée à une perte de virulence chez la souris<sup>311</sup>.



**Figure 23 : Présence du gène *ospC* dans les différentes souches de *Borrelia burgdorferi* s.l.**

Les produits des PCR ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 2% avec du bromure d'éthidium et visualisés avec une E-Box (Vilber). Std : Marqueurs de longueur de l'ADN, en paire de bases (pb).

Comme montré dans la figure 23, un amplicon d'environ 600 paires de bases correspondant à l'amplification spécifique d'une portion du gène OspC est bien obtenu pour les 3 souches utilisées. Néanmoins, cela ne garantit pas que le niveau d'expression d'OspC obtenu *in vivo* avec ces souches soit suffisant pour l'établissement de l'infection. De plus, de nombreux autres gènes interviennent dans le processus d'infection et il nous est impossible de vérifier pour tous leur fonctionnalité<sup>312</sup>.

## 1.1 Suivi de l'infection

Avant de rechercher de potentiels biomarqueurs par la stratégie « InMAD », il était important de vérifier que les souris C3H/HeN inoculées avec les différentes souches de *Borrelia* étaient bien infectées.

Pour cela, nous avons procédé à l'observation de l'ensemble des signes cliniques. D'après certaines équipes les souris pourraient présenter un gonflement des articulations de la patte<sup>313</sup> pouvant conduire à la boiterie<sup>183,314</sup>. De plus, les souris devaient présenter une réponse immunitaire polyclonale spécifique contre l'agent infectieux avec une augmentation du titre en immunoglobulines au cours du temps. D'autre part, le pathogène devait pouvoir être détecté dans différents tissus, au site d'inoculation quelques jours après l'infection et à un site distant du site d'inoculation dans les phases plus tardives, comme par exemple au niveau de l'oreille de la souris entre 15 à 40 jours après l'inoculation<sup>314</sup>. Cela permet de vérifier que le pathogène peut survivre chez l'hôte et qu'il est capable de se disséminer.

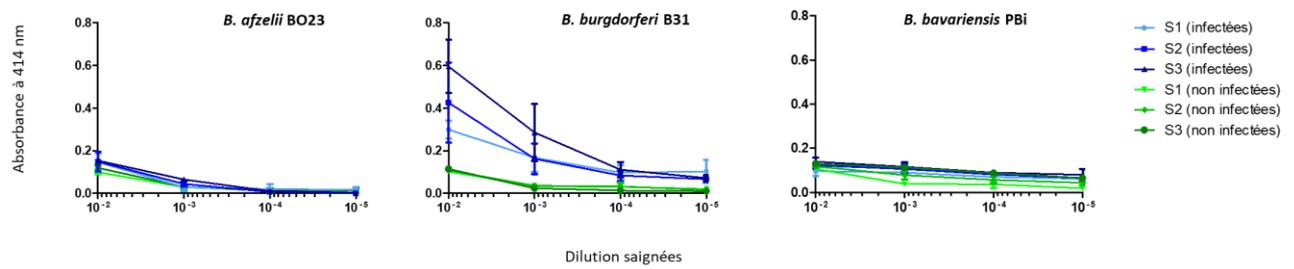
### 1.1.1 Suivi des signes cliniques des souris C3H/HeN

Les souris C3H/HeN infectées n'ont présenté aucun signe clinique au cours de l'infection. L'aspect du pelage et de leur dos étaient normaux. Les souris étaient très actives (avec la présence d'un nid). De plus, elles prenaient du poids au cours du temps, rentrant ainsi dans les standards de la courbe de croissance<sup>315</sup>. De plus, aucune inflammation au niveau des articulations n'a été observée.

### 1.1.2 Suivi des réponses polyclonales des souris infectées

Afin de suivre les réponses en anticorps des souris infectées, leurs saignées prélevées à J5, J15 et J40 pi ont été testées par ELISA et western-blot (cf. Matériels et méthodes).

Comme montré dans la figure 24, à la suite de l'infection des souris par voie sous-cutanée, aucune réponse immunitaire polyclonale n'est détectée par ELISA dans les souris inoculées avec les souches de *Bbsl* BO23 et *Bbav* PBi. Une réponse très faible est détectée avec la souche *Bbss* B31 et celle-ci augmente très peu au cours du temps.

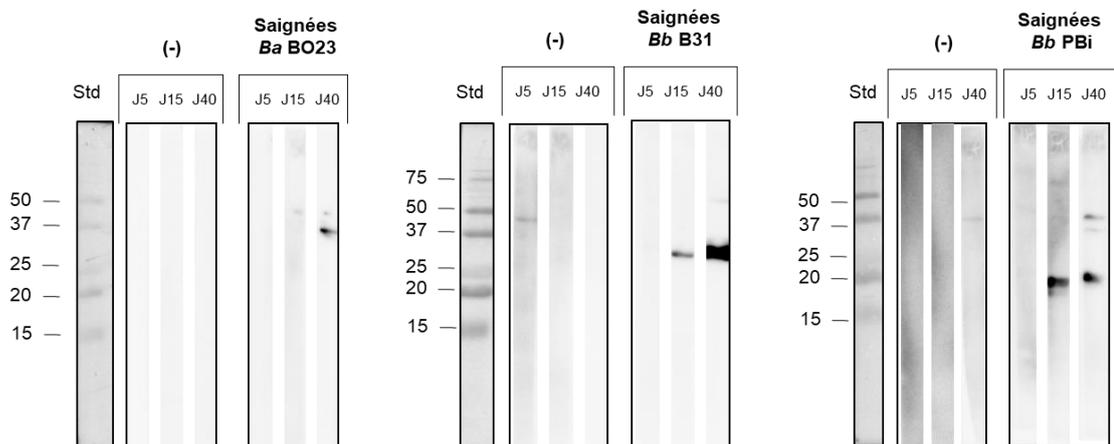


**Figure 24 : Réponses polyclonales des souris infectées avec différentes souches de *Borreliella* par ELISA.**

Les saignées des 6 souris ont été testées en ELISA sur des plaques revêtues à  $5 \times 10^5$  sp/puits de la souche utilisée lors de l'infection. Les données représentées ici correspondent à la moyenne des 4 à 6 souris par groupe. S1: 5j post-inoculation (pi), S2: 15j pi et S3: 40j pi. L'absorbance à 414 nm a été mesurée après 30min de réaction.

Les tests des saignées par western-blot corrélient avec les résultats d'ELISA. Seulement une ou deux bandes entre 20 et 40 kDa sont visibles selon les souches (figure 25). Les souches *Bbss* B31 et *Bbav* PBi semblent avoir déclenchées une faible réponse immunitaire spécifique qui augmente au cours du temps. Cette réponse semble être dirigée principalement contre un antigène autour de 30 kDa pour *Bbss* B31 et à 20 et 37kDa pour *Bbav* PBi (à confirmer).

Les souris n'ont donc pas développé de bonne réponse immunitaire humorale, suggérant que les bactéries ne se sont pas ou peu maintenues et répliquées dans l'hôte.



**Figure 25 : Réponses polyclonales des souris infectées avec différentes souches de *Borreliella* par western blot.**

Les protéines dénaturées, de la souche de *Borreliella* utilisée lors de l'infection, sont séparées sur gel de polyacrylamide. Après transfert sur membrane, les pools de plasmas (4 à 6 souris infectées par groupes) à 5j pi, à 15j pi et 40j pi, réagissent avec les protéines présentes sur les membranes. Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa.

### 1.1.3 Détection de l'ADN de *Borrelia burgdorferi* dans les tissus

Afin de vérifier la présence de *Borrelia* dans les tissus, nous avons développé une méthode de quantification spécifique de l'ADN de *Borrelia* par qPCR (cf. Matériels et méthodes).

Cette méthode validée sur des échantillons de peau de souris auxquels ont été ajoutées des quantités connues d'ADN de *Borrelia*, atteint une limite de détection de 2 bactéries par tube, soit environ 40 bactéries par mg de tissus.

La détection de l'ADN de *Borrelia* dans les biopsies de peau au point d'inoculation se sont avérées négatives à 5 jours post-inoculation (pi) pour la souche *B. afzelii* BO23 et la souche *B. burgdorferi* s.s. B31. Seules les souris infectées avec *B. bavariensis* PBi étaient positives en qPCR à 5j pi avec un titre estimé en moyenne à 4107 spirochètes/ mg de peau (4/4 animaux positifs, avec  $5122 \pm 10044$  spirochètes /  $\mu\text{g}$  ADN soit  $4107 \pm 8027$  /mg de tissus).

À 15 jours et 40 jours pi, aucun des tissus testés (oreilles, peaux au point d'inoculation, articulations, vessies, cœurs) ne s'est avéré positif pour l'ADN de *Borrelia*. Ces résultats permettent de confirmer que les souches utilisées sont incapables d'établir une infection précoce et de se disséminer dans des souris C3H/HeN immunocompétentes.

## 1.2 Conclusion du modèle murin d'infection C3H/HeN

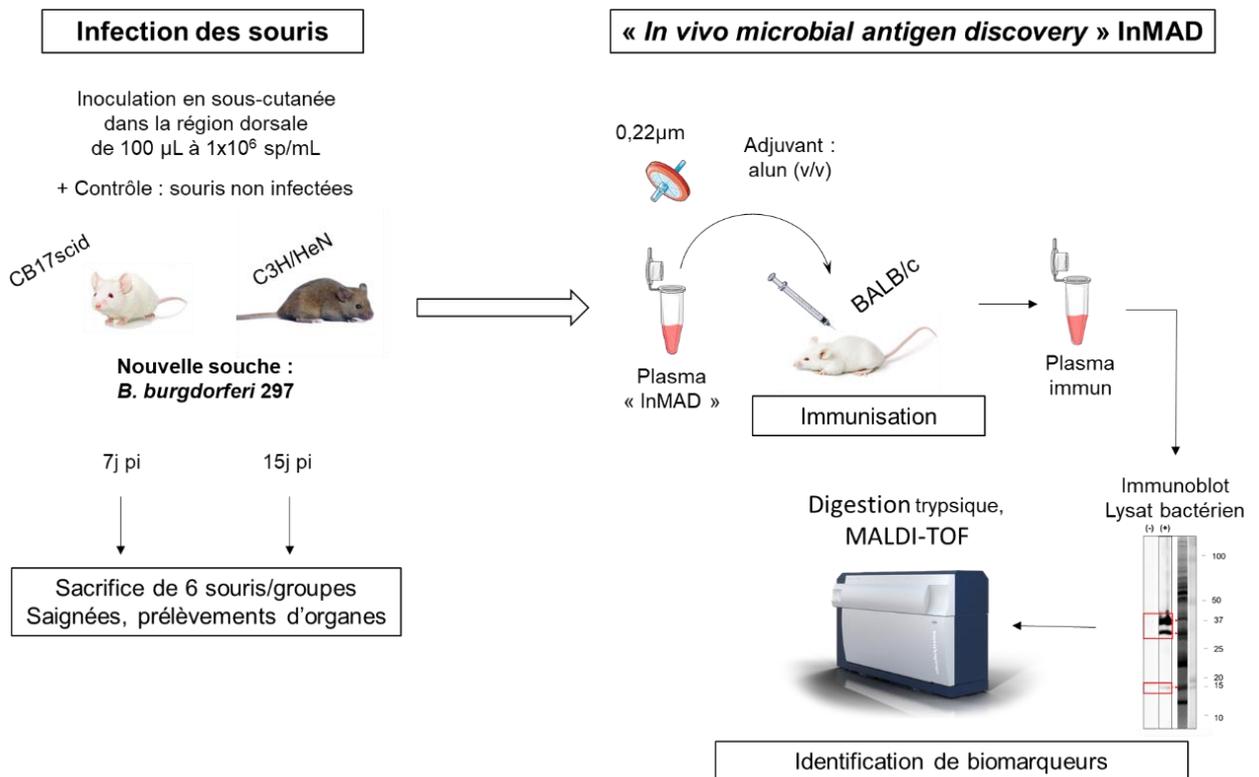
Ces résultats suggèrent que les souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato commercialisées par ATCC sont incapables de se répliquer et de se disséminer dans les souris immunocompétentes, hormis la *B. bavariensis* PBi qui semble se répliquer transitoirement au site d'inoculation. En raison du manque d'infectiosité des souches de *Borrelia*, nous n'avons pas procédé à l'étape d'immunisation avec ces « sérums InMAD ». En effet, même si on considère que les souris étaient très faiblement infectées, nous avons supposé que les plasmas InMAD contenaient des quantités trop faibles d'antigènes circulants pour déclencher une réponse immune. Par conséquent, il n'aurait pas été possible d'identifier une ou des protéines d'intérêts.

## **2. Recherche et identification des antigènes circulants de *B. burgdorferi* s.s. 297 sur un modèle murin immunodéprimé et immunocompétent**

Étant donné l'échec des premiers essais d'infection, nous avons décidé de mettre en place un nouveau modèle murin d'infection en utilisant une nouvelle souche de *Bbss* disponible sur le catalogue d'ATCC, la souche ATCC® 53899™ *B. burgdorferi* s.s. 297. Il s'agit d'une souche issue d'un isolat de patient atteint d'une neuroborréliose de Lyme<sup>316</sup>. Il a été montré que chez la souris, la souche 297 se dissémine très rapidement. En effet, dans un modèle murin immunocompétent C3H/HeN, cette souche a été retrouvée dans plusieurs organes (cœur, vessie, articulation, oreilles, peau) et ce dès le 15<sup>ème</sup> jour post-inoculation<sup>313</sup>.

Pour favoriser l'infection et obtenir un titre bactérien plus important dans les tissus, nous avons décidé d'utiliser en parallèle du modèle murin C3H/HeN, un modèle d'infection de souris immunodéprimées (souris CB17scid). L'utilisation d'animaux immunodéprimés permet d'obtenir une charge bactérienne plus élevée et persistante<sup>317</sup> dans la circulation sanguine<sup>318,182</sup> comparé à des animaux immunocompétents. Dans le cas des souris CB17scid, ceci est lié à l'absence de cellules T et B matures ainsi qu'à une activité moindre du complément<sup>319</sup>.

Ainsi, un nouveau protocole a été mis en place afin d'identifier de potentiels antigènes circulants (figure 26). Il consiste en l'infection de souris immunocompétentes C3H/HeN et immunodéprimées CB17scid par injection par voie sous-cutanée de la souche *B. burgdorferi* s.s. 297 dans la région dorsale thoracique suivie dans une deuxième partie par l'immunisation de souris BALB/c avec le plasma « InMAD » collecté.



**Figure 26 : Protocole d’infection et d’identification des antigènes circulants pour la souche *B. burgdorferi* 297.**

Les souris infectées sont sacrifiées à 7 jours pi et 15 jours pi. Les plasmas récoltés sont filtrés, dilués deux fois en PBS puis mélangés avec un adjuvant. Des souris BALB/c sont immunisées soit avec le plasma du groupe de souris infectées soit avec le plasma des souris non infectées, par voie intrapéritonéale. Les plasmas des souris immunisées sont ensuite analysés par western blot. L’identification des protéines est réalisée par la technique « PMF ».

## 2.1 Suivi de l’infection

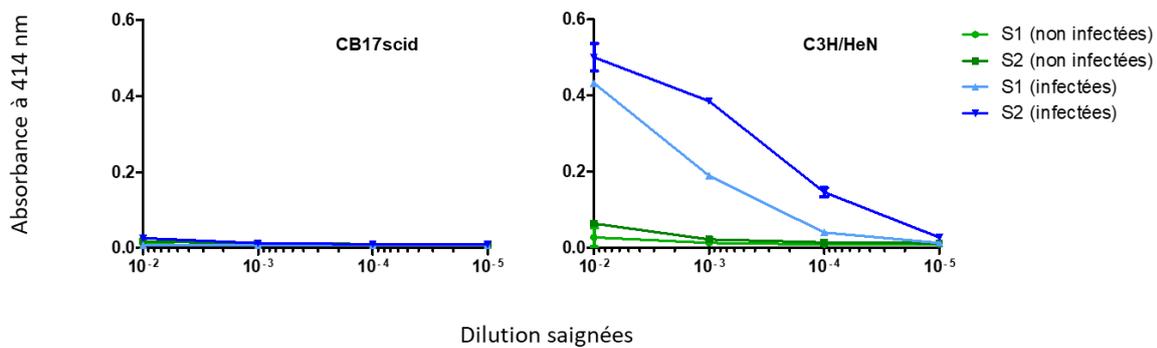
### 2.1.1 Suivi des signes cliniques des souris C3H/HeN

Nous avons tout d’abord vérifié l’état général des souris de type CB17scid et C3H/HeN. Afin de suivre l’état clinique des souris au cours de l’infection, les animaux ont été observés et pesés quotidiennement jusqu’à leur sacrifice. Contrairement aux souris de type C3H/HeN, les souris CB17scid ont présenté des signes cliniques, et ce dès le 3<sup>ème</sup> jour pi. Nous avons constaté une dégradation de l’apparence physique externe (dos voûté, poils ébouriffés) ainsi qu’une baisse d’activité générale avec une nidification moindre, montrant ainsi d’une dégradation de l’état général.

### 2.1.2 Réponses polyclonales des souris infectées

Afin de suivre les réponses en anticorps des souris infectées, leurs saignées prélevées à J7 et J15, ont été testées comme précédemment par ELISA et western-blot.

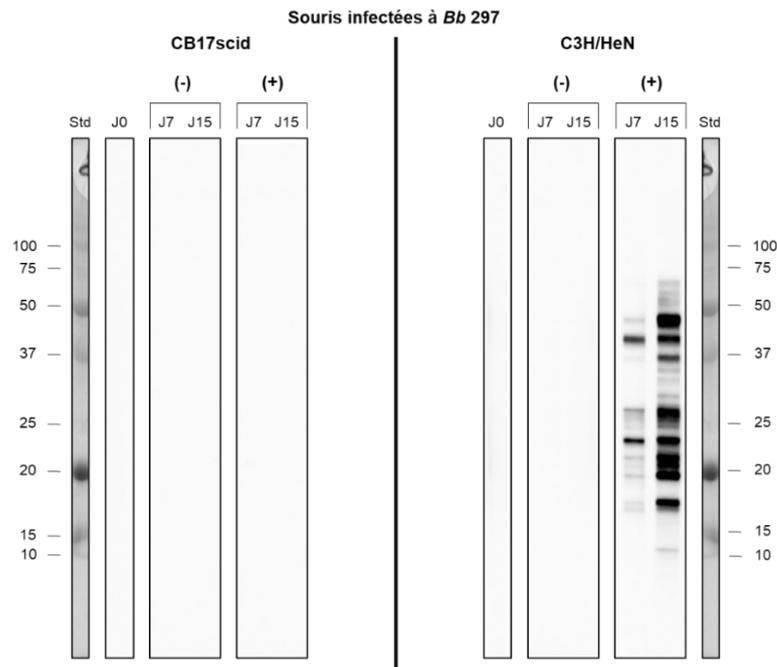
Chez les souris C3H/HeN inoculées avec *B. burgdorferi* s.s. 297 par voie sous-cutanée, des anticorps spécifiques de *Borrelia* ont été détectés avec une augmentation du titre entre le 7<sup>ème</sup> jour et le 15<sup>ème</sup> jour pi (figure 27). Toutes les souris testées (n=6) ont présenté un titre en anticorps homogène. En revanche, comme attendu, aucune réponse en anticorps spécifiques n'a été détectée chez les souris C3H/HeN non infectées et les souris SCID infectées ou non infectées.



**Figure 27 : Réponses polyclonales des souris CB17scid et C3H/HeN infectées *B. burgdorferi* s.s. 297 par ELISA.**

Les saignées ont été testées en ELISA sur des plaques revêtues de  $5 \times 10^5$  sp/puits de la souche *B. burgdorferi* 297. Les plasmas testés correspondent à un pool des 6 souris par groupes. S1 : 7j pi, S2 : 15j pi. Les courbes bleues et vertes correspondent respectivement aux réponses du groupe des souris infectées et du groupe contrôle (souris non infectées). L'absorbance à 414 nm a été mesurée après 30 min de réaction.

L'analyse par immunoblot des saignées corrèle avec les résultats de l'ELISA. Comme montré dans la figure 28, aucune bande n'est visible avec les plasmas pré-immuns des souris C3H/HeN infectées et les plasmas des souris SCID (infectées et non infectées) alors que de nombreuses bandes (plus de 10 bandes) sont révélées avec le plasma des souris C3H/HeN infectées. Par ailleurs, on observe clairement une augmentation de l'intensité des bandes entre le 7<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour pi. Les souris C3H/HeN inoculées avec la souche *B. burgdorferi* s.s. 297 présentent donc une bonne réponse polyclonale spécifique contrairement aux souris précédemment infectées avec les souches *B. afzelii* BO23, *B. burgdorferi* s.s. B31 et *B. bavariensis* PBI.

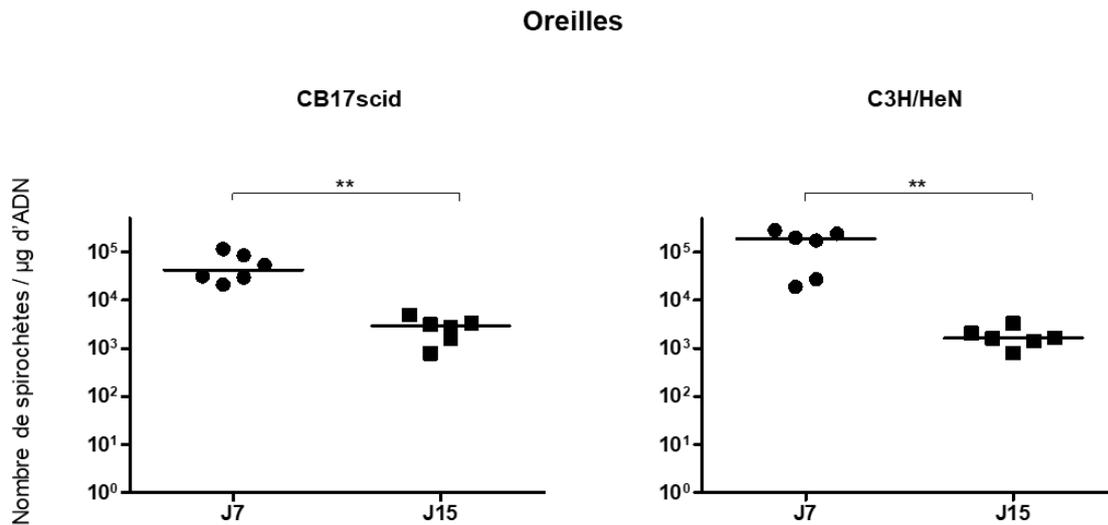


**Figure 28 : Réponses polyclonales des souris CB17scid et C3H/HeN infectées *B. burgdorferi* s.s. 297 par western blot.**

Les protéines dénaturées de *B. burgdorferi* s.s. 297 sont séparées sur gel de polyacrylamide. Après transfert sur membrane, les protéines sont exposées à différents pools de plasmas (6 souris par groupe) : J0 (plasma avant infection), J7 (plasma à 7 jours pi) et J15 (plasma à 15 jours pi). (+) correspondent aux souris infectées et (-) correspondent aux groupes contrôles (souris non infectées). Std correspond au marqueur de poids moléculaire et la taille des protéines est indiquée sur le côté en kDa.

## 2.2 Détection de l'ADN de *Borrelia* dans les tissus

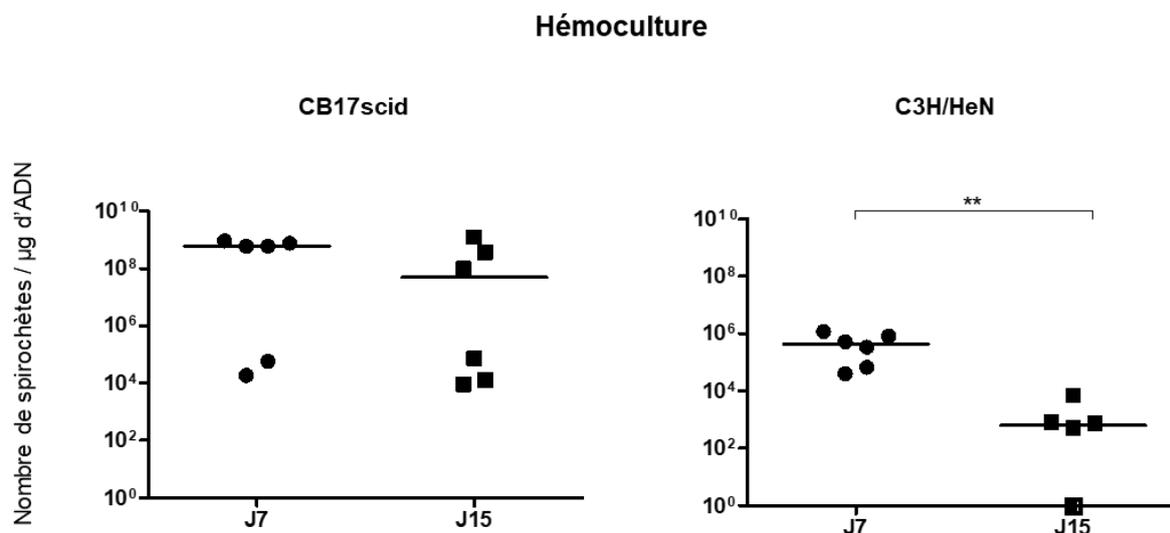
Pour vérifier que *B. burgdorferi* s.s. 297 a été capable de se disséminer dans l'hôte, nous avons recherché par qPCR la présence d'ADN bactérien dans les oreilles. À 7 jours pi, 100% des oreilles des souris infectées étaient positives pour l'ADN de *B. burgdorferi* s.s. 297 (6/6 pour les souris CB17scid et 6/6 pour les C3H/HeN) avec une quantité moyenne de spirochètes estimée à  $5,6 \times 10^4 \pm 3,8 \times 10^4$  et  $16 \times 10^4 \pm 11 \times 10^4$  spirochètes/ $\mu$ g d'ADN pour les souris CB17scid et C3H/HeN respectivement (soit  $6,02 \times 10^4 \pm 3,55 \times 10^4$  spirochètes/mg de tissus pour les CB17scid et  $24 \times 10^4 \pm 20 \times 10^4$  spirochètes/mg de tissus pour les C3H/HeN). À 15 jours pi, toutes les oreilles des souris infectées sont également positives pour l'ADN de *Borrelia*, avec cependant un niveau de spirochètes significativement inférieur à celui mesuré à 7 jours pi ( $p$ -value=0,0022) que ce soit pour les souris CB17scid (diminution d'un facteur 20 environ) que pour les souris C3H/HeN (diminution d'un facteur 90 environ). La charge bactérienne dans les oreilles souris CB17scid et C3H/HeN est assez similaire, ce qui suggère une même capacité des bactéries à se disséminer, au moins jusqu'au jour 15 pi, malgré la présence d'une réponse humorale spécifique chez les souris C3H/HeN (figure 29).



**Figure 29 : Quantification de *B. burgdorferi* s.s. 297 dans les oreilles de souris infectées.**

La quantité d'ADN de *Borrelia* a été estimée dans les tissus par qPCR en utilisant la méthode de la courbe standard (cf. Matériels et méthodes). Les barres représentent les médianes du nombre de spirochètes/ $\mu\text{g}$  d'ADN au temps donné (6 souris infectées par groupe). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le test non paramétrique U de Mann-Whitney \* $p < 0,05$ .

Nous avons également recherché la présence de *Borrelia* dans le sang. En microscopie à fond noir, nous n'avons pas constaté la présence de spirochètes. Pour permettre une détection plus sensible de *Borrelia* nous avons recherché la présence d'ADN de *Borrelia* après une étape d'hémoculture. Pour ce faire, nous avons mis en culture 30 $\mu\text{L}$  de sang de chaque souris durant 8 semaines dans du milieu BSK-II supplémenté d'antibiotiques puis nous avons procédé à une détection de l'ADN bactérien par qPCR (figure 30). Toutes les hémocultures à 7 jours pi ont été détectées positives en qPCR, 6/6 pour la lignée CB17scid et 6/6 pour la lignée C3H/HeN. A 15 jours pi, toutes les hémocultures des souris CB17scid ont été détectées positives à l'ADN de *Borrelia* (6/6) contrairement aux souris de type C3H/HeN (4/6). D'autre part, la charge bactérienne des hémocultures de souris CB17scid est restée similaire entre le 7<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour, alors qu'on observe une diminution significative pour les hémocultures des souris C3H/HeN ( $p\text{-value} = 0,0047$  \*\*). Par ailleurs, à 7 jours et 15 jours pi, la charge bactérienne dans les hémocultures est respectivement en moyenne 1000 et 70 000 fois plus élevée que celle des souris C3H/HeN.



**Figure 30 : Quantification de *B. burgdorferi* s.s. 297 après hémoculture.**

La quantité d'ADN de *Borrelia* a été estimée dans les tissus par qPCR en utilisant la méthode de la courbe standard (cf. Matériels et méthodes). Les barres représentent les médianes du nombre de spirochètes/ $\mu\text{g}$  d'ADN au temps donné (6 souris infectées par groupe). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le test non paramétrique U de Mann-Whitney \* $p < 0,05$ .

Ces résultats montrent que dans les deux modèles murins immunocompétents et immunodéficients, la souche *B. burgdorferi* s.s. 297 passe dans la circulation sanguine et qu'ils sont donc adaptés pour la recherche de marqueurs antigéniques circulants.

## 2.3 Identification d'antigènes circulants : analyse des plasmas immuns

### « InMAD »

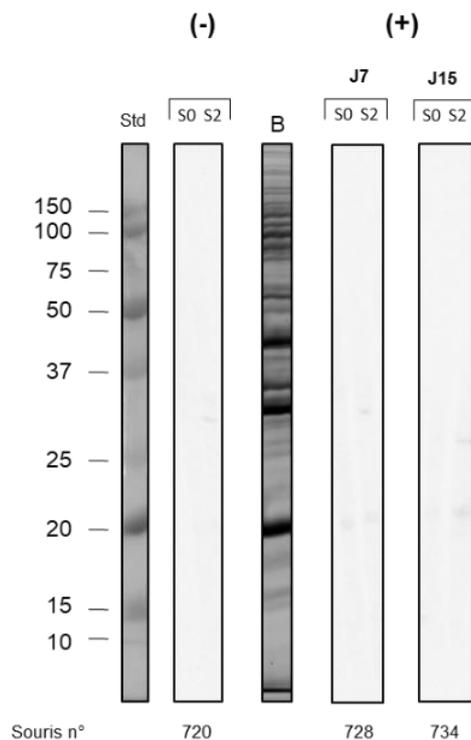
Les plasmas des souris C3H/HeN et CB17scid infectées ont été filtrés afin d'éliminer les bactéries, puis utilisés pour immuniser des souris BALB/c (cf. Matériels et méthodes). Le plasma issu de ces souris immunisées correspond au plasma immun « InMAD » et contient potentiellement des anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes bactériens circulants présents dans les plasmas des souris infectées.

#### 2.3.1 Mise en évidence de protéines immuno-réactives par western blot

Afin d'identifier les potentiels antigènes circulants de *B. burgdorferi* s.s. 297, les plasmas immuns « InMAD » ont été utilisés pour détecter des protéines de lysats de *Borrelia burgdorferi* s.s. 297. Pour ce faire, un lysat bactérien de la souche 297 a été séparé par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE, transféré sur une membrane de PVDF puis exposé au plasma des souris immunisées.

Avec les plasmas immuns « INMAD » de souris C3H/HeN, comme on peut voir dans la figure 31, aucune bande spécifique n'est détectée que se soit avec les plasmas de souris infectées ou contrôles (non infectées) à 7J pi et 15J pi. La stratégie InMAD n'a donc pas permis de mettre en évidence d'antigènes circulants dans le sang des souris C3H/HeN infectées malgré une spirochetémie avérée.

**Souris immunisées avec le plasma de souris C3H/HeN infectées à *Bb* 297**

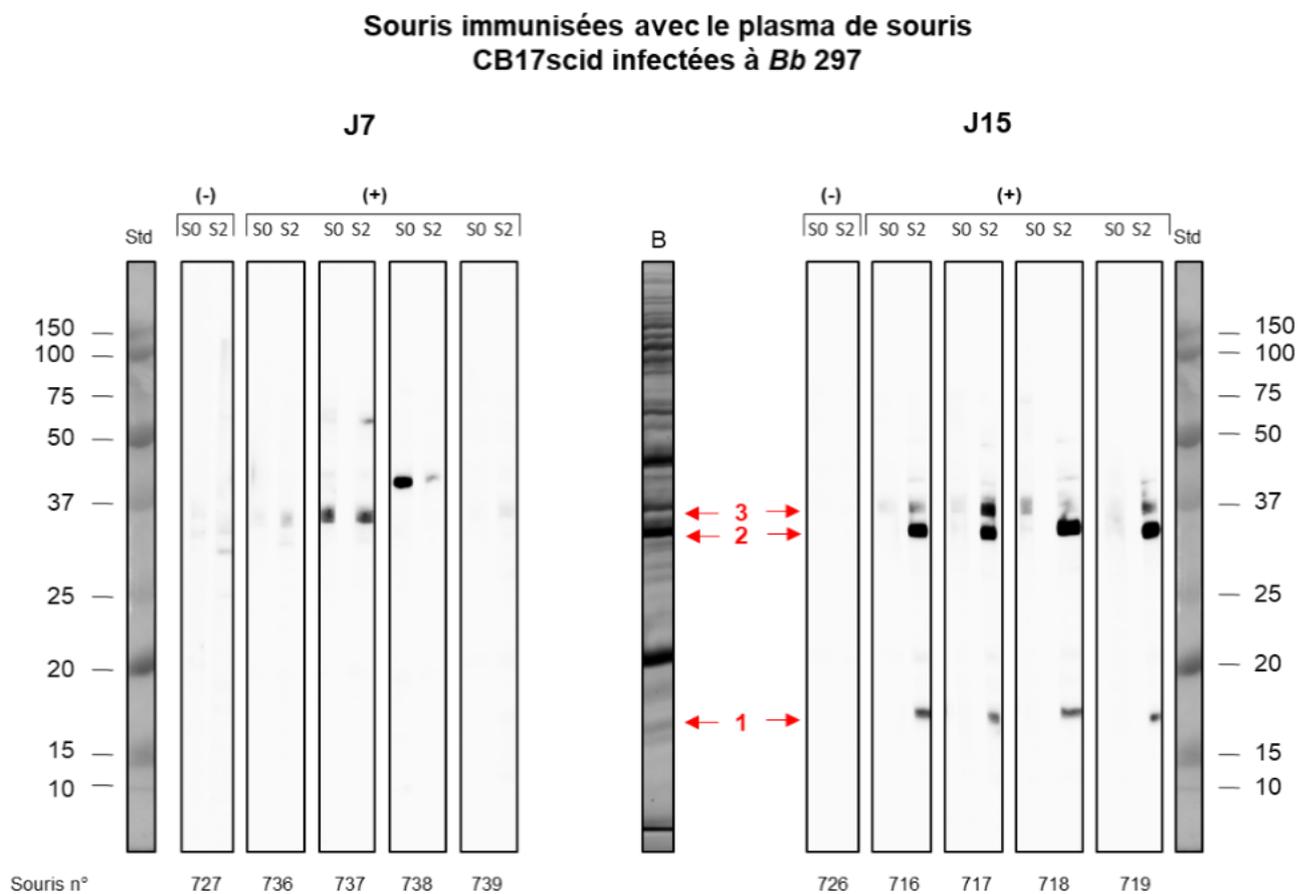


**Figure 31 : Analyse des plasmas de souris immunisées contre la souche *B. burgdorferi* s.s. 297 (C3H/HeN).**

Les protéines bactériennes dénaturées correspondant à  $2 \times 10^7$  spirochètes, sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Après transfert sur membrane de PVDF, elles sont ensuite détectées avec les plasmas de souris immunisées. B : gel avant transfert, coloré avec l'Imperial™ Protein Stain (coomassie R-250). J7 : souris immunisées avec le plasma « InMaD » 7 jours pi, J15 : immunisées avec plasma « InMaD » 15 jours pi. (-) correspond aux saignées immunisées avec le groupe contrôle (souris non infectées) et (+) correspond aux saignées immunisées avec le groupe infecté. Les résultats montrés sont représentatifs de ceux obtenus avec les 4 souris de chaque groupe.

Dans la figure 32 sont présentés les résultats d'analyse par western blot des plasmas immuns « InMAD » des souris CB17scid infectées. En ce qui concerne le groupe des souris 7 jours pi, aucune bande spécifique n'est détectée. Les seules bandes visibles correspondent à des réactions non spécifiques observées aussi bien avec sérum de souris immunisées que non immunisé ou sérum immun « InMAD » contrôle.

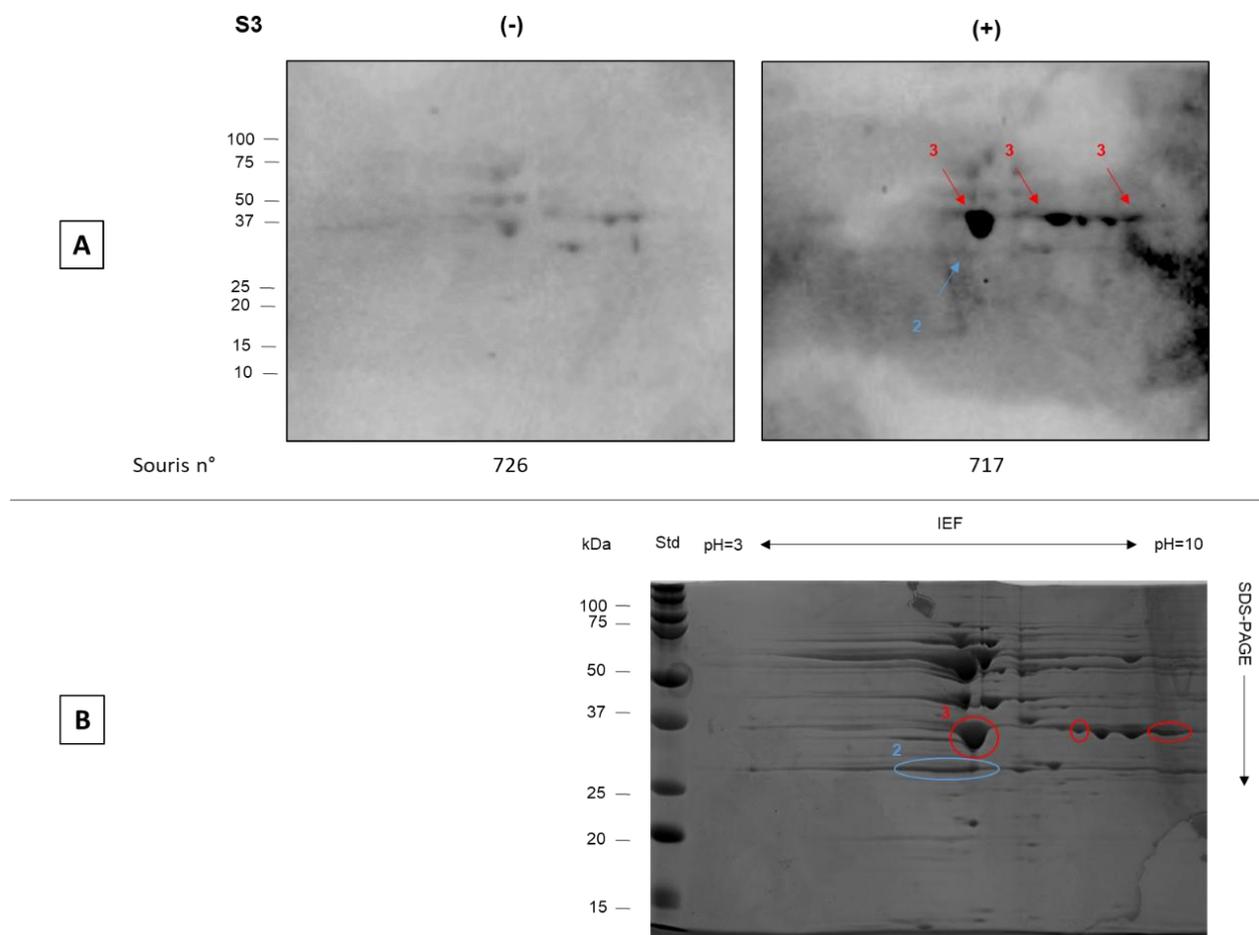
Concernant les plasmas immuns « InMAD » des souris CB17scid infectées à 15 jours pi, on remarque que les 4 souris du groupe donnent des résultats homogènes. Ces plasmas permettent de détecter principalement deux bandes non visibles avec les sérums contrôles (souris non immunisées ou immunisées avec du plasma sain). Ce qui montre que ces bandes sont spécifiques et correspondent à des antigènes circulants. Les antigènes détectés ont un poids moléculaire d'environ 17 kDa (bande 1) et 33 kDa (bande 2). Par ailleurs, nous observons une autre bande à environ 37 kDa (bande 3) d'intensité variable selon les souris immunisées. Cette bande est également détectée avec certaines saignées S0 mais avec une intensité plus faible qu'avec les saignées S2. Cet antigène pourrait donc être également un antigène circulant.



**Figure 32 : Analyse des plasmas de souris immunisées contre la souche *B. burgdorferi* 297 (CB17scid).**

Les protéines bactériennes dénaturées correspondant à  $2 \times 10^7$  spirochètes, sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Après transfert sur membrane de PVDF, elles sont ensuite détectées avec les plasmas de souris immunisées. B : gel avant transfert, coloré avec l'Imperial™ Protein Stain (coomassie R-250). J7 : souris immunisées avec le plasma « InMaD » 7 jours pi, J15 : immunisées avec plasma « InMaD » 15 jours pi. (-) correspond aux saignées immunisées avec le groupe contrôle (souris non infectées) et (+) correspond aux saignées immunisées avec le groupe infecté. Les bandes notées 1, 2, 3 sont les protéines correspondant aux antigènes reconnus spécifiquement. Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa. S : saignées.

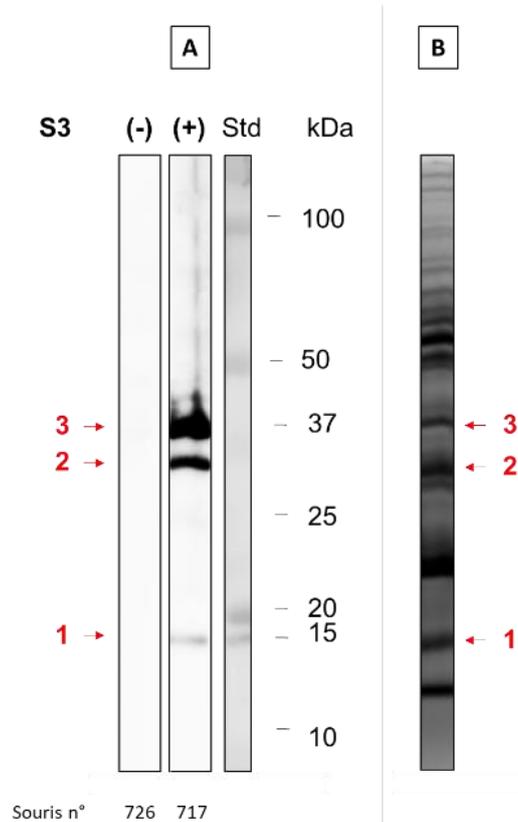
Une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée afin d'obtenir une meilleure résolution et séparation des protéines du lysat bactérien, suivie d'un immunoblot avec les plasmas immuns « InMAD » infectés et contrôle du groupe J15 pi (souris n°726 et n°717). Comme montré dans la figure 33, le plasma de souris immunisée avec le plasma « InMAD » contrôle (-) génère des réactions non spécifiques avec des protéines de *B. burgdorferi* s.s. 297. Avec le plasma immun « InMAD » (+), nous observons que les tâches (ou spots) notées 3 (d'environ 37 kDa) sont clairement plus intenses comparé à l'immunoblot du contrôle négatif, de même que pour la bande 2 (d'environ 31 kDa) mais dans une moindre mesure. Ces spots correspondent donc à de potentiels antigènes circulants.



**Figure 33 : Immunoblot bidimensionnel pour identifier les protéines de *B. burgdorferi* s.s. 297 reconnues par les sérums immuns InMAD à 15j pi.**

(A) Les protéines bactériennes séparées par électrophorèse 2D sont transférées sur membrane de PVDF, elles sont ensuite détectées avec les plasmas de souris immunisées. (-) correspond à la saignée n°3 de la souris n°726, après immunisation avec le groupe contrôle (souris non infectées) et (+) correspond à la saignée n°3 de la souris n°717 immunisée avec le groupe infecté. (B) Électrophorèse bidimensionnelle colorée avec l'Imperial™ Protein Stain (triplicata des gels hybridés). Ce gel est utilisé pour le prélèvement des spots spécifiques pour l'analyse par spectrométrie de masse. Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa.

Il est important de noter que l'analyse western-blot 2D, n'a pas permis pas de mettre en évidence l'antigène à environ 17 kDa détecté précédemment. Cette bande a donc été extraite après analyse par western-blot 1D, comme montré dans la figure 34.



**Figure 34 : Immunoblot sur gel électrophorèse 1D pour identifier les protéines de *B. burgdorferi* s.s. 297 reconnues par les sérums immuns InMAD à 15j pi.**

(A) Les protéines bactériennes séparées par SDS-PAGE sont transférées sur membrane de PVDF, elles sont ensuite détectées avec les plasmas de souris immunisées. (-) correspond à la saignée n°3 de la souris n°726, après immunisation avec le groupe contrôle (souris non infectées) et (+) correspond à la saignée n°3 de la souris n°717 immunisée avec le groupe infecté. (B) Le gel SDS-PAGE est coloré avec l'Imperial™ Protein Stain, il s'agit d'une extrémité du gel transféré. Ce gel est utilisé pour le prélèvement des bandes spécifiques pour l'analyse par spectrométrie de masse. Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa.

Au final, l'analyse western blot 1D et 2D, nous a permis de révéler plusieurs bandes et spots d'intérêts. Les tailles de ces protéines d'intérêts déterminées à l'aide du logiciel Image lab sont d'environ :

- (1) 15 kDa pour la bande 1
- (2) 30 kDa pour la bande et le spot 2
- (3) 37 kDa pour la bande et le spot 3

Les protéines correspondantes à ces bandes et spots immunoréactifs ont été extraites des gels SDS-PAGE pour être identifiées par spectrométrie de masse.

### 2.3.2 Identification des antigènes circulants par spectrométrie de masse

Les protéines immunoréactives (figure 33 et figure 34) ont été excisées à partir des gels et analysées par la stratégie PMF en utilisant l'analyse MALDI-TOF<sup>320</sup>.

Les spectres de masse (MS) résultant de la digestion des protéines extraites des spots et bandes d'intérêts ont été analysés par le logiciel FlexAnalysis. Après soustraction des pics correspondant à l'autolyse de la trypsine et de possibles contaminants (kératines humaines), les 15 pics les plus intenses ont été comparés aux peptides de chaque protéine de la base de données spécifique de *Borrelia burgdorferi* à l'aide du logiciel MS-FIT (585 protéines référencées sur Swiss-Prot vérifiées et annotées).

Finalement, 5 protéines ont été identifiées (tableau 6), avec pour chacune un minimum de 5 peptides et un score statistiquement significatif.

#### Tableau 6 : Identification des protéines par analyse MALDI-TOF.

Les bandes correspondantes ont été analysées d'après les gels en figure 33 et figure 34. La bande n°2 correspond à un mélange de 3 protéines de tailles similaires. La couverture en peptides pour chaque protéine est donnée ainsi que le MOWSE score (p-value < 0.05).

Bande n°	Nom de la protéine	Masse moléculaire (Da)	N° accession	Recouvrement (%)	MOWSE Score
1	Protéine ribosomique 30S S9	15417	O51313	41,9	61743
2	Protéine de surface externe B (OspB)	31733	P17739	20,6	362200
2	Protéine ribosomique 50S L2	30592	P94270	19,5	12780
2	Protéine de surface externe A (OspA)	29368	P0CL66	24,9	8807
3	Filament flagellaire	35766 / 41000	P11089	33,0	2,12e+6

Toutes les protéines et les peptides identifiés sans ambiguïtés sont répertoriés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Comparaison des séquences obtenues par MALDI-TOF et par digestion trypsique *in silico*.**

[M+H] <sup>+</sup> attendu	[M+H] <sup>+</sup> mesuré	Δmasse moléculaire (Da)	Séquence	Position	Clivages manqués	Modifications
<b>Protéine ribosomique 30S S9 (ID Uniprot: RS9_BORBU)</b>						
1163.6748	1164.6259	-0,951	(R) ALFKLDES NK (M)	92-101	1	
1483.7024	1483.6958	0,00663	(K) SNFSNVNLSMGTGR (R)	4-17	0	
1512.7331	1512.7329	1,66 <sup>e</sup> -4	(R) DFDSYIQLENLR (T)	40-51	0	
1639.9089	1639.7969	0,112	(K) SNFSNVNLSMGTGRR (K)	4-18	1	
2103.0637	2103.0505	0,0132	(K) YDLYINVYGGGISGQSGAIR (H)	67-86	0	
<b>OspB (ID Uniprot: RS9_BORBU)</b>						
1016.5417	1016.5623	-0.0205	(R) ATIDQVELK (G)	81-89	0	
1300.5861	1301.7423	-1.16	(K) NSIKLEGS L VGGK (T)	188-200	1	
1917.8648	1916.9236	0.941	(K) QDLPAVTEDSVSLFNGNK (I)	47-64	0	Gln->pyro-Glu
1932.8904	1933.9502	-1.06	(K) QDLPAVTEDSVSLFNGNK (I)	47-64	0	
1934.9026	1933.9502	0.952	(K) QDLPAVTEDSVSLFNGNK (I)	47-64	0	
2238.1054	2237.1296	0.976	(K) QDLPAVTEDSVSLFNGNK (I)	113-133	0	
<b>Protéine ribosomique 50S L2 (ID Uniprot: RL2_BORBU, RL2_BORBZ)</b>						
1163.5513	1163.5691	-0.0178	(R) VASIEYDPNR (S)	80-89	0	
1280.6442	1280.7031	-0.0589	(K) LSSGEMRLIFK (K)	178-188	1	
1476.8302	1476.8533	-0.0230	(K) IGNALPLENIPIGR (T)	128-141	0	
1917.8648	1916.9422	0.923	(R) SAGGYAMILASDGNVTVK (L)	159-177	0	
1932.8904	1932.9372	-0.0467	(R) SAGGYAMILASDGNVTVK (L)	159-177	0	Oxydation
<b>OspA (Uniprot: OSPA_BORBU)</b>						
1074.5273	1073.5586	0.969	(K) NNGSGVLEGVK (A)	70-80	0	
1280.6442	1280.6733	-0.0291	(K) GYVLEGTLTAEK (T)	164-175	0	
1476.8302	1475.8679	0.962	(K) TTLVKEGTVTL SK (N)	176-189	1	
1698.7501	1697.7977	0.952	(K) ENTITVQQYDSNGTK (L)	240-254	0	
1779.8817	1779.9375	-0.0558	(K) LTISDDLQQTLEVFK (E)	88-103	0	
<b>FlaB (Uniprot: FLA1_BORBU)</b>						
990.0000	990.5116	-0.512	(R) ANLGAFQNR (L)	265-273	0	
1541.0000	1541.7853	-0.785	(-) MIINHNTSAINASR (N)	1-14	0	
1683.0000	1682.7616	0.238	(K) ELAVQSGNGTYS DADR (G)	92-107	0	
1736.0000	1736.8497	-0.850	(R) MISDQRANLGAFQNR (L)	259-273	1	Oxydation
1789.0000	1788.9239	0.0761	(K) INTPASLSGSQASWTLR (V)	158-174	0	
1858.0000	1857.9552	0.0448	(R) GSIQIEIEQLTDEINR (I)	108-123	0	
1891.0000	1891.8789	-0.879	(R) IADQAQYNQMHL SNK (S)	124-139	0	
1920.0000	1919.9709	0.0291	(K) AINFIQTTEGNLNEVEK (V)	69-85	0	

À partir de la bande (1) comprise entre 15 et 17 kDa une seule protéine a été identifiée avec un score élevé. Cette protéine correspondrait à la protéine ribosomique 30S S9 de 15,4 kDa pour laquelle 5 peptides à la masse attendue ont été identifiés (tableau 6), dont 2 correspondent à une omission de coupures pour la trypsine. Le recouvrement de la séquence est de l'ordre de 41,9%.

À partir de la bande (2) comprise entre 29 et 31kDa trois protéines ont été identifiées. Il s'agit des protéines OspB, de la protéine ribosomique 50S et de la protéine OspA. Pour la protéine OspB, nous avons identifié 6 peptides, son recouvrement de séquence est de 20,6%. Concernant la protéine ribosomale 50S, 5 peptides ont été identifiés avec des masses observées proches de celles théoriques, le recouvrement de séquence est de 19,5%. Pour la protéine OspA, nous avons identifié 5 peptides, le recouvrement de séquence obtenue est de 24,9%, soit le meilleur parmi les 3 protéines identifiées de cette même bande. Pour ce qui concerne le spot (2) (figure 33) seule la protéine OspA a été identifiée. Dans ce cas 6 peptides ont été identifiés avec un recouvrement de l'ordre de 27,1%. Ce qui suggère que la protéine OspA pourrait être la seule protéine immuno-réactive de la bande 2.

Concernant la bande et le spot 3, une seule protéine a été identifiée. Il s'agit de la protéine du filament flagellaire FlaB. Cette identification a été réalisée à la fois à partir du gel SDS PAGE 1D et 2D (les trois spots nommés 3). Parmi les 15 pics majoritaires, 8 peptides correspondent à des peptides de FlaB. Le recouvrement de la séquence protéique est de 33%. Cette protéine est donc apparue sous forme de plusieurs tâches sur le gel 2-D certainement en raison de différents états de charges de la protéine.

Lors de l'identification protéique, les séquences protéiques théoriques utilisées correspondent à celles de la souche *B. burgdorferi* s.s. B31. Or nous avons utilisé la souche *B. burgdorferi* s.s. 297 pour la stratégie « InMAD ». Il est donc tout à fait possible, du fait de la variabilité de séquences protéiques entre les espèces, que certains peptides détectés par MALDI-TOF ne soient pas attribués. Afin de valider nos identifications, nous avons comparé les séquences protéiques des protéines identifiées entre la souche *B. burgdorferi* s.s. B31 et la souche *B. burgdorferi* s.s. 297, quand celles-ci étaient disponibles (461 protéines non vérifiées de la souche *B. burgdorferi* s.s. 297 sont disponibles dans la banque de données UniProtKB/TrEMBL).

Les séquences des protéines ribosomales 50S ou 30S S9 de la souche *B. burgdorferi* s.s. 297, ne sont pas connues. Cependant, on estime qu'il s'agit de protéines relativement bien conservées entre les différentes souches et que les peptides identifiés doivent être équivalents dans la souche 297<sup>321</sup>. Concernant la protéine OspB, la séquence pour la souche 297 n'est également pas connue. Pour la protéine OspA, la séquence entière de la souche 297 est connue, mais non vérifiée. Son nom d'accès sur Uniprot est C6C2R0. Il s'est avéré que l'homologie de séquence entre les deux souches était de 99% (figure 35) avec seulement la variation d'un acide aminé. Tous les peptides identifiés étaient bien retrouvés dans la séquence, validant ainsi notre identification.

B31	1	MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDK	60
297	1	.....	60
B31	61	LELKGTSDK <b>NNGSGVLEGVKADKSKVKLTI</b> SDDL <b>GQTTLEVFKEDGKTLVSKKVTSKDKS</b>	120
297	61	.....	120
B31	121	STEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV <b>LKGYVLEGTTLTAEKTTLVV</b>	180
297	121	..... <b>E</b> .....	180
B31	181	<b>KEGTVTL</b> SKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT <b>KDLVFTKE</b>	240
297	181	.....	240
B31	241	<b>NTITVQQYDS</b> NGTKLEGS <b>AVEITKLDEIKNALK</b>	273
297	241	.....	273

**Figure 35 : Alignement des séquences protéiques d'OspA de *Bbss* B31 et *Bbss* 297.**

Les peptides représentés en bleu correspondent aux peptides identifiés à l'aide de l'analyse MALDI-TOF. En rouge est représenté l'acide aminé variable : la glycine est substituée ici par l'acide glutamique.

Pour le filament flagellaire, nous avons pu retrouver une séquence protéique partielle de *B. burgdorferi* 297. Cette séquence protéique est constituée de 200 acides aminés (nom d'accès sur Uniprot : Q9ETR0), nous avons remarqué que l'homologie était de 100% sur cette partie concernée, nous permettant quand même de retrouver 5 peptides sur les 8 précédemment identifiés (figure 36).

B31	64	RNTSKAINFIQTTEGNLNEVEKVLVRMKELAVQSGNGTYSADDRGSIQIEIEQLTDEINR	123
297	1	.....	60
B31	124	IADQAQYNQMHMLSNKSASQNVRTAEELGMQPAKINTPASLSGSQASWTLRVHVGANQDE	183
297	61	.....	120
B31	184	AIAVNIYAANVANLFSGEGAQTAQAAPVQEGVQQEQAQQPAPATAPSQGGVNSPVNVTTT	243
297	121	.....	180
B31	244	VDANTSLAKIENAIRMISDQ	263
297	181	.....	200

**Figure 36 : Alignement des séquences protéiques partielles de FlaB de *Bbss* B31 et *Bbss* 297.**

Les peptides représentés en bleu correspondent aux peptides identifiés à l'aide de l'analyse MALDI-TOF. La séquence de la souche *Bbss* 297 est partielle.

## 2.4 Discussion

L'approche PMF constitue une méthode de choix pour l'identification directe de protéines, c'est une méthode simple et rapide à réaliser. En utilisant la stratégie « InMAD » dans un modèle d'infection murin immunodéprimé, nous avons pu identifier 3 biomarqueurs présents à un stade disséminé (15 jours post-infection): la protéine FlaB, la protéine ribosomale 30S S9, et potentiellement une des 3 protéines OspA, OspB ou la protéine ribosomale 50S. Cependant, ces marqueurs restent à confirmer.

Le fait que le modèle murin C3H/HeN immunocompétent n'ait pas permis de mettre en évidence la présence d'antigène circulant alors qu'il est associé à une bactériémie plus faible que celle des souris immunodéprimées, suggère que les antigènes circulants chez ces souris sont probablement trop faiblement concentrés pour déclencher une réponse immunitaire polyclonale spécifique. Par ailleurs, on peut supposer que les anticorps anti-*Borrelia* produits par les souris à 15 pi, ont complexé les potentiels antigènes circulants qui ne sont donc plus disponibles comme immunogène. Ceci montre l'intérêt d'utiliser un modèle murin immunodéprimé.

Pour identifier plus précisément les potentiels biomarqueurs, une optimisation de l'analyse des protéines de *Borrelia* par électrophorèse bidimensionnelle est nécessaire. D'après une analyse du génome de *Borrelia burgdorferi* s.s. B31, plus de 1500 protéines différentes de *B. burgdorferi* sensu stricto ont été prédites<sup>322</sup> ce qui peut rendre difficile leur analyse par électrophorèse sans étape de fractionnement. Lorsque l'on travaille sur des protéines solubles, la stratégie de les séparer sur un gel 2D est le meilleur choix, car c'est une

méthode résolutive. Mais, cette approche n'est toutefois pas optimale pour l'analyse des protéines membranaires, car lors de la séparation sur un gel 2D les protéines membranaires et basiques sont largement sous représentées en raison de problèmes d'extraction et de solubilisation<sup>45</sup>. Or la majorité des protéines de surface de *B. burgdorferi* sensu lato sont des lipoprotéines dont les chaînes lipidiques empêchent une bonne focalisation<sup>323,324</sup>. C'est notamment ce que nous avons pu constater, avec la présence de grandes traînées, de spots très peu définis et des intensités de signal pour certaines protéines bien plus faibles que par électrophorèse classique. Pour ce qui nous concerne, nous avons donc été contraints de réaliser une partie de l'analyse après une électrophorèse 1D. Une nouvelle préparation des protéines pourrait donc ainsi être envisagée en amont de l'électrophorèse, avec par exemple une extraction protéique différentielle afin de limiter le mélange de protéines par bande extraite et une meilleure représentativité des lipoprotéines.

Par ailleurs, pour une identification exhaustive, on pourrait envisager de réaliser une évaluation de l'immunoréactivité des protéines en utilisant un « pattern » protéique (protein-array) spécifique de *Borrelia* indépendant des systèmes de régulation des gènes.

En plus de ces optimisations concernant la préparation des protéines à analyser, une identification plus robuste de ces protéines pourrait être obtenue au moyen de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), capable de fragmenter des peptides en très faibles quantités et d'obtenir ainsi des informations sur la séquence en acides aminés des peptides. Cette technique est par ailleurs la plus appropriée pour identifier des protéines dans un mélange.

Une optimisation de l'analyse MS pourrait être également obtenue, en ajoutant la souche *B. burgdorferi* s.s. 297 dans la base de données de MS-Fit afin de ne pas manquer d'éventuelles protéines non homologues présentes dans Swiss-Prot.

En outre, l'étape d'immunisation des souris pourrait être améliorée avec l'utilisation d'autres adjuvants permettant une meilleure stimulation du système immunitaire<sup>325</sup>. En effet, si on considère que la quantité de ou des potentiels biomarqueurs présents dans le sérum des souris infectées est de l'ordre de 10ng/mL, en immunisant les souris avec 50 µL de plasma, seulement 0,5 ng (maximum) de protéines ont été présentés au système immunitaire ce qui est probablement trop faible pour déclencher une réponse immunitaire avec notre méthode actuelle. Pour contourner en partie ce problème, nous avons utilisé des souris immunodéprimées qui permettent d'obtenir une infection persistante à *Borrelia* et une quantité significativement plus élevée de bactéries dans la circulation sanguine<sup>326</sup> et potentiellement des antigènes circulants. Les souris CB17scid ont déjà été utilisées dans le cadre de l'identification

d'antigènes sécrétés putatifs de *Babesia microti*<sup>327</sup>. L'utilisation des souris SCID est d'autant plus importante que lors du premier papier décrivant « la stratégie InMAD », l'identification d'antigènes circulants a été réalisée pour deux pathogènes : *Burkholderia pseudomallei* et *Francisella tularensis*<sup>325</sup>, présentant des bactériémies assez importantes contrairement à *Borrelia burgdorferi* sensu lato. En effet, *B. pseudomallei* présente une charge bactérienne allant de  $8 \times 10^3$  à  $6 \times 10^4$  UFC (unité formant colonie) /mL de sang chez des souris infectées<sup>328</sup>. Pour *Francisella tularensis*, la charge bactérienne dans le sang est d'environ  $1 \times 10^4$  UFC/mL dans les 2 à 4 jours suivant l'infection<sup>329</sup>.

À ce jour très peu d'études font mention de l'identification d'antigènes circulants dans le cas de la maladie de Lyme. Une étude publiée en 2019, basée sur une analyse protéomique d'antigènes de *Borrelia* immunoconcentrés avec des anticorps polyclonaux, a montré l'identification de deux marqueurs FlaB et une protéine cytoplasmique : BB\_G31 dans le sang de macaques infectés<sup>330</sup>.

Une autre étude a mis en évidence par une méthode de spectrométrie de masse la protéine de surface externe A (OspA) comme potentiel antigène circulant. Dans cette étude, 1 seul plasma humain sur 3 testés a été détecté positif pour OspA<sup>288</sup>. D'une certaine façon nous avons donc confirmé l'intérêt de la protéine FlaB et potentiellement OspA pour le diagnostic de la maladie de Lyme.

### **III. Conclusion**

Ce travail nous a permis d'établir une liste de marqueurs potentiels de la Borréliose de Lyme dans les stades précoces disséminés de la maladie. Ces marqueurs restent cependant à être confirmés à la fois au moyen de méthodes de séparation des protéines plus résolutive et des méthodes d'identification plus précises.

Des méthodes de détection sensibles peuvent être développées, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre ces cibles, afin de rechercher et confirmer la présence de ces marqueurs dans des échantillons de sérum de patients atteints de la maladie de Lyme. Les protéines identifiées pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour évaluer la présence d'une infection active.

# ***CHAPITRE II :***

***Production et caractérisation  
d'anticorps monoclonaux  
dirigés contre des antigènes  
circulants***

-

***Développement de tests  
immuno-enzymatiques***

## ***I. Introduction***

Parallèlement à la recherche et à l'identification d'antigènes circulants issue de la bactérie lors de l'infection par *B. burgdorferi* sensu lato, nous nous sommes intéressés à plusieurs potentiels biomarqueurs signalés dans la littérature. L'objectif est de développer des tests de détection immunologiques d'antigènes de *Borrelia*, en vue d'évaluer leur utilité pour le diagnostic de la maladie de Lyme. Les dosages immunologiques constituent une méthode de choix dans les laboratoires d'analyses biologiques et cliniques, de par leur capacité à mesurer avec une très haute sensibilité et spécificité une cible d'intérêt dans un milieu complexe et leur facilité d'utilisation.

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, lors de l'infection d'un hôte mammifère, la bactérie *Borrelia* module l'expression de ses protéines de surface. Par exemple, une diminution de l'expression de la protéine OspA ainsi qu'une surexpression de la protéine OspC sont observées lors du passage à l'hôte mammifère<sup>331</sup>, de même que pour d'autres protéines comme DbpA<sup>138,332</sup>. Il est donc essentiel de sélectionner les antigènes les plus présents suivant le stade de la maladie.

Quelques études rapportent la détection directe de biomarqueurs, et ce notamment dans la peau. La peau est le premier organe touché par la Borréliose de Lyme<sup>231</sup>. Le pathogène est capable de se multiplier rapidement dans celle-ci<sup>333</sup>. À un stade précoce (5 et 7 jours), des analyses par spectrométrie de masse ont montré que la flagelline (FlaB) et OspC sont les deux protéines majoritairement détectées dans des biopsies cutanées de souris infectées, mais également chez des patients au niveau de l'EM<sup>291</sup>. À un stade plus tardif, en plus de la flagelline une autre protéine, la protéine VlsE, est majoritairement retrouvée dans la peau de souris à 40 jours après l'infection<sup>334</sup>.

Comme nous l'avons vu dans le précédent chapitre, plusieurs travaux ont rapporté la détection d'OspA dans différents échantillons d'urines et de sang de patients atteints de la Borréliose de Lyme<sup>284,288,289</sup>.

Ces quatre protéines constituent donc des marqueurs intéressants pour le diagnostic de la Borréliose de Lyme à différents stades de la maladie.

Avec l'objectif de développer diverses méthodes de dosage et de détection immunologiques (ELISA et western blot) d'intérêt diagnostic, des anticorps monoclonaux ont été produits contre ces différents antigènes.

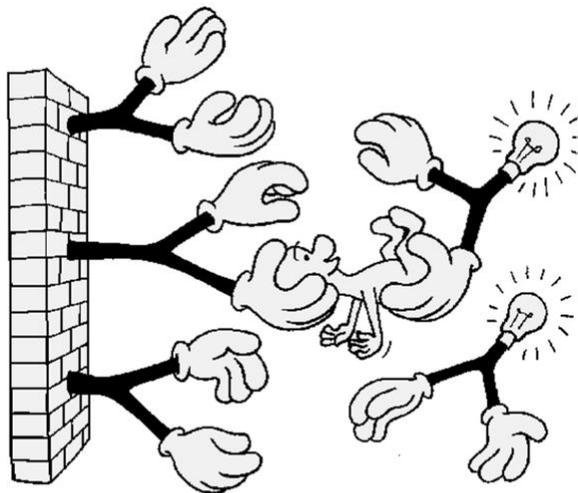
Afin de prendre en compte la diversité des souches de *Borrelia* retrouvées en Europe, nous avons considéré le degré d'homologie de séquence de chacune des protéines entre les différentes souches. En se basant sur la littérature, nous constatons que la protéine FlaB<sup>335</sup> est très conservée avec plus de 90 % d'homologie de séquence entre les espèces de *Borrelia*<sup>335</sup>, et la protéine OspA<sup>337</sup> est relativement bien conservée avec par exemple une homologie de séquence d'environ 80% entre des espèces de *Borrelia* européennes (*Bbav* PBi, *Ba* PBo) et des souches américaines (*Bbss* B31, N40)<sup>337</sup>. En revanche, comme nous avons pu le voir dans l'introduction de ce manuscrit, les protéines OspC et VlsE<sup>338</sup> sont hautement variables. L'utilisation d'OspC<sup>339,340</sup> et VlsE<sup>158</sup> en tant que candidat pour le diagnostic doit donc tenir compte de ce polymorphisme. À titre indicatif, nous avons évalué *in silico* le polymorphisme de ces protéines dans différentes souches de *Borrelia*, les alignements de séquences pour FlaB, OspA, OspC et VlsE sont présentés en annexe.

Deux différentes stratégies d'immunisation ont donc été entreprises pour produire des anticorps monoclonaux : d'une part l'immunisation avec une protéine recombinante pour les protéines conservées, FlaB et OspA, et d'autre part l'immunisation avec un peptide correspondant à une région conservée pour les protéines VlsE et OspC.

Ces anticorps, une fois produits, ont été utilisés pour développer des méthodes de détection immunologiques, de type (i) dosages immunométriques à deux sites aussi appelés « ELISA sandwich » dans lequel l'antigène est pris en sandwich entre deux anticorps reconnaissant chacun un épitope différent (figure 37), (ii) Solid-phase immobilized epitope-immunoassay (SPIE-IA), pour le dosage de petites molécules ou de protéines en utilisant qu'un seul épitope (figure 38) et (iii) western-blot.

La sensibilité analytique de ces dosages immunologiques est définie comme la concentration minimale détectable d'un antigène. Il s'agit de la plus petite concentration d'antigène induisant une augmentation statistiquement significative du signal observé en absence d'antigène (liaison non spécifique).

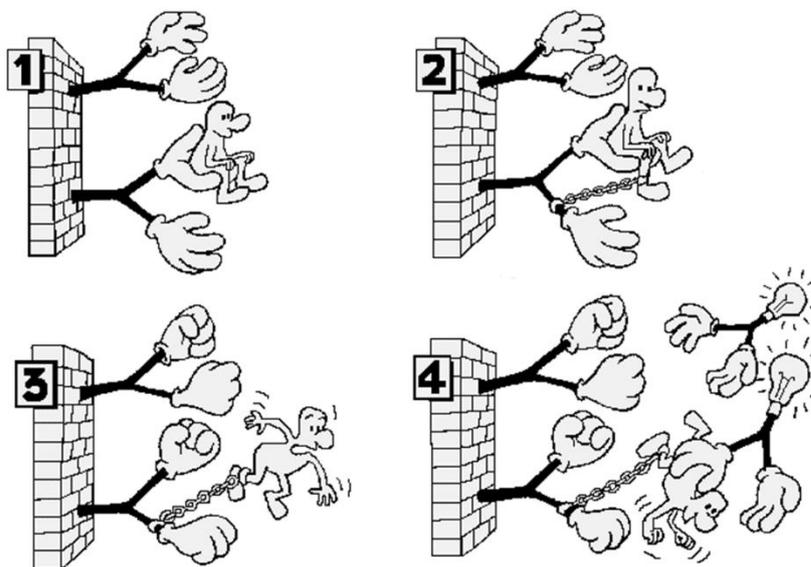
Dans ce chapitre, nous aborderons, dans un premier temps, deux de ces quatre marqueurs produits précocement au cours de l'infection : FlaB et OspC. Le développement et l'évaluation des méthodes de détection dirigées contre OspC et FlaB sont traités à travers l'article « Detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in tissues and plasma during early infection in a mouse model ». Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons aux deux autres marqueurs : OspA et VlsE.



*Lardrot / Grassi*

**Figure 37 : Principe de l'ELISA sandwich**

<sup>341</sup>(D'après Grassi *et al.* (1996)). L'anticorps de capture immobilisé sur la phase solide (puits d'une plaque de microtrotation), réagit avec l'antigène présent dans l'échantillon. La présence de l'antigène, lié à l'anticorps de capture, est mise en évidence à l'aide d'un deuxième anticorps, appelé anticorps traceur, couplé à un marqueur enzymatique. Après lavage, dans une dernière étape, l'ajout d'une solution révélatrice contenant du substrat de l'enzyme permet la réaction colorée et l'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité d'antigène fixé sur la phase solide.



*Lardrot / Grassi*

**Figure 38 : Principe du SPIE-IA (Solid phase-immobilized epitope immunoassay).**

<sup>341</sup>(D'après Grassi *et al.* (1996)). (1) L'antigène réagit avec l'anticorps de capture immobilisé sur la phase solide ; (2) formation d'une liaison covalente entre l'antigène complexé et l'anticorps immobilisé sur la phase solide ; (3) dissociation du complexe antigène/anticorps (libération de l'épitope) ; (4) la présence de l'antigène, lié de façon covalente à l'anticorps de capture, est mise en évidence à l'aide d'un anticorps traceur reconnaissant le même épitope que l'anticorps de capture.

## II. Résultats & discussion

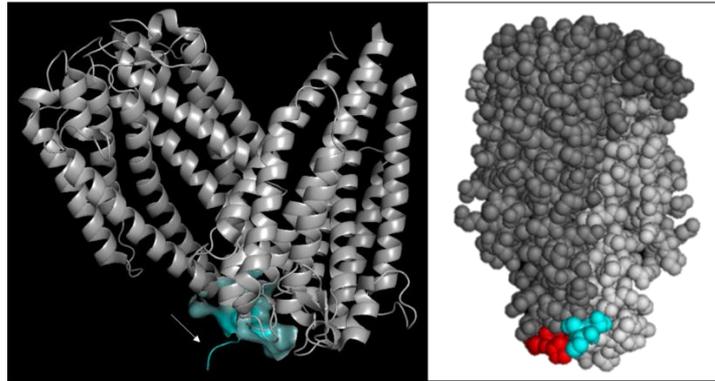
### 1. Développement d'outils immunologiques pour la détection de deux marqueurs précoces, FlaB et OspC, et évaluation dans un modèle d'infection murin

Le développement des tests immunologiques et la détection de ces deux marqueurs sont présentés sous forme d'un article publié dans Scientific Reports.

#### 1.1 Introduction de l'article

L'objectif de ce travail était de développer des immunoessais spécifiques et sensibles basés sur la détection des antigènes bactériens, FlaB et OspC, exprimés précocement au cours d'une infection par *Borrelia*. Pour produire des anticorps monoclonaux dirigés contre FlaB, une protéine recombinante a été utilisée comme immunogène, alors que pour la protéine OspC, du fait de sa variabilité de séquence importante entre les espèces de *Borrelia*, une stratégie d'immunisation avec un peptide conservé a été menée.

En effet, les études de structure primaire de la protéine ont montré qu'OspC est une protéine hautement variable au sein du genre *Borrelia*<sup>149</sup>. La diversité du gène codant cette protéine est soulignée par l'existence d'une vingtaine de groupes majeurs au sein même de l'espèce *B. burgdorferi* sensu stricto. De nombreuses études mettent en évidence une région C-terminale immunodominante composée de 10 acides aminés<sup>340,342-344</sup> (peptide C10), qui correspond à une région hautement conservée (figure 39 et annexe 3). Souvent ces études ne prennent en compte que les souches *B. burgdorferi* sensu stricto et non les *B. burgdorferi* sensu lato<sup>343</sup>. La séquence consensus de ce peptide qui est retrouvée dans la grande majorité des *Borrelia* pathogènes est PVVAESPKKP<sup>345,346</sup>. En comparant 89 séquences d'acides aminés non redondantes de *Bbsl* dans la base de données NCBI, nous avons remarqué que ce peptide était 100% identique dans 69 séquences, soit plus de 80% des souches. Les autres séquences ne présentaient que de légères variations de 1 ou 2 acides aminés. Par ailleurs, comme on peut voir dans la figure 39, ce peptide présente plusieurs résidus à la surface de la protéine OspC, ce qui suggère que cet épitope serait accessible aux anticorps. Ainsi nous avons utilisé ce peptide consensus C10 comme immunogène.



**Figure 39 : Structure tridimensionnelle d'OspC.**

Réalisé sur PyMOL (issue de la structure 7BML de la « protein data bank » (PDB) de RCSB). La surface rouge représente la région proximale de la membrane bactérienne. En bleu, montré par une flèche dans l'image de gauche est représenté le peptide C10. Sur la structure de gauche est également représenté l'environnement proche du peptide sous une forme de surface bleue.

Une fois les anticorps produits, ils ont été caractérisés et sélectionnés pour leur capacité à reconnaître différentes espèces de *Borrelia* retrouvées en Europe. Avec les meilleurs anticorps monoclonaux, deux types de méthodes de détection ont été développées, une basée sur l'immunocapture de l'antigène suivie d'une détection par western blot tandis que la seconde utilise une détection immunologique quantitative. Ces tests ont été évalués pour leur capacité à détecter FlaB et OspC dans différents fluides et échantillons biologiques de souris infectées.

## 1.2L'article



OPEN

## Detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in tissues and plasma during early infection in a mouse model

Victoria Dolange, Stéphanie Simon & Nathalie Morel

*Borrelia burgdorferi* is the causative agent of Lyme borreliosis, which is the most common tick-borne human disease in Europe and North America. Currently, the diagnosis of Lyme borreliosis is based on serological tests allowing indirect detection of anti-*Borrelia* antibodies produced by patients. Their main drawback is a lack of sensitivity in the early phase of disease and an incapacity to prove an active infection. Direct diagnostic tests are clearly needed. The objectives of this study were to produce tools allowing sensitive detection of potential circulating *Borrelia* antigens and to evaluate them in a mouse model. We focused on two potential early bacterial makers, the highly variable OspC protein and the conserved protein FlaB. High-affinity monoclonal antibodies were produced and used to establish various immunoassays and western blot detection. A very good limit of detection for OspC as low as 17 pg/mL of sample was achieved with SPIE-IA. In infected mice, we were able to measure OspC in plasma with a mean value of 10 ng/mL at 7 days post-inoculation. This result suggests that OspC could be a good blood marker for diagnosis of Lyme borreliosis and that the tools developed during this study could be very useful.

Lyme borreliosis is the most common reported tick-borne infectious disease in Europe<sup>1</sup> and North America<sup>2</sup>. This infection is caused by spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) of which at least five species (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* and *B. spielmanii*) are pathogenic to humans<sup>3</sup>. The clinical manifestations are varied and polymorphic (cutaneous, neurological and rheumatological)<sup>4</sup>. The early infection phase is characterized by typical erythema migrans (EM) in 70–80% of cases<sup>5</sup>, often associated with nonspecific symptoms such as fever, myalgia, fatigue and joint pain<sup>6</sup>. If patients are not treated, the disease may progress to an early disseminated stage by hematogenous dissemination of the bacteria toward different organs and skin<sup>7</sup>. During this phase multiple cutaneous signs and cardiac, neurological and joint symptoms can occur. Late manifestations may occur several months to years after the onset of the infection and include mainly arthritis, acrodermatitis chronica atrophicans and late neuroborreliosis<sup>8</sup>.

In the absence of typical EM, the diagnosis of Lyme disease is difficult to establish due to the complexity of the clinical diagnosis<sup>3,9</sup> and insufficient performances of the related laboratory assays. If there is a suspected bite and clinical signs suggestive of Lyme disease, serological tests based on detection of the host antibody response against *Borrelia* can be done<sup>10</sup>. The recommended approach for laboratory diagnosis of Lyme borreliosis is the two-tiered testing strategy, which includes an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) followed by a more specific western blot in order to rule out false positives<sup>11</sup>. These tests do not prove the existence of an active infection and are not recommended in the early localized phase of the disease. A recent meta-analysis showed that serological tests have heterogeneous sensitivity depending on the stage of the disease with only 50% during early manifestations (3–30 days post-infection)<sup>12,13</sup>. At this stage, the low sensitivity of serological testing is due to a weak or absent antibody response. Another pitfall of serological testing is the lack of standardization of the assay, which uses various recombinant proteins or whole-cell heterogeneous *Borrelia* to capture specific antibodies, thus producing undesirable variations in the test results. Direct detection of *Borrelia* in patients is difficult. Culture is not routinely used due to low sensitivity and a long incubation period of up to 12 weeks for bacterial growth<sup>14</sup>. Polymerase chain reaction (PCR) is generally very efficient in pathogen detection<sup>15</sup>, but in the case of Lyme disease the sensitivity is insufficient in blood due to the very low level of circulating bacteria<sup>14</sup>.

Paris-Saclay University, CEA, INRAE, Medicines and Healthcare Technologies Department (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France. email: nathalie.morel@cea.fr

PCR in synovial biopsy ranges in sensitivity from 40 to 90% and can be useful for diagnosis of Lyme arthritis. However, *Borrelia* DNA may remain in tissues after treatment and so is not a proof of active infection<sup>16,17</sup>.

Reliable, accurate, sensitive and rapid tests for active infection are thus needed for better care management of patients as soon as possible before they develop disseminated Lyme disease. Few studies have reported the direct detection of *Borrelia* protein in patients. In the past, assays based on capture and detection of Lyme antigen in urine or blood using anti-*Borrelia* polyclonal antibodies were developed<sup>18</sup> but were later invalidated for measurement in patients due to low accuracy, sensitivity and specificity<sup>19</sup>. More recently, a new method based on the concentration of outer surface protein A (OspA) in a large volume of urine followed by detection with western blot was reported to be efficient in the early detection of active infection<sup>20</sup>, but robust validation is still needed.

The aim of the present work was to develop specific and sensitive immunoassays based on the direct detection of bacterial antigens. This first involves the production of a well-characterized and high-affinity monoclonal antibodies (mAbs) against potential circulating *Borrelia* antigens and, second, the development of sensitive immunological methods that could be useful for direct diagnosis of Lyme disease. We focused on two *Borrelia* proteins, flagellin B (FlaB), a major component of the periplasmic flagellar filament crucial for bacterial mobility, and OspC, a lipoprotein needed for the establishment of early localized infection. Both proteins are described as early immunodominant antigens after infection<sup>21</sup> and were also shown to be detectable in skin biopsy from humans with EM lesions using mass spectrometry analysis<sup>22</sup>. Two strategies were pursued for immunization. For FlaB, which is a highly conserved protein among *Borrelia* species, we used a recombinant protein as immunogen. For OspC, considering its high variability between *B. burgdorferi* species and strains of the same species, an approach using a highly conserved OspC peptide motif as immunogen was investigated. After characterization and selection of the best mAbs, we developed two sensitive detection methods. One is based on antigen immunocapture followed by western blot detection, while the second uses solid phase immobilized epitope immunoassays (SPIE-IA)<sup>23</sup>. These assays were evaluated for their capacity to detect FlaB and OspC in the tissues and plasma of experimentally infected mice. This study shows that OspC could be a good blood marker, for direct early diagnosis of Lyme disease.

## Results

**Production and characterization of monoclonal antibodies directed against FlaB protein.** Given that FlaB protein has a high sequence homology between different *Borrelia* strains and species, we raised antibodies against a recombinant FlaB expressed in *E. coli*. Throughout the screening and cloning process, secreted hybridoma antibodies were assayed using two methods. The first measures antibody binding with biotinylated recombinant FlaB and the second measures binding with whole-cell *Borrelia burgdorferi* extract (strain BO23) coated on a solid phase. A total of 21 hybridomas were selected for their high reactivity for both sources of FlaB and were successfully cloned and stabilized. Purified mAbs were further characterized by sandwich immunoassays, western blots and affinity determination by biolayer interferometry.

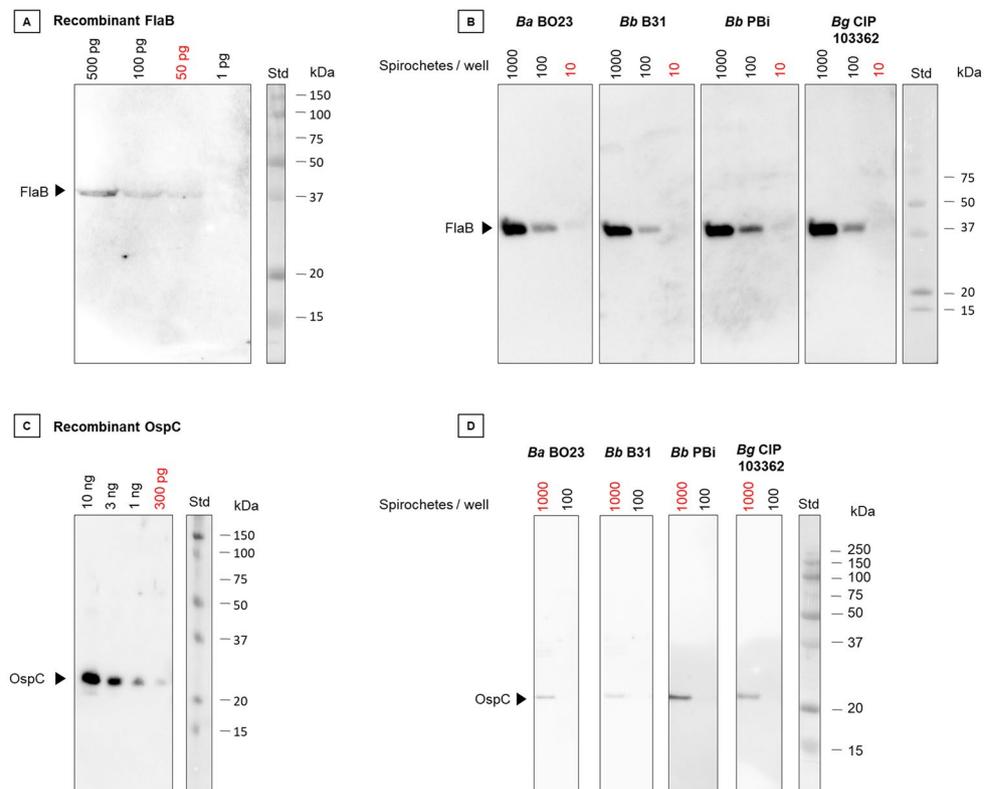
In an attempt to develop a sensitive ELISA for FlaB detection, we performed an mAb combinatorial analysis as described in materials and methods. Among the 441 combinations resulting from the 21 anti-FlaB mAbs, 361 pairs of antibodies provided good detection for 10<sup>5</sup> *Borrelia*. The best sandwich immunoassays, including either FlaB-15 or FlaB-18 as capture mAb and FlaB-20 as tracer, were further evaluated in serial dilutions using an extract of *Borrelia* (data not shown). The limit of detection (LoD) was around 1 × 10<sup>4</sup> *Borrelia* per mL.

The 21 anti-FlaB mAbs were tested for their ability to recognize recombinant FlaB and whole-cell *Borrelia* by western blot. A single band around 41 kDa, corresponding to the molecular mass of FlaB, was observed with all 21 mAbs, with recombinant FlaB and *Borrelia* cells. Three highly efficient mAbs, FlaB-15, FlaB-18 and FlaB-20, were further evaluated on a range of bacteria from 10 to 1000 spirochetes and recombinant FlaB. As shown in Fig. 1A,B, the most efficient anti-FlaB mAb, FlaB-15, allows highly sensitive detection of different species of *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*) with 10–100 spirochetes detected according to the strain and 50 pg of recombinant FlaB.

Kinetic affinity parameters of the best mAbs, previously identified by ELISA and western blot, were determined by biolayer interferometry using recombinant FlaB. All mAbs presented quite similar kinetic constants and a high affinity for FlaB, with K<sub>D</sub> between 0.23 and 2.10 nM (see Table 1), and are thus potentially suitable for sensitive detection of FlaB. However, kinetic constants remain purely indicative because experiments were not performed with native FlaB and we cannot ascertain whether recombinant FlaB produced in inclusion bodies of *E. coli* and refolded in vitro has the same conformation and solvent exposure as native polymerized FlaB in the flagella.

**Production of monoclonal antibodies against a conserved OspC peptide sequence.** OspC amino acid sequence varies greatly between different strains of *B. burgdorferi* s.l. The search for conserved immunogenic epitopes of OspC allowed identification of a highly conserved sequence corresponding to the C-terminal 10-amino-acid peptide of OspC, known as the C10 peptide<sup>24</sup>. The sequence consensus of this peptide found in the great majority of pathogenic *Borrelia* is PVVAESPKKP<sup>24,25</sup>. Comparison of 89 non-redundant OspC amino acid sequences of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the NCBI database shows that this peptide was 100% identical in 69 sequences, i.e. more than 80% of the strains, whereas the other sequences showed only slight variations of 1 or 2 amino acids. Thus, by using the C10 consensus peptide as immunogen, we assumed that we were targeting the OspC protein of the major infectious strains.

Mice were immunized with BSA coupled to C10 peptide through a cysteine added to its N-terminal extremity. After fusion of spleen cells with myeloma cells, hybridomas were screened using three different assays based on the binding of antibodies to the C10 peptide, to full-length recombinant OspC and to whole-cell *Borrelia* extract



**Figure 1.** Western blot detection of FlaB and OspC using the best selected mAb. (A) Range of recombinant FlaB from 500 to 1 pg per well detected with FlaB-15 mAb and (C) recombinant OspC from 10 ng to 40 pg per well detected with C10-11 mAb. (B, D) Various *Borrelia* strains loaded at  $10^3$  and  $10^2$  bacteria per lane and detected with FlaB-15 (B) and C10-11 mAbs (D). Std: Molecular weight markers and protein sizes (kDa) are indicated on the right side of the gels. Uncropped original images are reported in Fig. S2.

Antigen	Antibody	$k_a$ (/M/s) $\times 10^{5a}$	$k_{dis}$ (/s) $\times 10^{-4a}$	$K_D$ (M) $\times 10^{-9a}$
FlaB	FlaB-15	$1.03 \pm 0.001$	$0.24 \pm 0.008$	$0.23 \pm 0.007$
	FlaB-18	$2.05 \pm 0.006$	$0.90 \pm 0.021$	$0.44 \pm 0.010$
	FlaB-20	$1.09 \pm 0.003$	$2.28 \pm 0.023$	$2.10 \pm 0.022$
OspC	C10-11	$1.99 \pm 0.003$	$0.92 \pm 0.009$	$0.46 \pm 0.004$
	C10-13	$2.03 \pm 0.005$	$3.15 \pm 0.015$	$1.55 \pm 0.008$
	C10-14	$1.39 \pm 0.003$	$2.47 \pm 0.013$	$1.78 \pm 0.01$
	C10-16	$1.79 \pm 0.005$	$3.29 \pm 0.015$	$1.84 \pm 0.010$
	C10-17	$1.81 \pm 0.005$	$3.11 \pm 0.016$	$1.72 \pm 0.010$
	C10-19	$1.72 \pm 0.006$	$4.04 \pm 0.017$	$2.36 \pm 0.013$
	C10-20	$1.31 \pm 0.003$	$2.67 \pm 0.028$	$2.02 \pm 0.021$

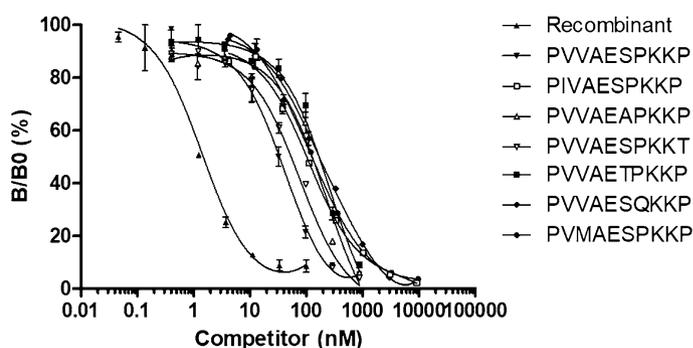
**Table 1.** Kinetic parameters of mAbs for flagellin B and OspC proteins. Mean and standard deviation values of equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ), association rate ( $k_a$ ) and dissociation rate ( $k_{dis}$ ) were extracted from the curve-fitting analysis of mAb association and dissociation successive dilutions (out of 7). <sup>a</sup>Values determined by the Octet Data Analysis HT 10.0 software using a 1:1 binding model, and expressed as mean  $\pm$  SEM.

(strain BO23). Of 189 hybridomas multiplying after fusion, a total of 7 hybridomas satisfying all screening assays were finally cloned and stabilized.

Kinetic affinity parameters of the anti-C10 peptide mAbs are reported in Table 1. All mAbs were able to bind OspC with a strong affinity in the low nanomolar range, suggesting that the C-terminal epitope C10 is fully exposed in the recombinant OspC protein. The C10-11 mAb has the highest affinity for OspC, with a  $K_D$  of 0.46 nM, due essentially to its very low dissociation constant.

C-terminal peptide	$K_{app}$ (nM)	Representativeness (%)	Example of <i>B. burgdorferi</i> s.l. strains
1: PVVAESP KKP	33	80.9	<i>Bbss</i> B31; <i>Bbss</i> Bre13; <i>Bbss</i> ACA1; <i>Bbss</i> PLE; <i>Bb</i> PBo; <i>Ba</i> BO23; <i>Ba</i> PKo; <i>Ba</i> HT25; <i>Bg</i> PLi; <i>Bg</i> HB19; <i>Bg</i> PBes
2: PVVAEAP KKP	146	0.9	<i>Bg</i> PBr
3: PVVAESP KKT	60	0.9	<i>Bbss</i> PWag
4: PVVAESP KNP	NB	0.9	<i>Bbss</i> JD1, <i>Ba</i> K78
5: PVVAETPK KP	179	5.5	<i>Bbav</i> PBi
6: PVVAENPK KP	NB	0.9	<i>Bbss</i> F045
7: PVVAESQ KKP	170	0.9	<i>Ba</i> BaC22
8: PVVVE SP KKP	NB	1.8	<i>Bbss</i> ZS7
9: PVMAESP KKP	125	0.9	<i>Bg</i> 935 T
10: PIVAESP KKP	100	3.6	<i>Bbss</i> N40; <i>Bbss</i> LDP74
11: PIVAESP KNP	NB	2.7	<i>Bbss</i> 297

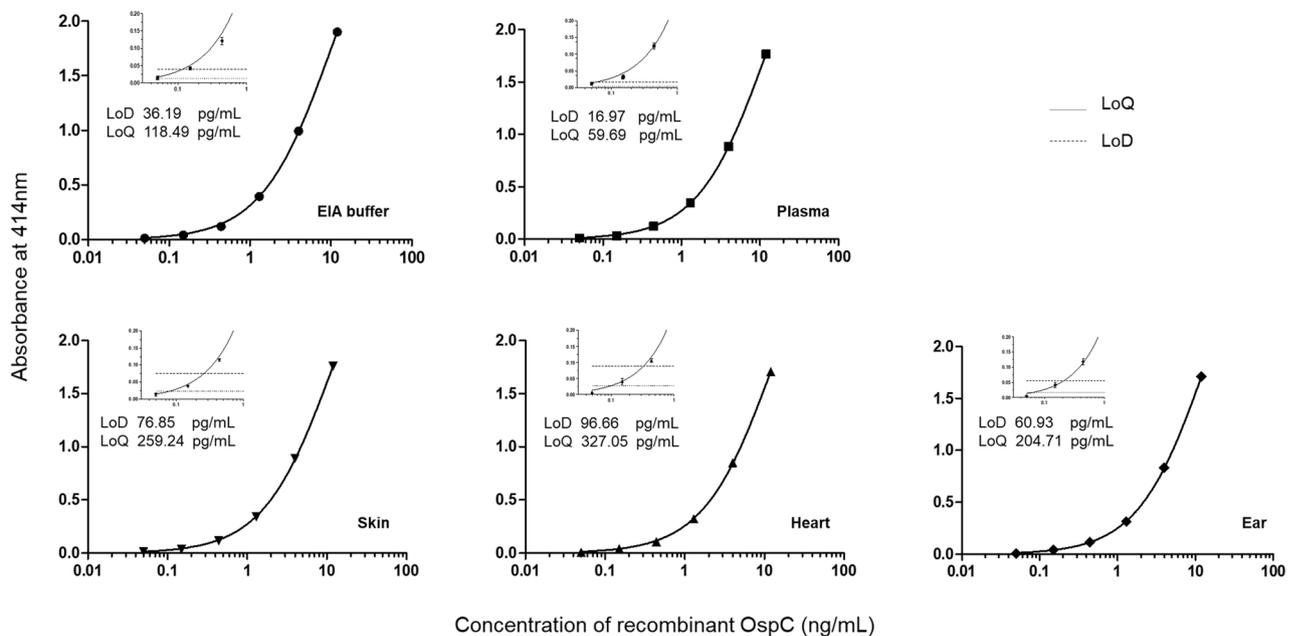
**Table 2.** Variant of C10 C-terminal peptide. Apparent dissociation constant ( $K_{app}$ ) of C10-11 mAb for C10 peptide variants was calculated based on the fitting performed in the competition experiments (Fig. 1). The representativeness of the different sequences of the C10 peptide among *Borrelia burgdorferi* s.l. is given in percentages. NB means no binding. *Bbss*: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Ba*: *Borrelia afzelii*, *Bg*: *B. garinii*, *Bbav*: *B. bavariensis*.



**Figure 2.** Competition ELISA experiments with various C10 peptide variants. B/B0 represents the percentage of binding of the C10-11 mAb with the C10 peptide tracer. The results are expressed in terms of B/B0 as a function of the logarithm of the competing C10 variant or OspC. Data shown are representative of three independent experiments. Data from non-competing peptides (peptides 4; 6; 8 and 11 in Table 2) are not included in the graph.

**Competition experiments with C10 peptide variants.** In order to evaluate the capacity of the C10-11 mAb to bind OspC protein from all potential pathogenic *Borrelia burgdorferi* s.l., competition experiments were performed with various peptide sequences corresponding to the C-terminal OspC decapeptide of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the NCBI database. From 89 sequences of OspC, we identified ten different decapeptides presenting one or two amino acid substitutions with regard to the C10 consensus sequence (see Table 2). For the competition experiments, various concentrations of each peptide were mixed with the acetylcholinesterase (AChE)-labeled C10 peptide and added to C10-11 mAb-coated plates. The apparent affinity ( $K_{app}$ ) of the C10-11 mAb for each peptide variant was determined as the concentration of peptide inducing 50% inhibition of the binding of labeled C10 peptide. For four peptides (peptides 4, 6, 8, and 11), no inhibition was observed, while for three of them there is only one amino acid substitution. The same result was observed with all other anti-C10 peptide mAbs produced. As shown in Fig. 2, the six other peptides were able to inhibit the binding of C10 peptide, allowing determination of a  $K_{app}$  ranging from 60 to 179 nM, i.e. 2–5 times greater than the  $K_{app}$  of the reference C10 peptide (33 nM). These results suggest that the OspC variants corresponding to these peptides should be recognized by the C10-11 mAb, but with a lower affinity resulting in a lower sensitivity of detection. For recombinant OspC, a  $K_{app}$  of 1 nM was determined, which is consistent with the data obtained by biolayer interferometry. The discrepancy in affinity between the C10 peptide and the OspC protein may possibly reflect a conformational difference between the free C10 peptide and the same peptide engaged in a peptide bond with the rest of OspC protein, as was the immunogen. According to the frequency of each variant reported in the NCBI database, the mAb C10-11 could thus detect OspC protein of more than 90% of *Borrelia burgdorferi* strains.

**Development of a solid-phase immobilized epitope immunoassay (SPIE-IA) for OspC protein.** SPIE-IA technology, developed several years ago in our laboratory, is the most appropriate method for measurement of small molecules bearing a single epitope in excess reagent format<sup>26</sup>. This method is based on

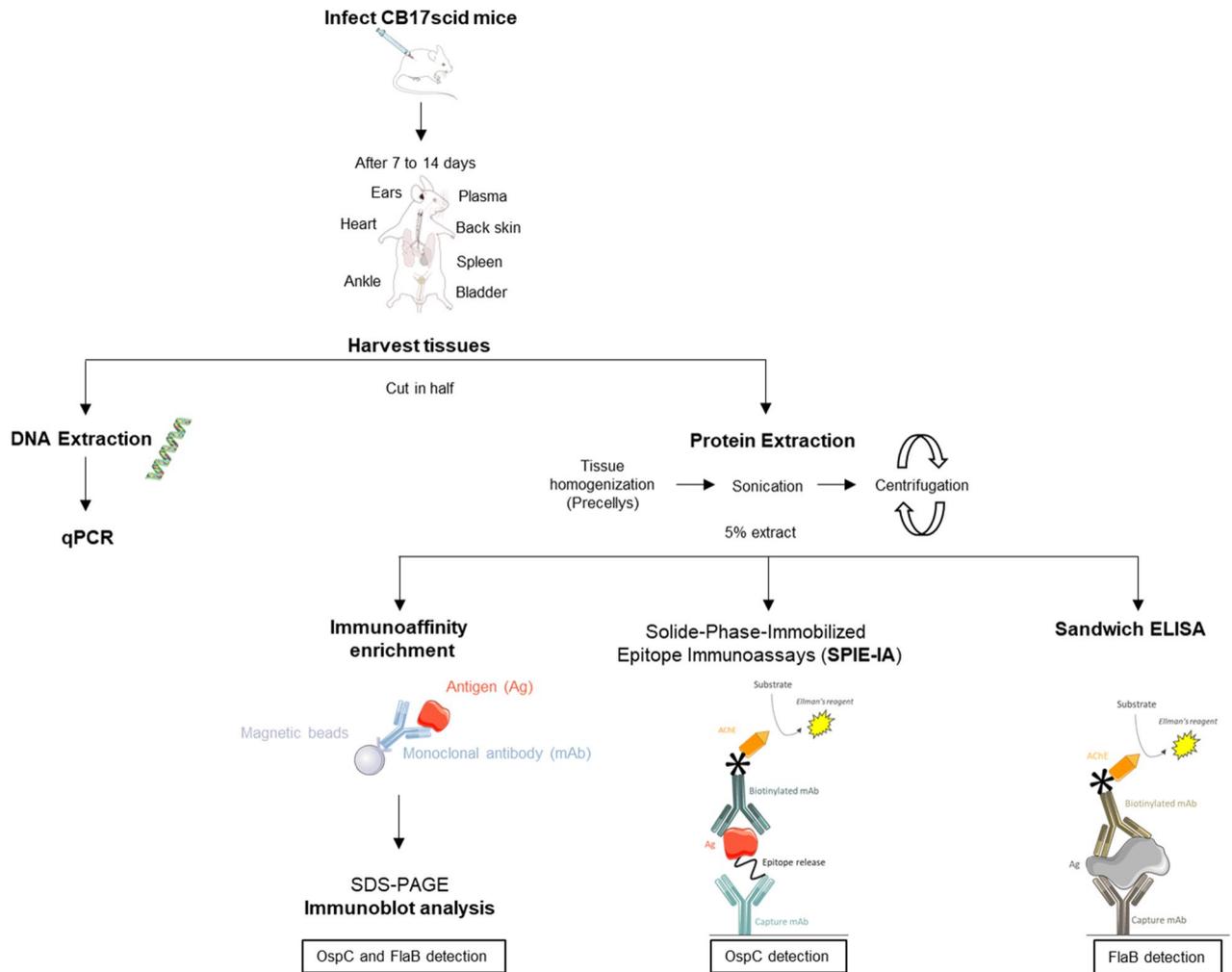


**Figure 3.** Standards curves obtained with solid phase-immobilized epitope immunoassay (SPIE-IA) in various complex matrices. Serial dilutions of OspC protein were performed in EIA buffer and in different mouse tissues or fluid. The theoretical limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) are indicated for each tissue. Thin dotted and dashed horizontal lines represent absorbance reached for the detection limit (three standard deviations) and quantification limit (10 standard deviations), respectively. Data points represent mean values obtained from three independent experiments each including a duplicate and error bars represent standard deviations ( $n=6$ ). The nonspecific binding was subtracted from data.

the use of a single epitope, such as the C10 peptide, recognized successively by a capture antibody and a tracer antibody (see “Methods”). To identify the best pair of antibodies for OspC detection by SPIE-IA, antibody combinatorial analysis was performed as described in materials and methods. The best combination, involving C10-11 as well as capture and tracer antibody, was selected according to the strongest signal-to-noise ratio observed with OspC protein. A standard curve established with OspC ranging from 50 pg/mL to 12 ng/mL and fitted using a nonlinear regression model is presented in Fig. 3. An LoD of 36 pg/mL was determined in assay buffer. Because compounds in biological matrixes may affect the specific binding between antibodies and targets possibly resulting in decreased sensitivity and specificity of immunoassays, we evaluated the matrix effect of different mouse tissues or fluid on the detection of recombinant OspC. The samples were prepared as tenfold diluted extract of tissues (5% W/V) or plasma. As shown in Fig. 3, taking the results obtained for buffer as reference, few differences were observed in sample matrices. The LoD and limit of quantification (LoQ) varied as a function of the nonspecific binding (subtracted in the curves shown), with a loss of sensitivity when nonspecific binding increased. The higher matrix effect was observed in heart samples for which the LoD was reduced by a factor of 2.5, whereas in plasma LoD was increased by a factor 2. These results show that C10 peptide SPIE-IA could be used to detect OspC in various tissues and plasma with a sensitivity as low as 17 pg/mL of sample (approximately 85 attomol by assay).

**Evaluation of anti-C10 peptide for OspC western blot detection.** A first screening of the 7 mAbs was performed on the recombinant OspC protein at 5  $\mu$ g/mL and against *B. garinii*, which strongly expresses OspC in vitro as checked by SDS-PAGE. All mAbs recognized the recombinant OspC and the native OspC of *Borrelia garinii* with an apparent molecular weight around 23 kDa. The more efficient antibody, mAb C10-11, was further evaluated on four different *Borrelia* strains that express OspC in culture (Fig. 1). All native OspC were detected, except for the one from *B. burgdorferi* strain 297. These results are in agreement with the previous C10 peptide ELISA competition experiments showing that the C10 variant peptide of strain 297 did not bind the anti-C10 peptide mAb. To evaluate the sensitivity of OspC detection by western blot, a range of recombinant OspC and whole-cell *Borrelia* in vitro culture extracts was checked. The LoD was 300 pg for recombinant OspC protein and around 1000 bacteria for all strains recognized (Fig. 1C,D).

**Detection of OspC and FlaB in a mouse model of *Borrelia* infection by western-blot.** Using our most sensitive method of detection (Fig. 4), we assayed the detection of FlaB and OspC proteins during early *Borrelia* infection in mice (Fig. 5). Mice were infected by subcutaneous injection of  $10^5$  bacteria. At 7 and 14 days post-inoculation (p.i.), blood, ears, skin near the site of inoculation, heart, bladder and joints were collected and analyzed by western blot in combination with immuno-concentration. The presence of *Borrelia* in tissues was also checked by qPCR. The quantity of *Borrelia* per  $\mu$ g of DNA was estimated using a qPCR standard curve of

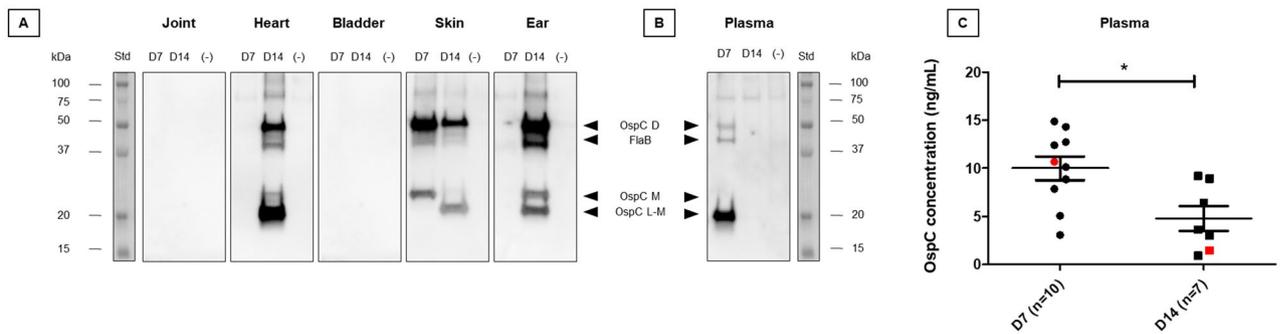


**Figure 4.** Data acquisition workflow. Schematic workflow employed for tissue analysis. After infection and sacrifice of the mice, the organs are collected for *Borrelia* quantification by qPCR and for protein analysis. Three methods are performed to detect OspC and FlaB markers: a duplex method for FlaB and OspC detection including an immuno-enrichment step before western blot analysis, a sandwich ELISA for FlaB detection, and SPIE-IA for OspC detection. This figure was created using images from Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>), licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (CC BY 3.0 license: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). The color of some images were modified. The mouse anatomy image is from Wikimedia Commons (<https://commons.wikimedia.org/>), licensed under a Creative Commons Attribution-share Alike 4.0 international License (CC BY-SA 4.0 license: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

*Borrelia* DNA (Supplementary Fig. S1). In control uninfected mice, no *Borrelia* DNA was detected. At 7 days p.i., 100% of skin biopsies and ears were positive, whereas other tissues were negative. At 14 days p.i., *Borrelia* DNA was detected by qPCR in skin, ears, heart and joints, but was not detected in the spleen or bladder. Western blot analysis of immunoconcentrated OspC and FlaB from mouse tissues at 7 and 14 days p.i. showed a relatively good correlation with DNA detection. OspC and FlaB were not observed in uninfected mice. At 7 days p.i., in skin near the inoculation site, we detected three major bands around 23 kDa and 46 kDa corresponding to monomeric and dimeric forms of OspC, respectively, and a less intense band around 41 kDa corresponding to FlaB. In other tissues in which little or no *Borrelia* DNA was detected, no protein was revealed. At 14 days p.i., dimeric and monomeric OspC as well as FlaB were detected in skin, heart and ears, whereas bladder, joints, and spleen remained negative. Surprisingly, at 14 days p.i. two forms of monomeric OspC were observed in ears, a 23 kDa OspC form and a smaller form around 20 kDa. In heart and skin, monomeric OspC is mainly represented by the 20 kDa form.

Even more interestingly, we can detect both OspC and FlaB in plasma. As shown in Fig. 5, at 7 days p.i. a major band at 20 kDa corresponding to smaller form of OspC and two fainter bands of dimeric OspC and FlaB were detected, whereas at 14 days no protein was revealed in the plasma tested.

**Quantification of early *Borrelia* markers by enzyme immunoassay.** Tissues and plasma were further analyzed by immunoassay. Given that a smaller quantity of tissue can be treated on microtiter plates, i.e. ten



**Figure 5.** Analysis of tissue extracts from experimentally infected mice. **(A)** Western blot analysis of FlaB and OspC extracted from tissues of mice infected by the *Borrelia* BO23 strain. After immune-concentration of FlaB and OspC from tissue extracts, proteins were analyzed by western blot using a mix of biotinylated FlaB-15 and C10-11 mAbs. Data shown are representative of five mice (at 7 or 14 days). The analysis of non-infected mouse samples are included as negative controls (-). **(B)** Similarly, western blot analysis was performed with samples of plasma from infected and non-infected mice. **(C)** The graph represents the measurement by SPIE-IA of OspC in plasma of infected mice at 7 days (ten samples) and 14 days (seven samples). The statistical analysis was performed using the nonparametric Mann–Whitney U test  $*p < 0.05$ . The red dot and red square on the graph indicate plasma samples analyzed by western blot in which the amount of OspC in plasma was determined by quantitative SPIE-IA of C10 peptide. Std: Molecular weight markers and protein sizes (kDa) are indicated on the side of the gel. *D* dimer, *M* monomer, *L-M* low monomer. Uncropped original images are reported in Fig. S3.

Organs	<i>Borrelia</i> quantification (number of spirochetes/ $\mu$ g DNA)		OspC quantification (ng/mg tissues or ng/mL <sup>*</sup> )	
	D7	D14	D7	D14
Joint	0 $\pm$ 0 (0/5)	3 $\pm$ 6 (1/5)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Heart	3 $\pm$ 7 (1/5)	3478 $\pm$ 4063 (5/5)	0.45 $\pm$ 0.61	80.52 $\pm$ 172.97
Skin	1031 $\pm$ 1817 (5/5)	1916 $\pm$ 1596 (5/5)	440.15 $\pm$ 576.36	18.87 $\pm$ 36.37
Ear	6 $\pm$ 8 (2/5)	2509 $\pm$ 3071 (5/5)	0.31 $\pm$ 0.48	138.96 $\pm$ 308.08
Plasma	N.D.	N.D.	10.01 $\pm$ 3.86*	4.80 $\pm$ 3.41*

**Table 3.** Quantification of *Borrelia* and OspC in mouse tissues and plasma at the 7 and 14 days post-inoculation. The quantity of *B. burgdorferi* in tissues was estimated by qPCR using the standard curve method (Fig. S1). The numbers in parentheses indicate the number of positive mice/number of mice tested. N.D.: not determined. OspC was measured by C10 peptide SPIE-IA. Data are presented as means  $\pm$  SEM (5 infected mice per group for tissues and 10 and 7 infected mice at 7 and 14 days respectively for plasma).

times less than in the immunoconcentration/western method, and that the LoD of the FlaB ELISA was estimated to be around  $1 \times 10^4$  sp/mL, FlaB in infected mouse samples was undetectable or unquantifiable.

Measurements of OspC in infected mouse tissues using the C10 peptide SPIE-IA are reported in Table 3. At 7 days p.i., near the site of inoculation, a very high level of OspC was measured, with an average of 400 ng/mg of skin. In distant tissues as in heart and ear, whereas a very low level of *Borrelia* DNA was detected by qPCR in some mice, up to 1.51 ng of OspC per mg of tissue was measured by immunoassay. At 14 days p.i., OspC was quantifiable in heart and ears with 98 pg–690 ng of OspC measured per mg of tissue depending on the mouse and tissue type. These results were corroborated by *Borrelia* DNA detection, but no correlation could be established between the DNA level and the very high-level OspC measured in some tissues. Possible explanations could be the heterogeneity of tissue sampling for DNA and protein samples or the heterogeneity of *Borrelia* OspC expression level in the host.

Figure 5C shows the level of OspC measured in plasma at 7 and 14 days p.i. All samples ( $n = 17$ ) were ELISA-positive, with a level of OspC varying from 0.5 to 14 ng/mL. Median OspC at 7 days p.i. was significantly higher than at 14 days p.i. ( $p$  value = 0.0185).

## Discussion

Currently, serological tests are recommended for the diagnosis of Lyme borreliosis<sup>4</sup>, although they present some serious limitations. Firstly, there is a time lag (up to 3 weeks) before detectable amounts of specific antibodies are produced by the host. Secondly, serological tests can demonstrate exposure to bacteria, but cannot prove an active infection or a reinfection<sup>14</sup>. Therefore, sensitive tests allowing direct detection of *Borrelia* or of components of *Borrelia* are needed. Until now, attempts using antigen capture to detect *Borrelia* antigens in blood and urine collected by non-invasive or minimally invasive sampling have not proven accurate enough and in some cases were even questionable<sup>14</sup>. The major difficulty in the detection of *Borrelia* in patient samples is the extremely low

level of circulating bacteria and their high antigenic inter- and intra-species variability. Moreover, the antigenic repertoire of *Borrelia* changes during the course of infection, which makes the situation still more complicated.

With the aim of developing a sensitive direct diagnostic immunoassay for early Lyme disease, we focused on the detection of two potential early circulating *Borrelia* markers: FlaB and OspC. FlaB is a highly conserved structural protein of the flagella and the outer surface protein C (OspC) is a lipoprotein with high sequence variability within and between genospecies<sup>27,28</sup> and is upregulated during the early phase of infection<sup>29</sup>. Since the capacity of an immunoassay to detect a target antigen with high sensitivity and specificity depends largely on the characteristics of the antibodies used, we decided to produce our own mAbs directed against either the FlaB protein or a highly conserved 10-amino-acid C-terminal peptide of OspC. This peptide was reported as a major immunodominant and probably surface-exposed epitope<sup>30</sup>, which makes it a good candidate as immunogen for production of anti-OspC antibodies. Throughout antibody screening, we paid particular attention to selection of specific and high-affinity antibodies. Of 20 anti-FlaB mAbs produced, two were selected as having the best affinity and optimal capacity to detect FlaB or different *Borrelia* strains by ELISA or immunoblot. Western blot detection was much more sensitive than ELISA in detecting *Borrelia*, with as few as ten bacteria detected per assay. For OspC, seven anti-peptide mAbs were produced, one of which, C10-11, displayed a remarkably high affinity for the recombinant OspC in the subnanomolar range.

Due to the high variability of OspC, the production of mAbs able to recognize OspC produced by all *Borrelia burgdorferi* s.l. is challenging. A least twenty five OspC major groups have been reported<sup>27,31</sup> within *B. burgdorferi* s.s.<sup>32</sup> with up to 30% divergence in amino acid sequence between OspC groups<sup>33</sup> and 58 OspC groups within the three species *B. burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*<sup>34</sup>. It was important to consider the variability in the C-terminal OspC epitope between *Borrelia* strains and to have an overview of their impact on the binding of the C10-11 mAb. This was accomplished by performing competitive binding experiments with various peptides corresponding to the C-terminal epitope of all known full-length OspC sequences of *Borrelia burgdorferi* s.l. available in the NCBI database. Comparison of the different 10-amino-acid C-terminals of OspC shows a difference of no more than two amino acids. We showed that the C10-11 mAb was able to bind seven different peptides representing more than 90% of *Borrelia burgdorferi* strains reported in the NCBI database. This suggests that less than 10% of *Borrelia burgdorferi* s.l. could not be detected with the C10-11 mAb. To ensure their detection, production of new antibodies directed against the different C10 peptide variants are ongoing in our laboratory.

Usually, in two-site immunometric assays the antigen is taken in a sandwich between two different antibodies recognizing two distinct epitopes. In the case of OspC, to ensure the detection of a maximum number of OspC groups, we developed a SPIE-IA targeting the C-terminal epitope of OspC. In buffer or in complex mouse tissue matrices, this assay has been shown to specifically measure OspC with a LoD ranging between 17 and 100 pg/mL (i.e. around 0.1 and 0.5 fmol per assay) according to the type of sample. This is the first time that an immunoassay has been described for OspC detection. As far as we know, only one study has reported direct detection and quantification of OspC in mouse or human skin matrices, with an estimated LoD of 1 fmol of OspC peptide per assay by liquid chromatography-mass spectrometry<sup>22</sup>.

One of the main problems with biomarkers present in extremely small quantities in tissues is that it is often necessary to enrich the target to make it detectable and to avoid matrix effects that can interfere with the assay. In this study, we set up an immuno-enrichment method with antibodies coupled to magnetic beads followed by western blot detection. The advantage of this method is that it is possible to analyze a larger amount of tissue than with other methods, such as immunoassays in microtiter plates, and to multiplex the detection of specific biomarkers while limiting the nonspecific signals. By combining the immuno-enrichment with anti-FlaB and anti-OspC mAbs, we were able to detect simultaneously as low as 10 bacteria (or 50 pg of recombinant FlaB protein) and 300 pg of recombinant OspC in one mL after western blot analysis in buffer or complex tissue matrices.

To evaluate the capacity of our immunological methods to detect OspC and FlaB in tissues and to investigate these two proteins as potential serum biomarkers for early human *Borrelia* infection, we used a mouse model of *Borrelia* infection after intradermal inoculation. At 7 days post-inoculation corresponding to the peak of replication at the injection site, we detected a high quantity of OspC between 7.2 ng/mg and 1.4 µg/mg of skin. These levels are consistent with our *Borrelia* DNA quantification in skin and the high level of OspC production reported in host-adapted spirochetes<sup>35</sup>. This is also consistent with the results of quantification of OspC by liquid chromatography-mass spectrometry in the skin of experimentally infected mice<sup>36</sup>, with an estimated 300 fmol of OspC (approximately equivalent to 6 ng) in 1 mg of skin biopsy. Taking into account the analytical sensitivity of western blot detection for OspC and FlaB protein, we clearly observed a higher level of OspC than FlaB in skin, ears and heart. Interestingly, in the disseminated phase we observed, in addition to monomeric and dimeric OspC, a lower molecular mass form of OspC in different tissues not found in in vitro cultivated *Borrelia*. Given that this form is recognized by the anti-C-terminal OspC mAb, it can be concluded that it corresponds to an N-terminal truncated form of OspC. There has been only one study reporting the western blot analysis of OspC protein expression in different tissues of infected mice<sup>37</sup>, with the detection of a unique OspC band by western blot. It is not surprising that the authors did not find the smaller form of OspC because the analysis was restricted to hydrophobic detergent-phase protein and thus to lipidated N-terminal forms of OspC.

More interestingly, we showed that it is possible to detect OspC and FlaB in the blood of infected mice. As in tissues, OspC was found to be much more predominant than FlaB in plasma. Furthermore, OspC is mainly represented by its lower molecular mass form with an apparent molecular weight of 20 kDa. At this stage of the study, we do not know if all or only a part of OspC detected in the plasma is physically bound to the bacterium. However, since OspC is anchored in the bacterial cell membrane via an N-terminal lipid, the smaller form of OspC could correspond to circulating OspC released by bacteria. The production of *Borrelia* antigen in plasma appears to culminate on day 7 p.i as compared to day 14 p.i, with an average level of OspC around 10 ng/mL of plasma. This early detection of *Borrelia* antigen in plasma is consistent with *Borrelia* detection by culture from infected mouse blood<sup>38</sup>, showing a peak of positive animals between 10 and 15 days p.i. This is also consistent

with the PCR detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood and positive blood culture for *Borrelia* in human patients in the early phase<sup>31,39</sup> or early disseminated phase<sup>40</sup>. As well as *Borrelia* DNA detection in blood by PCR, the detection of OspC protein in blood could be of use in diagnosis of early Lyme disease at the onset of clinical symptoms when serology testing has a poor diagnostic value.

In conclusion, this work presents the first direct detection of *Borrelia* antigen in infected animal plasma. The very sensitive immunodiagnostic tools described in this study may be of great interest for early direct diagnosis of Lyme disease using blood samples. The SPIE-IA OspC is a simple and rapid test that can be easily implemented in any clinical laboratory. It could be a useful complement to serological testing, particularly in the early phase of the disease when anti-*Borrelia* antibodies are missing. The next step would be to test a large cohort of patients with clinical symptoms to check the detectability of OspC in plasma and confirm the value of OspC as an early biomarker in blood. Furthermore, the antibodies and immune-affinity enrichment methods described in this work could be very usefully associated with methods of detection other than immunoblotting, such as mass spectrometry, to enhance their analytical performance.

## Materials and methods

**Strains and culture conditions.** Low passage (fewer than five passages) *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains (*Borrelia garinii* ATCC 51383, *Borrelia bavariensis* PBI (ATCC BAA-2496), *Borrelia burgdorferi* strain 297 (ATCC 53899), *Borrelia afzelii* BO23 (ATCC 51992), and *Borrelia burgdorferi* B31 (ATCC 35210) were grown in BSK-II medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 34 °C. The spirochetes were counted and motility was checked in a Neubauer chamber by dark-field microscopy.

**Ethics statements.** All animal experiments were performed in accordance with the European Directive 210/63/ECC on the protection of animals used for scientific purposes. Animals were housed in facilities authorized by the Veterinary Inspection Department of Essonne (France) (approval numbers D911272107 and D91272106). Animal care was supervised by a dedicated veterinarian and animal technicians. Experimental procedures were conform to the European Directive 210/63/EU and were approved by the Ethics Committee of the Commissariat à l'Énergie Atomique (CEtEA "Comité d'Éthique en Expérimentation Animale" No. 44) and by the French Ministry of Higher Education and Research under registration numbers APAFIS#11171-20177090615235646 v3 (for infection experiments) and APAFIS#3085-2015120909154560 v1 (for mouse immunization). All animal experiments were also performed in compliance with the ARRIVE guidelines.

**Production and purification of recombinant OspC and FlaB.** The OspC gene was synthesized (GeneCust, Boynes, France) based on the published sequence in GenBank: ABA42057.1. The synthetic gene was inserted between the *NdeI* and *XhoI* restriction sites of the IPTG inducible pET22b vector, allowing the expression of OspC with an N-terminal histidine tag. *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformed with OspC-pET22b was grown in Luria broth with 100 µg/mL ampicillin at 220 rpm and 37 °C until the mid-log phase was reached (OD at 600 nm = 0.6) and induced with the addition of 1 mM isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG) for 4 h at 37 °C. The culture was centrifuged for 20 min at 2500×g at 4 °C and cells were resuspended in binding buffer A (50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 300 mM NaCl) supplemented with 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzene sulfonfyl fluoride hydrochloride. The cells were disrupted by sonication (1 min at 14 W) and then centrifuged at 14,000×g for 20 min at 4 °C. The final supernatant was purified on pre-equilibrated nickel chelating Sepharose Fast flow (Cytiva, Vélizy-Villacoublay, France). After washing with binding buffer, elution of recombinant OspC protein was performed with binding buffer A supplemented with 0.5 M imidazole. The eluted fractions were pooled and dialyzed against 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl. Purified OspC recombinant protein was quantified using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and the purity was assayed by electrophoresis using the Protein 230 kit and the Agilent 2100 Bioanalyzer system. OspC was stored at -20 °C until use. Recombinant FlaB (synthetic gene based on the sequence published in GenBank: GU826786) was produced as described above for OspC, except that the binding buffer A was replaced by a denaturing buffer containing 100 mM potassium phosphate buffer, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 8 M urea, pH 8.

**Production of monoclonal antibodies (mAbs).** Four 12-week-old female *Biozzi* mice (bred in the animal care unit at CEA) were immunized by four intraperitoneal injections at 3-week intervals of 50 µg of FlaB protein mixed with alum adjuvant or 50 µg of C10 peptide: H-CPVVAESPCKK-O conjugated to bovine serum albumin (BSA)-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) mixed with alum adjuvant. The two mice presenting the highest antibody titer (see "ELISA method" below) were selected and received three intravenous injections of 50 µg of FlaB or C10-BSA. Two days after the last boost, hybridomas were produced by fusing spleen cells with NS1 myeloma cells and were subsequently cloned by limiting dilution as previously described<sup>41</sup>. Throughout the screening process and cloning steps, hybridoma culture supernatants were tested for the presence of anti-FlaB antibodies by ELISA. mAbs were produced in culture supernatant and purified by protein G affinity chromatography (HiTrap Protein G; GE Healthcare, Buc, France) using an AKTExpress system (Cytiva, Vélizy Villacoublay, France).

**Protein and peptide labeling.** mAbs and recombinant protein were labeled with biotin for use as conjugates. Briefly, 0.67 nmol of antibody dissolved in 400 µL of 0.1 M borate buffer pH 9 was reacted with 13.3 nmoles of biotin-N-hydroxysuccinimide ester (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dissolved in water-free DMF. After a 1-h reaction at room temperature (RT), 100 µL of 1 M Tris-HCl pH 8.0 was added for 1 h at RT. Finally, 500 µL of enzyme immunoassay (EIA) buffer (see "Composition" below) was added and this prepara-

tion was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. OspC10-peptide was conjugated to the tetrameric AChE enzyme (G4) as previously described<sup>42</sup>. Briefly, 2 nmol of C10 peptide-SH was reacted with 0.1 nmol of AChE-SMCC (maleido group inserted into AChE) in sodium phosphate buffer pH 6, 5 mM EDTA overnight at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The tracer C10 peptide-AChE was then purified by gel filtration on a Zeba spin desalting column 7 K MWCO (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

**Enzyme immunoassays.** To titrate anti-FlaB and anti-C10 peptide antibodies in mouse sera and in hybridoma culture supernatants, microtiter plates (MaxiSorp, Nunc) coated with goat anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, United Kingdom) at  $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  and blocked with EIA buffer (0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, containing 0.1% BSA, 0.15 M NaCl and 0.01% sodium azide) were prepared. Before use, plates were washed with washing buffer (10 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 and 0.05% Tween 20) and then  $50\text{ }\mu\text{L}$  of serum dilution or hybridoma culture supernatant was loaded per well and reacted for 2 h. After three washes, plates were reacted with  $50\text{ }\mu\text{L}$  per well of  $100\text{ ng}/\text{mL}$  of biotinylated FlaB or 1 Ellman unit (EU)/mL of AChE-labeled C10 peptide. For FlaB, plates were washed again and reacted with AChE-labeled streptavidin for 30 min<sup>43</sup>. After three washes, AChE activity was revealed by addition of Ellman's reagent<sup>44</sup>. For evaluation of the recognition of *Borrelia* by the antibodies, we used a direct ELISA. For this purpose, 96-well microplates (MaxiSorp, Nunc) were coated with  $100\text{ }\mu\text{L}$  per well of sonicated *Borrelia afzelii* BO23 at  $10^5$  sp/mL and then blocked with EIA buffer (0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, containing 0.1% bovine serum albumin (BSA), 0.15 M NaCl and 0.01% sodium azide) for at least 4 h at RT. Then  $50\text{ }\mu\text{L}$  of serum dilution or hybridoma culture supernatant was loaded per well and reacted for 2 h at RT. After three washes, plates were reacted for 2 h at RT with  $100\text{ }\mu\text{L}$  per well of 1 EU/mL of AChE-labeled goat anti-mouse antibodies. After three washes, AChE activity was revealed by addition of Ellman's reagent.

**SDS-PAGE and immunoblot analysis.** For western blotting, bacterial suspensions of different *Borrelia* strains or recombinant OspC and FlaB were suspended in Laemmli buffer containing 2% SDS and 2-mercaptoethanol, denatured for 5 min at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and run on SDS PAGE (10 or 13.4% resolving). Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane using the Trans-Blot turbo Transfer System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Briefly, the membrane was blocked with 5% BSA in phosphate buffer saline containing 0.1% Tween 20 (PBST). Each mAb labeled with biotin was diluted to  $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  in 1% BSA in PBST and reacted for 1 h at RT with the proteins transferred to the membrane. The membrane was subjected to three washes in PBST and incubated for 20 min at RT with 1:40,000 Pierce Streptavidin Poly-Horseradish Peroxidase (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) in 3% BSA in PBST. After four washes in PBST, the proteins were detected by chemiluminescence (ECL Prime, GE Healthcare, Buc, France), using the ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Western blots were analyzed using the ChemiDoc Touch Imaging System. Images are processed with Image Lab Touch Software version 2.2.0.08. All exposures used correspond to the optimal exposure of the system with optimal settings regarding resolution wait time.

**Combinatorial analysis.** To evaluate the best mAb pairs to be used in a two-site immunometric test for FlaB detection, a combinatorial analysis was carried out using each mAb either as capture or conjugate antibody using FlaB or a suspension of sonicated *Borrelia burgdorferi* as a target. Immobilization of the capture mAb in microtiter plates was performed by distributing  $100\text{ }\mu\text{L}$ /well of the antibody at a concentration of  $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  in 0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and incubating the plates overnight at RT. The plates were then saturated with EIA buffer for 4 h at RT, and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. Plates were then washed three times and  $100\text{ }\mu\text{L}$  of a suspension containing  $10^6$  spirochetes/mL of sonicated *Borrelia afzelii* or  $100\text{ }\mu\text{L}$  of a recombinant FlaB ( $10\text{ ng}/\text{mL}$  and  $1\text{ ng}/\text{mL}$ ) was loaded per well. After overnight incubation at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and three washing cycles,  $100\text{ }\mu\text{L}$  of biotin-labeled tracer mAb ( $100\text{ ng}/\text{mL}$ ) was added and reacted at RT for 4 h. Plates were washed, and after addition of  $100\text{ }\mu\text{L}$ /well of AChE-labeled streptavidin conjugate (2 EU/mL) were reacted at RT for 1 h. After three washes, AChE activity was revealed by Ellman's colorimetric method. A similar combinatorial analysis was performed for the selection of the best anti-C10 peptide antibody pairs using recombinant OspC (from  $100\text{ pg}$  to  $2\text{ ng}/\text{mL}$ ) and the SPIE-IA method.

**Solid phase-immobilized epitope immunoassay (SPIE-IA) for OspC detection.** The SPIE-IA method developed several years ago in our laboratory<sup>23</sup> allows the measurement of small molecules in a "two-site immunometric" format. This method is based on the use of a single epitope recognized successively by the capture antibody and the tracer antibody, and involves covalent cross-linking of the analyte to the solid phase.

Briefly, OspC samples were reacted with solid phase (96-well microplates; MaxiSorp, Nunc) coated with anti-C10-peptide mAbs for 2 h at RT. After a first washing step, the solid phase-bound OspC was cross-linked with the capture mAb using glutaraldehyde (0.1% for 5 min at RT) before a second washing step. Residual glutaraldehyde reactivity was neutralized and solid phase-bound proteins were denatured with borate trimethylamine ( $10\text{ mg}/\text{mL}$ ) in methanol/HCL (v/v). After a third washing step, biotinylated C10-11 mAbs were added at  $100\text{ ng}/\text{mL}$  and reacted for 2 h at RT. After a new washing step, solid phase-bound OspC was reacted with AChE-labeled streptavidin conjugate (home-made, 1 EU/mL) and then revealed with Ellman's reagent.

**Biolayer interferometry.** Antibody binding kinetics were measured using biolayer interferometry on an Octet Red96e from fortéBio (Sartorius, Fermont, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, anti-FlaB or anti-C10 peptide mAbs were loaded onto anti-mouse IgG Fc-capture (AMC) biosensors from fortéBio (Sartorius, Fremont, CA, USA) previously hydrated by immersion in an assay buffer (EIA 0.02% Tween20) for at least 10 min. Assays were performed with shaking at 1000 rpm and at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For  $K_D$  determination, each

mAb was loaded onto the sensor at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , following by a baseline step in EIA 0.02% Tween20 buffer. The sensors were exposed to different FlaB or OspC concentrations (from 200 to 5 nM) and association was measured for 300 s, followed by 10 min of dissociation in buffer. The sensor surfaces were regenerated by dipping in 10 mM glycine buffer at pH 1.3 for 20 s. Data analysis was performed using the Octet Data analysis software, version 10.0 (fortéBio LLC, Sartorius, Fremont, CA, USA). After reference sensor subtraction (sensor dipped in 0 nM of antigen), experimental data were fitted with the binding equations describing a 1:1 binding model. The association rate constant ( $k_a$ ), dissociation rate constant ( $k_{\text{dis}}$ ), and equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) were obtained. The  $K_D$  values were calculated as the ratio  $k_{\text{dis}}/k_a$ .

**Competitive ELISA.** The apparent affinity of anti-C10 peptide mAbs for different variants of C10 peptides and recombinant OspC was measured by competitive ELISA, using goat anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, United Kingdom) coated on the wells of a microtiter plate. A mix of anti-C10 peptide mAb (1 ng/mL), AChE-labeled C10 peptide (0.5 EU/mL) and different concentrations of competitor peptide or recombinant OspC were reacted overnight in the wells at 4 °C. After three washes, AChE-bound activity was revealed with Ellman's reagent for 1 h. The peptides synthesized by Genecust were >85% pure: PVVAESPCKP, PVVAEAPCKP, PVVAESPCKT, PVVAESPKNP, PVVAETPKP, PVVAENPKP, PVVVESEPKP, PVMAESPCKP, PVVAKNPCKP, PVVAKSPCKP, PVVAKTPCKP, PIVAESPKNP, PIVAESPCK.

**Infection of mice with *Borrelia burgdorferi* s.l.** Four-week-old female CB17scid mice from Janvier were subcutaneously infected with  $10^5$  *Borrelia afzelii* BO23 strain in BSK medium. In parallel, a negative control group ( $n = 5$ ) was injected with BSK medium. At 7 or 14 days post-inoculation mice (five mice per group at different times after infection) were sacrificed and the blood, heart, bladder, joints, skin at the inoculation site and ears were collected for DNA amplification and immunoassays. Two more mice were included in the study for plasma analysis at 14 days post-inoculation.

***B. burgdorferi* DNA detection in mouse tissues.** Mouse DNA extraction was performed using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The purified DNA was eluted with AE buffer (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA pH 9) in 200  $\mu\text{L}$  for each mouse organ and tissue. PCR was performed on each sample to amplify the 5S-23S intergenic spacer region. Amplification was performed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with a 20  $\mu\text{L}$  final volume containing 10  $\mu\text{L}$  Fast EvaGreen master mix, 400  $\mu\text{g}$  of BSA/ $\mu\text{L}$ , 500 nM of each primer RRC (5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGAG-3') and RRB (5'-AAGCTCCTAGGCATTCACCATA-3')<sup>45</sup> and 2  $\mu\text{L}$  of DNA samples. The PCR cycles were carried out with an initial denaturation for 3 min at 95 °C; 40 cycles of denaturation for 10 s at 95 °C, annealing for 30 s at 63.4 °C. After amplification, a melting curve was acquired by heating the product from 65 to 95 °C for 5 min. Melting curves were used to determine the specificity of the PCR. To determine the copy number of the target genes in the samples, a standard curve was established with known amounts of purified *Borrelia* DNA. The matrix effect of mouse DNA on the amplification of *Borrelia* DNA was checked and had no impact on the Cq values.

**Sample preparation—protein extraction.** Mouse tissues were collected in a clean tube with aseptic instruments and stored at  $-20$  °C until use. Tissue samples (15 mg) were placed in homogenizer tubes with two ceramic matrix CK28 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) and 300  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with protease inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Samples were processed with a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) using four cycles of 20 s at 6500 rpm. Then, samples were sonicated twice for 1 min. Samples were centrifuged for 10 min at  $15,000\times g$ , supernatants were collected and protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

**Immunocapture of OspC and FlaB combined with western blot analysis.** To improve the detection of both FlaB and OspC antigen in tissues and serum samples, we developed a concentration method based on immunoaffinity enrichment on magnetic beads (Dynabeads M-280 tosyl-activated, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) followed by western blot detection. First, we optimized tissue extraction by testing different extraction buffers and mechanical cell disruption conditions. The efficiency of extraction was checked by protein quantification (see "Methods").

The effectiveness of immunoconcentration experiments is an important factor for detection of low-abundance proteins, especially in complex matrices. To determine the optimal conditions for immunocapture of OspC and FlaB, we investigated different parameters, including (1) selection of antibodies bound to beads, (2) sample dilution, (3) time of immunocapture, and (4) washing step. The efficiency of immunocapture using the best conditions i.e. immunocapture of 0.5% tissue extract (W/V) or tenfold diluted plasma with FlaB15 and C10-11 mAbs for 1 h, three washes and elution in Laemmli buffer yielded over 90% of FlaB and OspC from 5 mg of tissues or 50  $\mu\text{L}$  of plasma.

Finally, Immunoprecipitation was performed as follows: mAbs (200  $\mu\text{g}$ ) were coupled to 10 mg of magnetic beads and saturated with BSA as recommended by the manufacturer. Samples (100  $\mu\text{L}$ ) were diluted tenfold with EIA buffer and incubated with 20  $\mu\text{L}$  of beads coupled to antibodies for 1 h at RT. After three washes with PBS-Tween, the beads were resuspended in 15  $\mu\text{L}$  of Laemmli buffer (without 2-mercaptoethanol). Incubation and washing steps were performed on a King Fisher Duo Prime robot (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and bound protein was analyzed by immunoblot.

**Theoretical limits of detection (LoD) and quantification (LoQ) of immunoassays.** For all immunoassay formats, LoD and LoQ were calculated using PRISM<sup>®</sup> software v.5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) with a nonlinear regression model using a two-site specific binding curve fit. LoD is defined as the lowest protein concentration giving a signal greater than the nonspecific binding calculated as the mean of 12 measurements of the buffer or unspiked matrix + 3 standard deviations. LoQ is defined as the lowest concentration of protein that can be quantitatively determined and is calculated as the mean of 12 measurements of the buffer or unspiked matrix + 10 standard deviations.

Received: 9 June 2021; Accepted: 3 August 2021

Published online: 30 August 2021

## References

- Hubálek, Z. Epidemiology of lyme borreliosis. *Lyme Borreliosis* **37**, 31–50 (2009).
- Mead, P. S. Epidemiology of lyme disease. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **29**, 187–210 (2015).
- Rauer, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and treatment in neurology—Lyme neuroborreliosis. *Ger. Med. Sci.* **18**, Doc03 (2020).
- Eldin, C. *et al.* Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Med. Mal. Infect.* **49**, 121–132 (2019).
- Steere, A. C. & Sikand, V. K. The presenting manifestations of Lyme disease and the outcomes of treatment. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2472–2474 (2003).
- Wormser, G. P. Clinical practice. Early Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2794–2801 (2006).
- Hyde, J. A. *Borrelia burgdorferi* keeps moving and carries on: A review of borrelial dissemination and invasion. *Front. Immunol.* **8**, 114 (2017).
- Steere, A. C. *et al.* Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Disease Primers* **2**, 1–19 (2016).
- Hofmann, H. *et al.* Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger. Med. Sci.* **15**, Doc14 (2017).
- Gocko, X., Lenormand, C., Lemogne, K., Bouiller, K. & Gehanno, J.-F. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French scientific societies. *Med. Mal. Infect.* **49**, 296–317 (2019).
- Talagrand-Reboul, E., Raffetin, A., Zachary, P., Jaulhac, B. & Eldin, C. Immunoserological diagnosis of human borrelioses: Current knowledge and perspectives. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **10**, 241 (2020).
- Raffetin, A. *et al.* Unconventional diagnostic tests for Lyme borreliosis: A systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.033> (2019).
- Leefflang, 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).
- Schutzer, S. E. *et al.* Direct diagnostic tests for lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* **68**, 1052–1057 (2018).
- Yang, S. & Rothman, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 337–348 (2004).
- Arvikar, S. L. & Steere, A. C. Diagnosis and treatment of lyme arthritis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **29**, 269–280 (2015).
- Quintero, J. A., Attah, R., Khianey, R., Capitle, E. & Schutzer, S. E. Arthritis and diagnostics in lyme disease. *Trop. Med. Infect. Disease* **6**, 18 (2021).
- Dorward, D. W., Schwan, T. G. & Garon, C. F. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1162–1170 (1991).
- Klempner, M. S. *et al.* Intralaboratory reliability of serologic and urine testing for Lyme disease. *Am. J. Med.* **110**, 217–219 (2001).
- Magni, R. *et al.* Application of Nanotrap technology for high sensitivity measurement of urinary outer surface protein A carboxyl-terminus domain in early stage Lyme borreliosis. *J. Transl. Med.* **13**, 346 (2015).
- Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I. & Wormser, G. P. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005).
- Schnell, G. *et al.* Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies infected by borrelia to investigate lyme disease. *Mol. Cell Proteom.* **14**, 1254–1264 (2015).
- Volland, H. *et al.* A solid-phase immobilized epitope immunoassay (SPIE-IA) permitting very sensitive and specific measurement of angiotensin II in plasma. *J. Immunol. Methods* **228**, 37–47 (1999).
- Earnhart, C. G. *et al.* Assessment of the potential contribution of the highly conserved C-terminal motif (C10) of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C (OspC) in transmission and infectivity. *Pathog. Dis.* **70**, 176–184 (2014).
- Mathiesen, M. J. *et al.* Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3474–3479 (1998).
- Volland, H., Pradelles, P., Taran, F., Buscarlet, L. & Creminon, C. Recent developments for SPIE-IA, a new sandwich immunoassay format for very small molecules. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**, 737–752 (2004).
- Wang, I. N. *et al.* Genetic diversity of ospC in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Genetics* **151**, 15–30 (1999).
- 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).
- Schwan, T. G. & Piesman, J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 382–388 (2000).
- Mathiesen, M. J. *et al.* The dominant epitope of *Borrelia garinii* outer surface protein C recognized by sera from patients with neuroborreliosis has a surface-exposed conserved structural motif. *Infect. Immun.* **66**, 4073–4079 (1998).
- Seinost, G. *et al.* Four clones of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto cause invasive infection in humans. *Infect. Immun.* **67**, 3518–3524 (1999).
- Barbour, A. G. & Travinsky, B. Evolution and distribution of the ospC gene, a transferable serotype determinant of *Borrelia burgdorferi*. *MBio* **1**, e00153-10 (2010).
- Earnhart, C. G., Buckles, E. L., Dumler, J. S. & Marconi, R. T. Demonstration of OspC type diversity in invasive human lyme disease isolates and identification of previously uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. *Infect. Immun.* **73**, 7869–7877 (2005).
- Baranton, G., Seinost, G., Theodore, G., Postic, D. & Dykhuizen, D. Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. *Res. Microbiol.* **152**, 149–156 (2001).
- Izac, J. R. *et al.* Analysis of the antigenic determinants of the OspC protein of the Lyme disease spirochetes: Evidence that the C10 motif is not immunodominant or required to elicit bactericidal antibody responses. *Vaccine* **37**, 2401–2407 (2019).
- Grillon, A. *et al.* Identification of *Borrelia* protein candidates in mouse skin for potential diagnosis of disseminated Lyme borreliosis. *Sci. Rep.* **7**, 16719 (2017).

37. Crother, T. R. *et al.* Antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection of SCID Mice. *Infect. Immun.* **71**, 3419–3428 (2003).
38. Barthold, S. W., Persing, D. H., Armstrong, A. L. & Peeples, R. A. Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am. J. Pathol.* **139**, 263–273 (1991).
39. Goodman, J. L. *et al.* Bloodstream invasion in early Lyme disease: Results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. *Am. J. Med.* **99**, 6–12 (1995).
40. Demaerschalck, I. *et al.* Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 602–608 (1995).
41. Frobert, Y. & Grassi, J. Screening of monoclonal antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase. *Methods Mol. Biol.* **80**, 57–68 (1998).
42. McLaughlin, L. L. *et al.* Development, validation and application of an enzyme immunoassay (EIA) of ariopeptin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 469–476 (1987).
43. Grassi, J. *et al.* Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunoassays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J. Immunol. Methods* **123**, 193–210 (1989).
44. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95 (1961).
45. Sertour, N. *et al.* Infection kinetics and tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mouse after natural (via ticks) or artificial (needle) infection depends on the bacterial strain. *Front. Microbiol.* **9**, 1722 (2018).

## Acknowledgements

We are greatfull to S. Gelhaye and M. Plaisance for their involvement in the production of the monoclonal antibodies. We also thank E. Yang for her help in the production of recombinant proteins, D. Marcé for her help in western blot analysis, N. Gaiani for his help in the optimization of qPCR and ML. Orisini Delgado for her assistance in the animal experiments. We are grateful to V. Choumet and E. Ferquel for their helpful advice concerning animal infections. V. Dolange was supported by a “CFR” (Contrat formation par la recherche) by CEA for her PhD thesis.

## Author contributions

V.D. and N.M. conceived and designed the experiments. V.D. and N.M. performed the experiments and analyzed the data. All authors contributed reagents/materials/analysis tools. V.D. and N.M. wrote the main text of the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96861-z>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to N.M.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

### 1.3 Discussion et conclusion de l'article

Cet article nous a permis de montrer l'intérêt potentiel de ces deux marqueurs pour le diagnostic de la Borréliose de Lyme.

Nous avons produit des anticorps monoclonaux soit dirigés contre la protéine FlaB soit contre le peptide hautement conservé en partie C-terminale d'OspC, le peptide C10.

Sur les 21 anticorps monoclonaux anti-FlaB produits au laboratoire, trois AcMs ont été sélectionnés, FlaB-15, FlaB-18 et FlaB-20, présentant les meilleures affinités pour FlaB recombinant ( $K_D$  de 0,23nM, 0,44nM et 2,10nM respectivement) et les meilleures capacités à détecter la protéine recombinante ainsi que les différentes souches de *Borrelia* par ELISA sandwich ou par western blot. La détection par western blot s'est avérée plus sensible que l'ELISA, avec une limite de détection de l'ordre de 10 spirochètes contre  $1 \times 10^3$  spirochètes (ou  $1 \times 10^4$  /mL) avec l'ELISA sandwich.

Pour OspC, sept AcMs anti-peptides ont été produits dont l'anticorps C10-11 qui présentent une forte affinité, de l'ordre du subnanomolaire, pour la protéine recombinante OspC. Nous avons ensuite évalué la capacité des anticorps C10-11 à reconnaître différentes espèces et souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Pour ce faire, nous avons réalisé des ELISA compétitifs afin d'évaluer l'impact de mutations de l'épitope C10 avec la liaison de l'anticorps C10-11. En mettant en relation les résultats obtenus avec l'analyse des séquences C-terminales d'OspC, nous avons montré que l'anticorps devrait pouvoir se lier à la protéine OspC issue de plus de 90% des espèces et souches de *Borrelia burgdorferi* rapportées dans la base de données NCBI, suggérant que moins de 10% des *Borrelia burgdorferi* sensu lato ne pourraient pas être détecté. Pour assurer la détection des 10% restant, nous avons entrepris la production de nouveaux anticorps dirigés contre les différents variants du peptide C10 qui n'étaient pas ou très peu reconnus par l'anticorps C10-11. Nous avons ainsi produit 15 anticorps monoclonaux anti-peptidiques contre le peptide PIVAESPKNP (souche *Bbss* 297), 25 AcMs dirigés contre le peptide PVVAETPKKP (*Bbav* PBi), 5 AcMs contre les peptides PVVAEAPKKP (*Bg* PBr) et PVVVEPKKP (*Bbss* ZS7). La caractérisation de ces anticorps est en cours.

Après la caractérisation des anticorps, nous avons développé deux méthodes de détection. D'une part, nous avons développé un dosage de type SPIE-IA ciblant l'épitope C-terminal d'OspC. La meilleure combinaison implique C10-11 en tant qu'anticorps de capture et en tant qu'anticorps traceur. En tampon ou dans différentes matrices biologiques, nous avons montré

que le dosage mesure spécifiquement OspC avec une LoD comprise entre 17 et 100 pg/mL (soit environ 0,1 et 0,5 fmol par dosage) selon le type d'échantillon.

À notre connaissance, une seule étude a rapporté la détection et la quantification d'OspC dans des biopsies de peaux humaines et de souris, avec une limite de détection estimée à 1 fmol d'OspC<sup>291</sup> par spectrométrie de masse.

D'autre part, nous avons développé une méthode d'immuno-enrichissement efficace (rendement d'immunocapture de 90%), utilisant des anticorps couplés à des billes magnétiques, suivie d'une détection par western blot. L'avantage de cette méthode est qu'il est possible d'analyser une grande quantité de tissus en minimisant les effets matrice pouvant interférer avec la détection. En effet, les composés dans les matrices biologiques peuvent affecter la liaison spécifique entre les anticorps et les cibles, entraînant éventuellement une diminution de la sensibilité et/ou de la spécificité de la détection. Il s'agit également d'une méthode qui peut facilement permettre une détection simultanée de plusieurs biomarqueurs dans un même échantillon en combinant l'utilisation d'anticorps de spécificités différentes. Dans le cas de notre étude, nous avons pu détecter simultanément par western-blot 10 bactéries (ou 50 pg de protéine FlaB recombinante) et 300 pg de la protéine recombinante OspC dans un millilitre d'échantillon.

Pour évaluer la capacité de nos méthodes immunologiques à détecter OspC et FlaB dans le cadre d'une infection à *Borrelia*, nous avons utilisé un modèle d'infection murin immunodéprimé, afin d'induire une infection persistante et disséminée, en inoculant la souche *B. afzelii* BO23 par voie sous-cutanée.

Par western blot, nous avons pu détecter OspC et FlaB dans différents tissus. À 7 jours pi, dans la peau proche du site d'inoculation, nous avons détecté OspC sous sa forme dimérique et monomérique ainsi que FlaB. Dans les autres tissus, aucune protéine n'a été révélée. À 14 jours pi, FlaB et l'OspC (sous sa forme dimérique et monomérique) ont été détectés dans la peau, le cœur et les oreilles tandis que la vessie, les articulations et la rate sont restées négatives. Il est intéressant de noter que dans la phase disséminée, nous avons constaté dans le cœur, la peau et les oreilles, la présence d'une autre forme d'OspC de masse moléculaire inférieure à la protéine entière (environ 20 kDa), que l'on ne retrouve pas un extrait de *Borrelia* cultivée *in vitro*. Étant donné que cette forme est reconnue par l'AcM C10-11, il est probable qu'elle correspond à une forme d'OspC tronquée en N-terminale. De façon intéressante, l'OspC monomérique est principalement représenté par sa forme tronquée dans le cœur et la peau. Plus

intéressant du point de vue du diagnostic, nous avons montré qu'il est possible de détecter OspC et FlaB dans le plasma de souris infectées par western blot à 7 jours pi.

Dans le plasma nous pouvons à la fois détecter OspC sous sa forme dimérique et sous sa forme tronquée. OspC est d'ailleurs principalement représentée par sa forme tronquée de 20kDa (à 95%). À ce stade de l'étude, nous ne savons pas si tout ou seulement une partie de l'OspC détectée dans le plasma est physiquement liée à la bactérie. Cependant, comme la protéine OspC est ancrée dans la membrane cellulaire bactérienne via un lipide N-terminal, la plus petite forme d'OspC pourrait correspondre à de la protéine circulante libérée par les bactéries.

La quantité de ces deux marqueurs a ensuite été analysée par immunodosage. Étant donné qu'une plus petite quantité de tissus peut être analysée par ELISA (dix fois moins qu'avec la méthode d'immunoconcentration) et que la limite de détection de l'ELISA pour détecter FlaB est estimée à  $1 \times 10^4$  sp/mL, la protéine FlaB n'a pas pu être détectée ni quantifiée dans les échantillons de souris infectées. Concernant OspC, à 7 jours post-inoculation nous avons pu estimé une quantité d'OspC entre 7,2 ng/mg et 1,4 µg/mg dans la peau au point d'inoculation, ces quantités sont cohérentes avec les résultats de quantification d'OspC dans la peau de souris infectées par spectrométrie de masse où l'estimation est d'environ 300fmol soit 6 ng/mg de biopsie de peau<sup>347</sup>. Concernant le plasma, la quantité d'OspC à 7 jours pi est d'environ 10 ng/mL contre environ 5ng/mL à 14 jours. Cette détection précoce avec un pic à 7 jours est cohérente avec ce que l'on retrouve dans la littérature montrant un pic d'animaux positifs en hémoculture avec la souche *Bbss* N40 entre le 10 et le 15<sup>ème</sup> jour pi<sup>348</sup>.

Compte tenu du niveau d'OspC présente dans le sang des animaux infectés et la possibilité de pouvoir détecter cette protéine avec une méthode de dosage simple et très sensible, la protéine OspC pourrait constituer un bon marqueur sanguin pour le diagnostic de la Borréliose de Lyme. Il faudrait bien sûr évaluer ce marqueur dans une cohorte de patients, dans différents fluides et à différents stades de la maladie. Des méthodes de dosages encore plus sensibles pourraient également être développées afin de détecter des quantités plus faibles d'antigènes, notamment chez l'homme. Un dosage de type « Simoa »<sup>349,350</sup> (*single-molecule array technology*) pourrait par exemple être envisagé. Il s'agit d'une technique de dosage ultrasensible, multiplexable, basée sur une technologie d'ELISA digitale sur billes avec une sensibilité de l'ordre du fg/mL soit un gain de sensibilité de 100 à 1000 comparé aux ELISAs classique ou le SPIE-IA développé ici.

En conclusion, cet article décrit pour la première fois un immunoessai très sensible pour la détection de la protéine OspC. De plus, il présente la première détection directe des antigènes OspC et FlaB dans le plasma d'animal infecté. Les outils d'immunodiagnostic très sensibles décrits dans cette étude peuvent être d'un grand intérêt pour le diagnostic direct précoce de la maladie de Lyme. Le SPIE-IA OspC est un test simple et rapide qui peut être facilement mis en œuvre dans n'importe quel laboratoire clinique. Il pourrait être un complément utile aux tests sérologiques, en particulier dans la phase précoce de la maladie lorsque les anticorps anti-*Borrelia* ne sont pas présents.

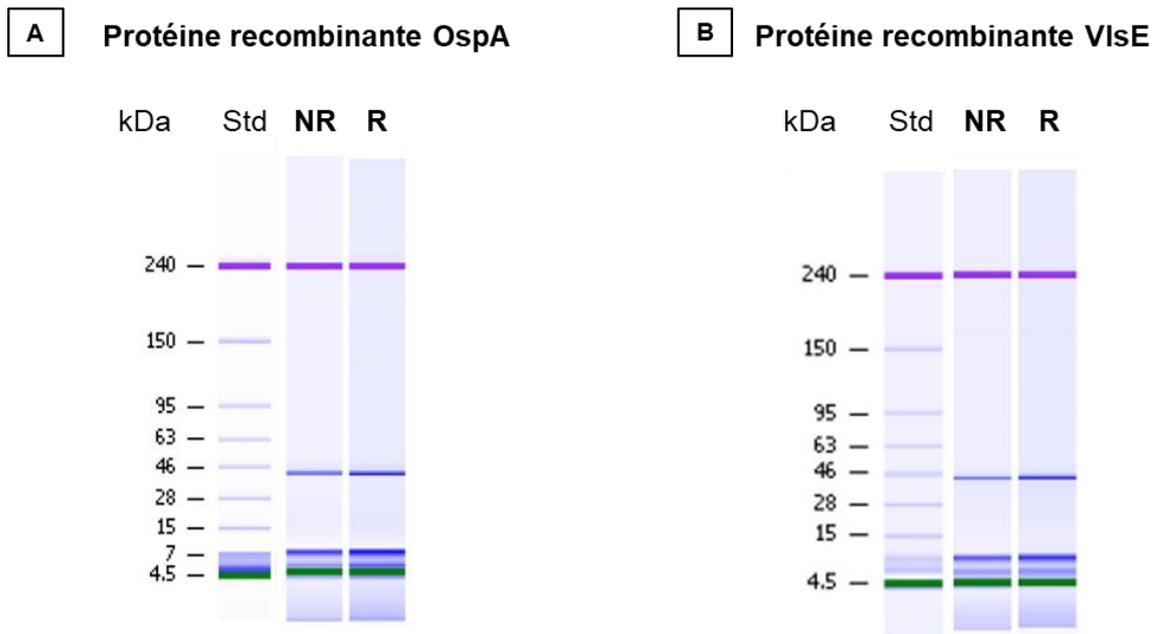
## **2. La production et le criblage des anticorps monoclonaux dirigés contre OspA et le peptide C6 de VlsE**

Pour évaluer l'intérêt des protéines OspA et VlsE pour le diagnostic de la maladie de Lyme, nous avons produit, comme précédemment pour FlaB et OspC, des anticorps monoclonaux contre OspA et contre le peptide C6 de VlsE puis développer des tests de détection.

### **2.1 La production des anticorps monoclonaux**

#### **2.1.1 La production des protéines recombinantes**

Les protéines recombinantes ont été produites et purifiées comme décrit dans la partie matériels et méthodes. Avant d'être injectées aux souris pour immunisation, la pureté des protéines d'intérêts (ici OspA) a été contrôlée par SDS-PAGE. En effet, si un contaminant est présent, le risque est de produire des anticorps dirigés contre ce dernier au détriment de ceux dirigés contre la protéine d'intérêt. L'analyse SDS-PAGE d'OspA (figure 40A) indique la présence d'une seule bande majoritaire proche du poids moléculaire théorique de 31kDa en condition réductrice et non réductrice avec un taux de pureté supérieur à 99%.

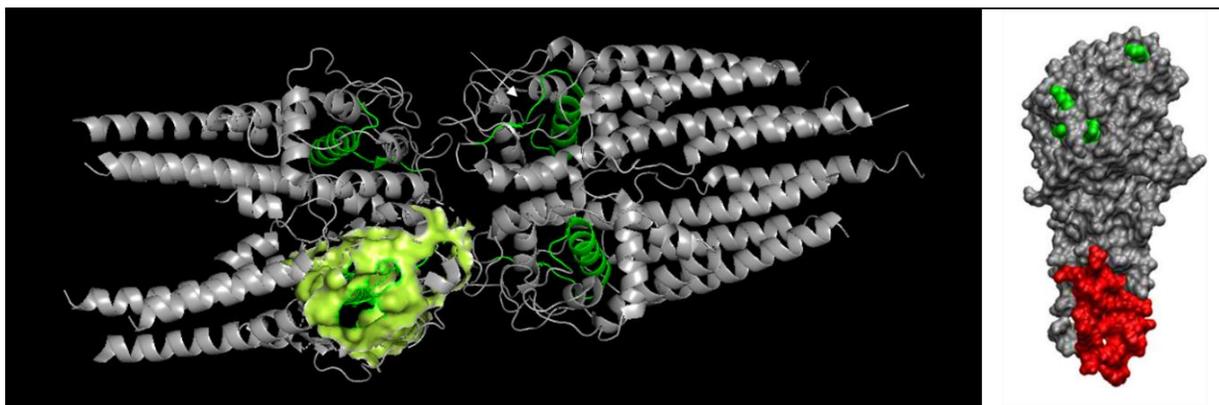


**Figure 40 : Analyse SDS-PAGE dans des protéines recombinantes OspA et VlsE.**

NR : condition non-réductrice et R : condition réductrice. Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa.

De la même façon, nous avons évalué la pureté de la protéine recombinante VlsE. En condition non-réductrice et réductrice, nous constatons la présence d'une seule bande majoritaire correspondant au poids théorique de VlsE de 35kDa. Le taux de pureté de cette protéine est également de 99 %. Cette protéine n'a pas été utilisée pour l'immunisation des souris, mais pour l'évaluation des anticorps monoclonaux.

Concernant la protéine VlsE, la comparaison de séquence entre les espèces est difficile en raison du système d'expression complexe de la protéine VlsE<sup>351</sup>. Comme décrit dans l'introduction, le gène *vls* qui code pour la protéine VlsE est constitué d'un site d'expression et de 15 cassettes silencieuses situées en amont de celui-ci. Des phénomènes aléatoires de recombinaison génétique surviennent lors de l'infection de l'hôte, conduisant à l'expression de différentes protéines VlsE<sup>156</sup>. La protéine de surface est cependant constituée de parties qui restent inchangées au cours de la variation antigénique et plutôt conservée entre les espèces et les souches<sup>352</sup>. Parmi ces régions dites invariables, on retrouve le peptide C6 (MKKDDQIAAAIALRGMAKDGKFAV)<sup>343</sup>. Ce peptide C6 est d'ailleurs utilisé dans des tests ELISA afin d'améliorer les performances (sensibilité et de spécificité)<sup>353</sup> des tests sérologiques. Comme montré dans la figure 41, nous remarquons que ce peptide C6 est relativement enfoui dans la protéine VlsE, malgré cela nous avons décidé d'utiliser ce peptide comme immunogène.



**Figure 41 : Structure tridimensionnelle de VlsE.**

Réalisé avec le logiciel PyMOL (issue de la structure IL8W de PDB de RCSB). Sur la structure de gauche est représenté l'environnement proche du peptide sous une forme de surface verte claire. La surface rouge représente la région proximale de la membrane bactérienne. En vert (montré par une flèche dans l'image de gauche) est représenté le peptide C6 au sein du tétramère observé par cristallographie<sup>354</sup>.

### 2.1.2 Couplage du peptide-C6 à la BSA-SMC

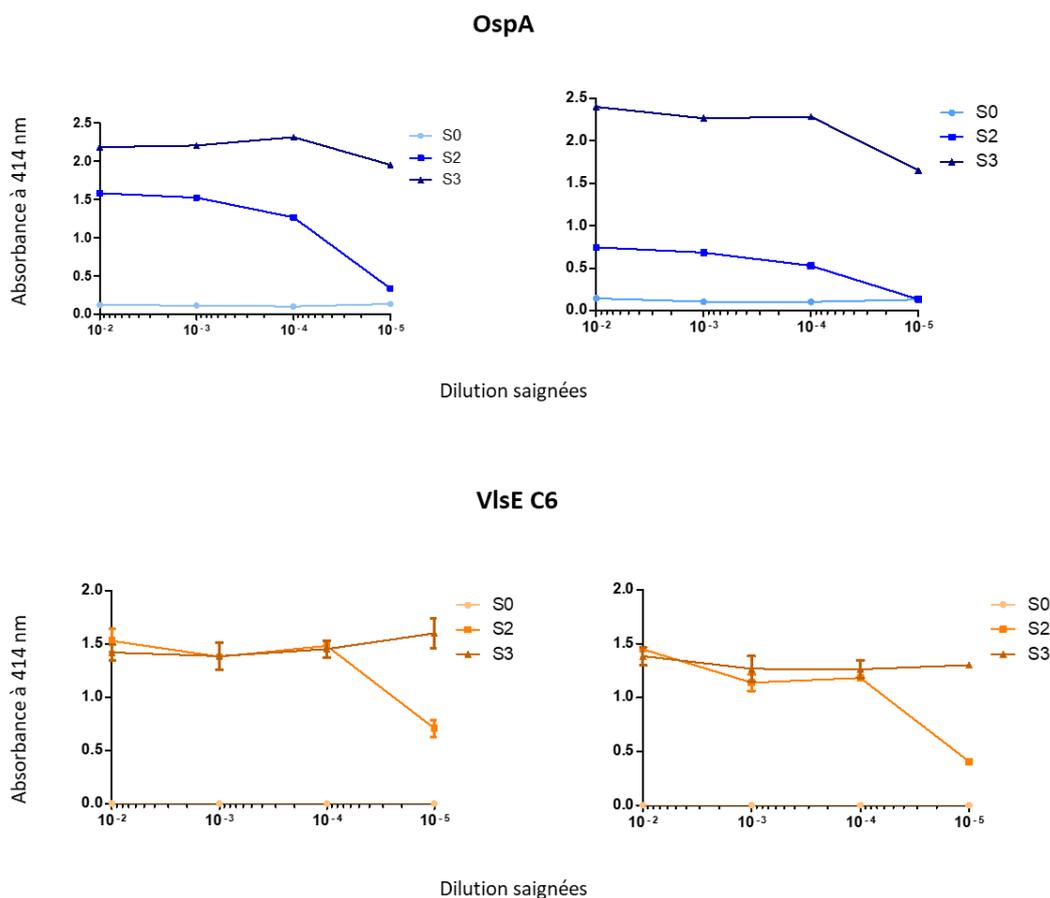
Pour l'immunisation, le peptide C6 : MKKDDQIAAAIALRGMKDGKFAV, avec un taux de pureté de 94,03%, a été couplé à une protéine porteuse, la BSA, afin de le rendre immunogène. Le couplage a été vérifié par analyse MALDI-TOF. En moyenne, 20 peptides ont été couplés par molécule de BSA-SMC.

### 2.1.3 Réponses immunitaires des souris immunisées

Pour produire les anticorps monoclonaux (AcMs) dirigés contre OspA et VlsE, des souris *Biozzi* ont été immunisées soit avec la protéine recombinante OspA produite dans *E. coli* soit avec le peptide C6 couplé à la BSA. Les souris *Biozzi* proviennent de l'animalerie du CEA de Saclay, elles sont issues d'une lignée sélectionnée pour leur production élevée d'immunoglobulines lors d'une réponse immunitaire<sup>355</sup>. Des prélèvements sanguins au cours du protocole d'immunisation et des dosages ELISA ont été réalisés afin de suivre l'évolution des réponses immunitaires.

Les réponses en anticorps polyclonaux spécifiques des animaux immunisés ont été mesurées au moyen d'un ELISA utilisant respectivement la protéine recombinante OspA biotinylée ou le peptide C6 couplé à l'AchE et d'un ELISA utilisant la bactérie *B. afzelii* BO23 immobilisée sur la phase solide.

Pour chaque immunisation, les deux souris présentant les meilleures réponses immunitaires (résultats présentés en figure 42) ont été choisies afin d'effectuer la fusion entre ses splénocytes et les cellules de myélome murin NS1.



**Figure 42 : Réponse immunitaire des souris immunisées avec la protéine OspA ou le peptide C6 de VlsE et sélectionnées pour la production des anticorps.**

Les saignées diluées en tampon EIA ont été testées en ELISA. Pour OspA, le test est réalisé à l'aide de la protéine biotinylée à 100 ng/mL et pour le peptide C6 à l'aide du peptide couplé à l'AChE à 0,75 UE/min/mL. S0 : saignée pré-immun, S2 : saignées après le 2<sup>ème</sup> rappel et S3 : saignées après le 3<sup>ème</sup> rappel. L'absorbance a été mesurée à 414nm après 30 min de réaction.

#### 2.1.4 La sélection des hybridomes

Afin d'identifier et sélectionner les hybridomes sécrétant les anticorps dirigés contre les cibles d'intérêts, les surnageants de culture ont été doublement criblés à l'aide de deux méthodes de dosages immuno-enzymatiques. Le premier criblage est réalisé avec la protéine recombinante biotinylée correspondante (OspA) ou avec le peptide-AchE pour VlsE et le second criblage est réalisé sur des bactéries entières immobilisées sur la phase solide (*B. afzelii* souche BO23, *B. burgdorferi* sensu stricto (souche B31) et *B. garinii* (souche CIP103362), afin de pouvoir sélectionner les anticorps reconnaissant les protéines endogènes de la bactérie. À l'issue du second criblage, seuls les hybridomes ayant la spécificité requise et un signal fort en ELISA ont été conservés.

Le nombre d'hybridomes sélectionnés à l'issue de ces deux criblages sont reportés dans les tableaux 8 et 9.

**Tableau 8: Résultats des criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps spécifiques d'OspA.**

Protéine	Nombre total d'hybridomes	1 <sup>er</sup> criblage (nbre d'hybridomes positifs)	2 <sup>ème</sup> criblage (nbre d'hybridomes positifs)			Nbre d'anticorps monoclonaux	
		OspA	1920	213 Reconnaissent la protéine recombinante OspA et <i>Ba</i> BO23	42 Reconnaissent la protéine recombinante OspA et <i>Ba</i> BO23		Dont 28 Reconnaissent aussi deux autres souches de <i>Borrelia</i> ( <i>Bbss</i> B31, <i>Bg</i> CIP 103362)

Pour l'antigène OspA, 42 hybridomes ont été sélectionnés au total pour leur forte réactivité avec la protéine recombinante ainsi qu'avec la souche *B. afzelii* BO23. Parmi les 42 hybridomes, 28 reconnaissent également les souches *B. burgdorferi* B31 et *B. garinii* CIP103362. Au cours des étapes de clonage, 2 hybridomes ont été perdus (mort des cellules, perte ou mutation du gène codant pour l'anticorps). Les 40 autres hybridomes ont été clonés et stabilisés avec succès.

**Tableau 9 : Résultats des deux criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps anti-peptidiques spécifiques contre la région C6 de la protéine VlsE.**

Peptide	Nombre total d'hybridomes	1 <sup>er</sup> criblage (nbre d'hybridomes positifs)	2 <sup>ème</sup> criblage (nbre d'hybridomes positifs)		Nbre d'anticorps monoclonaux
		C6	191	62 Reconnaissent le peptide C6	

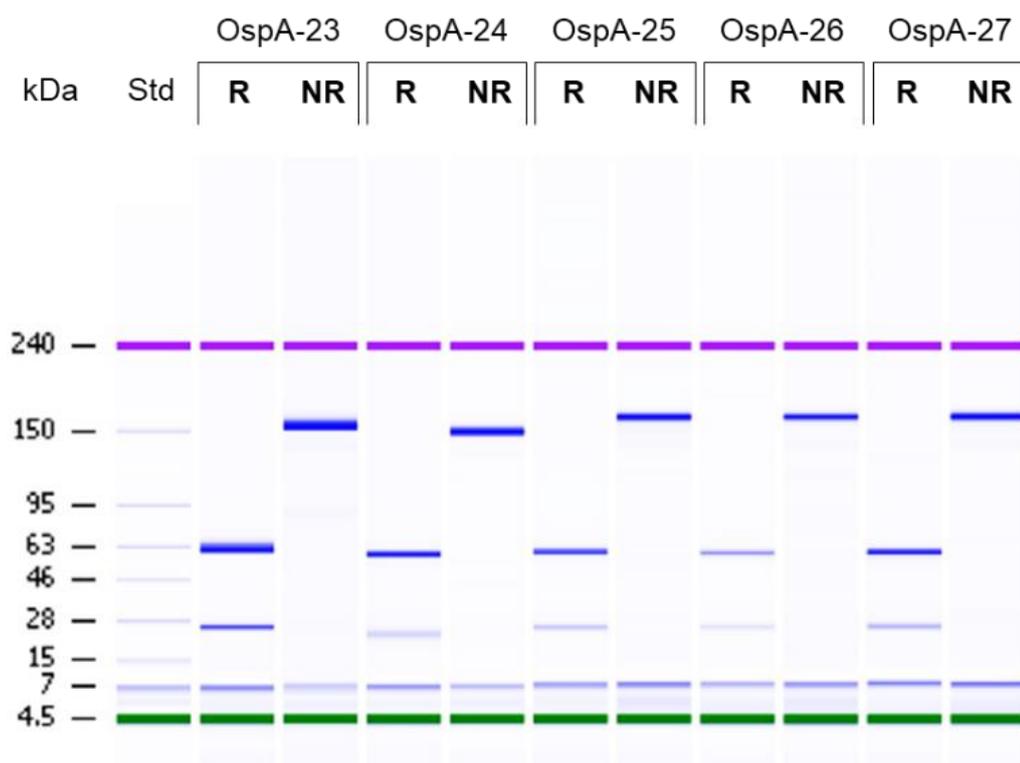
Pour les anticorps anti-peptidiques, nous avons finalement sélectionné 10 hybridomes capables de reconnaître le peptide C6 ainsi que la bactérie *B. afzelii* BO23. Un hybridome a également été perdu lors des étapes de clonage. Au final, nous avons obtenu 9 anticorps anti-peptide C6.

### 2.1.5 Production des anticorps monoclonaux en surnageant de culture et purification

Les anticorps monoclonaux ont été produits en surnageant de culture (100mL) puis purifiés par chromatographie d'affinité sur gel de protéine G.

La pureté et l'intégrité des anticorps purifiés ont été vérifiées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en condition non réductrice et réductrice.

En condition non-réductrice, on observe une bande unique à un poids moléculaire d'environ 150 kDa correspondant à l'anticorps entier. En condition réductrice, les ponts disulfures sont réduits et on observe deux bandes à 25 kDa et 50 kDa correspondant respectivement aux chaînes légères et aux chaînes lourdes. À titre d'exemple, l'analyse SDS-PAGE de 5 anticorps monoclonaux anti-OspA est illustrée en figure 43.



**Figure 43 : Analyse SDS-PAGE de cinq anticorps monoclonaux anti-OspA.**

NR : condition non-réductrice et R : condition réductrice. Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa.

La quantité de chaque anticorps monoclonal et l'isotype sont données dans les tableaux 10 et 11. Tous les anticorps ont été correctement produits avec un niveau de production compris entre 0,15 et 3,39 mg d'anticorps /100 mL de culture.

**Tableau 10 : Bilan des anticorps monoclonaux purifiés anti-OspA.**

Nom	Quantité (µg)	Concentration (mg/mL)	Isotype
OspA-1	2647	1,4	γ1 κ
OspA-2	1931	1,850	γ1 κ
OspA-3	1334	0,900	γ1 κ
OspA-4	980	0,630	γ1 κ
OspA-5	667	0,565	γ1 κ
OspA-6	1415	0,700	γ1 κ
OspA-7	2258	1,670	γ1 κ
OspA-8	3385	1,360	γ1 κ
OspA-9	2443	1,250	γ1 κ
OspA-10	1086	0,960	γ1 κ
OspA-11	2032	1,490	γ1 κ
OspA-13	973	0,594	γ1 κ
OspA-14	1793	1,130	γ1 κ
OspA-16	1878	1,341	γ1 κ
OspA-17	2066	1,626	γ1 κ
OspA-18	2608	1,961	γ1 κ
OspA-19	2266	1,511	γ1 κ
OspA-20	1875	1,259	γ1 κ
OspA-21	1420	0,699	γ1 κ
OspA-22	1531	0,990	γ1 κ
OspA-23	2761	1,972	γ1 κ
OspA-24	1649	1,397	γ1 κ
OspA-25	1643	0,960	γ1 κ
OspA-26	750	0,670	γ2b κ
OspA-27	922	0,801	γ1 κ
OspA-28	882	0,873	γ1 κ
OspA-29	2269	1,719	γ1 κ
OspA-30	967	0,640	γ1 κ
OspA-31	914	0,801	γ1 κ
OspA-32	471	0,409	γ1 κ
OspA-33	2556	1,740	γ1 κ
OspA-34	1041	1,001	γ1 κ
OspA-35	1991	1,350	γ1 κ
OspA-36	2928	1,712	γ1 κ
OspA-37	2245	1,560	γ1 κ
OspA-38	1695	1,246	γ1 κ
OspA-39	1514	1,121	γ1 κ
OspA-40	2621	1,659	γ1 κ
OspA-41	2140	1,486	γ1 κ
OspA-42	1581	1,069	γ1 κ

**Tableau 11 : Bilan des anticorps monoclonaux purifiés contre la région C6 de la protéine VlsE.**

Nom	Quantité (µg)	Concentration (mg/mL)	Isotype
C6-1	1581	0,930	γ1 κ
C6-2	506	0,440	γ1 κ
C6-3	252	0,450	γ1 κ
C6-4	702	0,650	γ1 κ
C6-5	233	1,370	γ1 κ
C6-7	746	0,710	γ1 κ
C6-8	794	0,640	γ1 κ
C6-9	712	0,890	γ1 κ
C6-10	146	0,560	γ1 κ

## 2.2 La caractérisation des anticorps monoclonaux

### 2.2.1 Les analyses combinatoires

Afin d'identifier les couples d'anticorps complémentaires et de sélectionner les meilleurs couples d'anticorps pour le développement d'un dosage immunométrique d'OspA et de VlsE, une analyse combinatoire pour chacune des deux séries d'anticorps monoclonaux a été effectuée, nous avons donc testé chaque anticorps monoclonal soit comme anticorps de capture, soit comme anticorps traceur.

#### *OspA*

L'analyse combinatoire des AcMs anti-OspA a été réalisée par ELISA sandwich en utilisant la bactérie *B. afzelii* à une concentration de  $5 \times 10^5$  sp/mL ainsi que la protéine recombinante OspA à 2ng/mL. Parmi les 1600 combinaisons, 84 combinaisons ont été capables de reconnaître avec un très bon signal à la fois la protéine recombinante (issue de la séquence de *B. afzelii*) et un extrait de *Borrelia* (tableau 12). Afin d'identifier les couples d'anticorps capables de détecter les souches représentatives des autres espèces de *Borrelia*, nous avons également réalisé une combinatoire avec les souches *B. burgdorferi* s.s. B31 et *B. garinii* CIP103362. Parmi les combinaisons positives sur *B. afzelii*, soixante l'étaient aussi avec les souches *Bbss* B31 et *B. garinii*.



**Tableau 13 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-VlsE.**

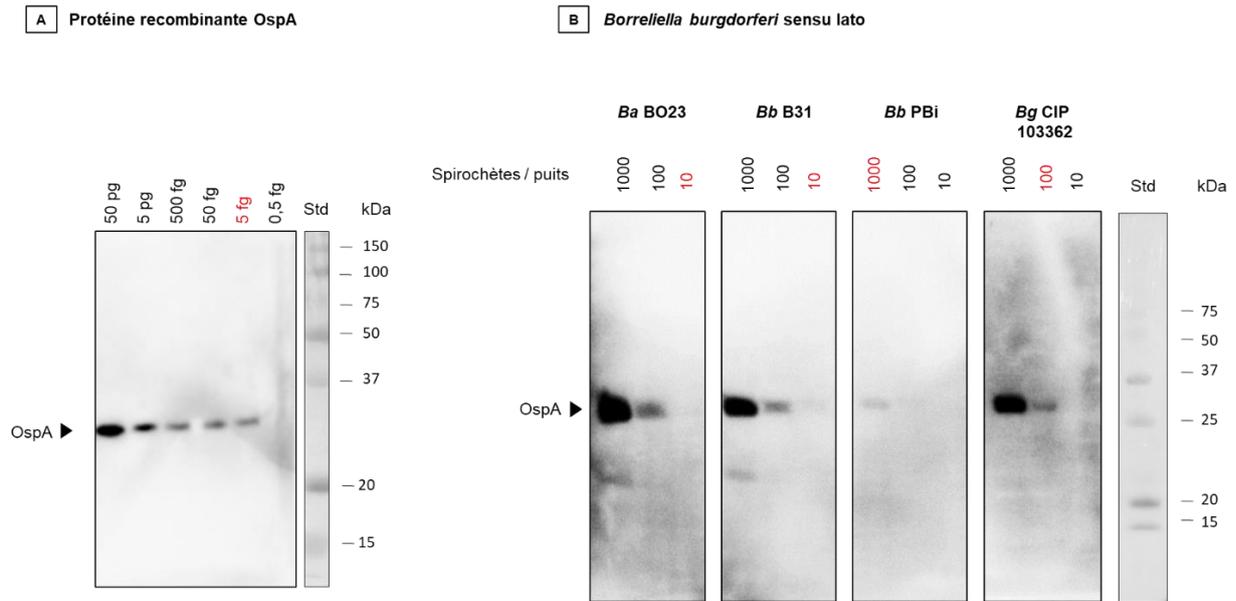
L'analyse combinatoire a été réalisée contre la protéine recombinante VlsE, utilisée à la concentration de 5 ng/mL. Les cases blanches correspondent aux AcMs donnant un signal (SS-NS) inférieur à 0,05. Les cases jaunes :  $SS-NS < 0,150$  ; les cases orange :  $0,150 < SS-NS < 0,200$  ; les cases rouges :  $0,200 < SS-NS < 0,250$  ; les cases rouges foncées :  $SS-NS > 0,250$ .

		Anticorps de capture									
		1	2	3	4	5	7	8	9	10	
Anticorps traceurs	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	7										
	8										
	9										
	10										

### 2.2.2 Détection par western blot

Dans le but de déterminer quels AcMs parmi les 40 AcMs anti-OspA et les 9 AcMs anti-C6 produits sont capables de détecter en western blot avec la meilleure sensibilité, un premier criblage a été réalisé à partir d'une concentration fixe en protéine recombinante et lysat bactérien.

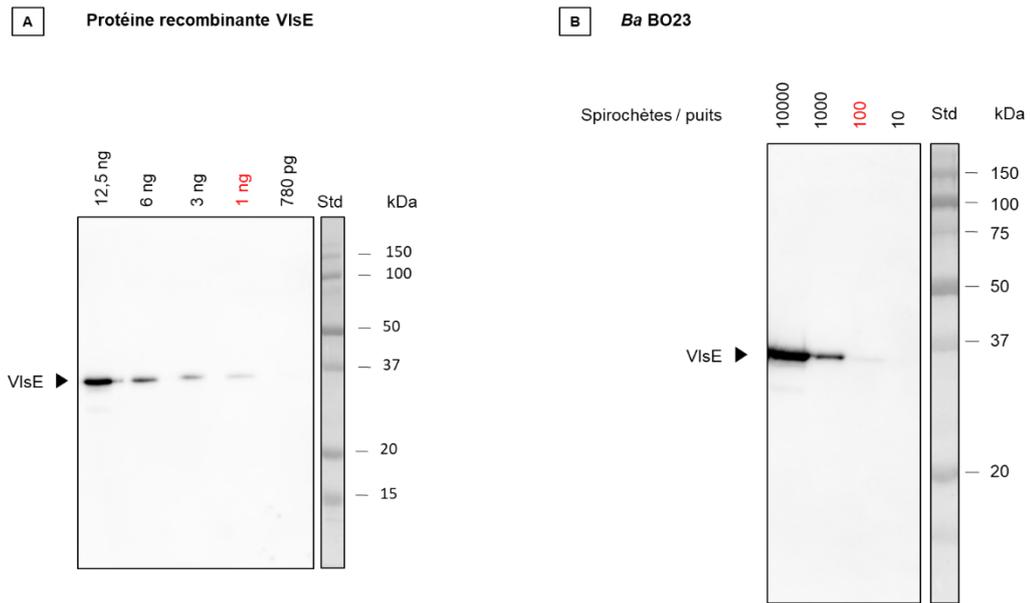
Après identification des meilleurs anticorps anti-OspA sur la protéine recombinante, nous avons évalué sa sensibilité de détection en western blot sur une gamme d'OspA et sur différentes souches de *Borrelia*. Les anticorps permettant d'atteindre les meilleures limites de détection sont OspA-22 et OspA-35. Comme montré dans la figure 44 pour l'anticorps Osp-35, une bande unique autour de 32 kDa, correspondant à la masse moléculaire d'OspA, a été observée. L'anticorps OspA-35 permet d'obtenir une détection très sensible de la protéine OspA avec une limite de détection de l'ordre de 5 fg par échantillon déposé et il permet de détecter 10 à 100 spirochètes selon la souche de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. et *B. garinii*). La détection de *B. bavariensis* PBI est moins sensible avec une détection minimale de 1000 spirochètes.



**Figure 44 : Détection d'OspA par western blot en utilisant l'anticorps OspA-35.**

(A) Gamme de protéine recombinante OspA de 50 pg à 0,5 fg par puits. (B) Diverses souches de *Borrelia* de  $10^3$  et 10 bactéries. Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa.

De la même façon, un criblage des anticorps anti-peptidiques C6, a été effectué sur la protéine recombinante et sur différentes souches de *Borrelia* à concentration fixe de  $2 \times 10^7$  sp/mL. Seuls les deux anticorps C6-4 et C6-7 reconnaissent toutes les espèces (ex. les trois souches testées) : *B. afzelii* BO23, *B. burgdorferi* s.s. B31, *B. bavariensis* PBi, *B. garinii* CIP 103362. Ces deux anticorps ont ensuite été évalués sur une gamme de recombinante et sur une gamme d'extrait bactérien issu d'une culture *in vitro*. L'anticorps C6-4 a présenté les meilleures sensibilités. Comme montré dans la figure 45, une bande unique de poids moléculaire apparent autour de 35 kDa est visible. La limite de détection est de 1 ng de protéine recombinante par puits (figure 45A) et de 100 bactéries pour la souche *B. afzelii* (figure 45B).



**Figure 45 : Détection de VlsE par western blot en utilisant l'anticorps C6-4.**

(A) Gamme de protéine recombinante VlsE de 12,5 ng à 780 pg par puits. (B)  $10^4$  à  $10^1$  bactéries de *Borrelia afzelii* (BO23). Std correspond au marqueur de poids moléculaire et les tailles des protéines sont indiquées sur le côté en kDa.

### 2.2.3 Les paramètres cinétiques de liaison des anticorps

Les mesures de l'affinité de liaison ( $K_D$ ) des AcMs ont été réalisées par « biolayer interferometry » (BLI) en utilisant les protéines recombinantes respectives. Les paramètres cinétiques des meilleurs anticorps anti-OspA (préalablement identifiés par ELISA et western blot), ainsi que les neuf anticorps dirigés contre le peptide C6 sont représentés dans le tableau 14.

Les meilleurs anticorps OspA (OspA-22 et OspA-35) ont présenté une forte affinité pour la protéine recombinante OspA, de l'ordre du nanomolaire.

**Tableau 14 : Paramètres cinétiques des anticorps monoclonaux pour les protéines OspA et VlsE.**

Les valeurs ont été déterminées par le logiciel Octet Data Analysis HT 10.0 en utilisant un modèle de liaison 1:1. Les données ont été extraites suite au « fitting » des courbes d'association et de dissociation (avec des dilutions successives d'antigènes 4 à 6). Les valeurs présentées correspondent à des moyennes  $\pm$  l'écart-type.  $K_D$  : constante de dissociation à l'équilibre,  $K_a$  : constante d'association,  $K_{dis}$  : constante de dissociation.

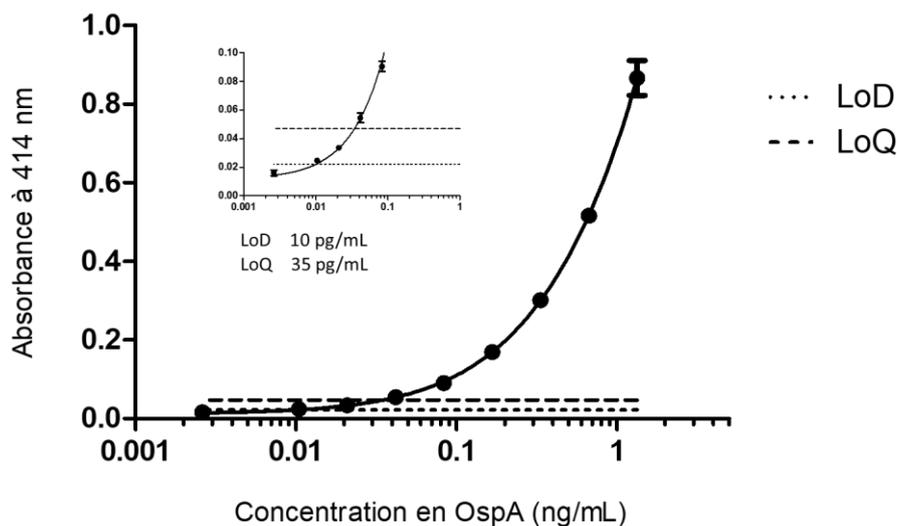
Antigène	Nom AcM	$K_D$ (M) $\times 10^{-9}$	$K_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) $\times 10^4$	$K_{dis}$ (s <sup>-1</sup> ) $\times 10^{-4}$
OspA	OspA-22	2,67 $\pm$ 0,027	2,69 $\pm$ 0,020	0,72 $\pm$ 0,005
	OspA-35	0,46 $\pm$ 0,004	13,58 $\pm$ 0,032	0,62 $\pm$ 0,005
VlsE	C6-1	21,57 $\pm$ 0,314	0,93 $\pm$ 0,011	2,01 $\pm$ 0,018
	C6-2	77,83 $\pm$ 3,019	0,42 $\pm$ 0,016	3,23 $\pm$ 0,028
	C6-3	47,37 $\pm$ 0,453	1,01 $\pm$ 0,009	4,90 $\pm$ 0,017
	C6-4	5,64 $\pm$ 0,032	3,17 $\pm$ 0,007	1,79 $\pm$ 0,009
	C6-5	22,16 $\pm$ 0,453	0,59 $\pm$ 0,009	1,30 $\pm$ 0,016
	C6-7	6,48 $\pm$ 0,063	2,34 $\pm$ 0,009	1,52 $\pm$ 0,014
	C6-8	21,49 $\pm$ 0,243	0,94 $\pm$ 0,008	2,02 $\pm$ 0,014
	C6-9	7,77 $\pm$ 0,131	1,10 $\pm$ 0,008	0,86 $\pm$ 0,013
	C6-10	12,81 $\pm$ 0,148	1,09 $\pm$ 0,008	1,40 $\pm$ 0,013

Les paramètres cinétiques des AcMs anti-peptides C6 sont également indiqués dans le tableau 14. Tous les AcMs ont été capables de lier VlsE recombinante avec une bonne affinité dont trois avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, ce qui suggère que l'épitope C6 est exposé à la surface de la protéine VlsE recombinante. Les AcMs C6-4, C6-7, C6-9 sont les plus affins pour VlsE, avec un  $K_D$  de 5,64 nM, 6,48nM et 7,78nM respectivement. Il est intéressant de noter que les anticorps les plus affins pour la protéine recombinante VlsE native sont également les anticorps qui ont été identifiés comme les meilleurs en western blot. Ceci suggère que l'épitope est probablement présenté de la même façon dans les deux techniques. Il est cependant important de mentionner que la protéine VlsE utilisée dans les tests d'affinité est une protéine recombinante produite sous forme dénaturée dans les corps d'inclusion d'*E. coli* puis repliée *in vitro*. Il n'est donc pas certain que la conformation de cette protéine recombinante soit identique à celle endogène de *Borrelia*.

## 2.3 Les tests immuno-enzymatiques ELISA et SPIE-IA

### 2.3.1 Test ELISA pour OspA

Les 15 couples d'anticorps, présentant les meilleurs signaux avec les trois espèces de *Borrelia* lors de l'analyse combinatoire, ont été évalués sur une gamme d'OspA recombinant ainsi que sur les trois espèces de *Borrelia* à différentes concentrations. Le meilleur couple dans tous les cas est OspA-22/OspA-35\* (anticorps OspA-22 utilisé en capture et l'anticorps OspA-35 en traceur). La limite de détection est de l'ordre de  $1 \times 10^4$  sp/mL pour les 3 espèces de *Borrelia*. La figure 46 présente la courbe standard d'OspA recombinante de 2 pg/mL à 1 ng/mL, ajustée à l'aide d'un modèle de régression non linéaire. Nous avons pu déterminer une limite de détection de 10 pg/mL et une limite de quantification de 35 pg/mL. Aucun effet matrice n'a été observé en plasma dilué 5 fois.

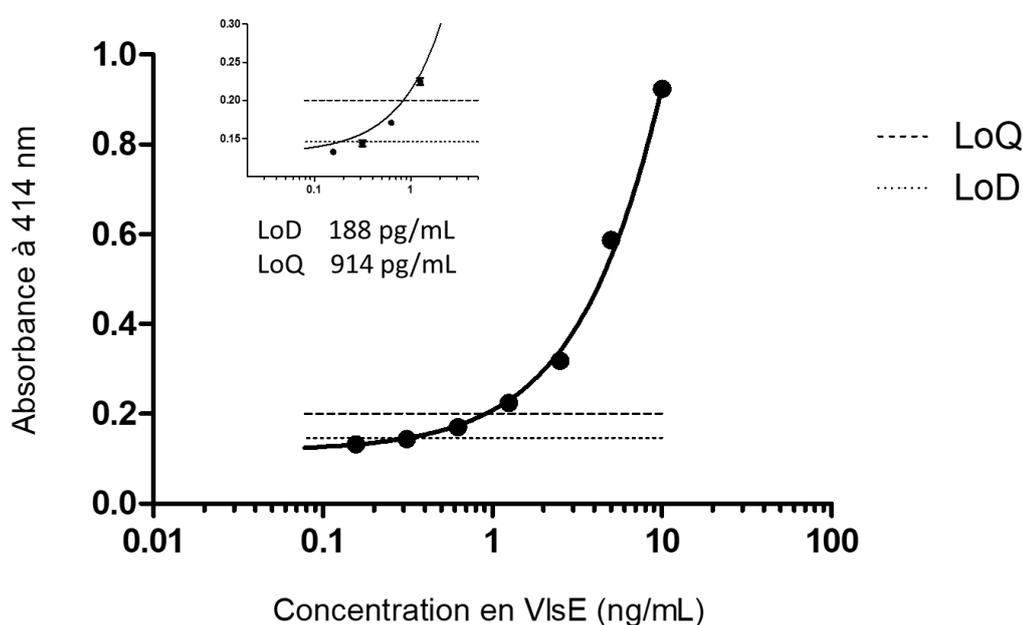


**Figure 46 : Courbe standard de l'ELISA sandwich OspA.**

Des dilutions en série de la protéine OspA ont été réalisées afin de déterminer la limite de détection et de quantification. La limite théorique de détection (LoD) et la limite de quantification (LoQ) sont indiquées par les fines lignes horizontales en pointillés représentant l'absorbance atteinte pour la limite de détection (moyenne du non-spécifique + trois écarts types) et la limite de quantification (moyenne du non-spécifique + 10 écarts types). Les points de données représentent les valeurs moyennes d'un doublon ( $n = 2$ ).

### 2.3.2 Test SPIE-IA pour VlsE

D'après l'analyse combinatoire, les quatre meilleurs couples d'anticorps impliquent les anticorps C6-4 et C6-7. Les quatre couples ont été évalués sur une gamme de VlsE recombinant (de 70 pg à 10 ng/mL) en tampon. La figure 47 montre la courbe standard du dosage le plus sensible, C6-4/C6-4\*, modélisée avec une régression non linéaire. Nous avons pu déterminer une limite de détection et de quantification de 188 pg/mL et 914 pg/mL respectivement. Par ailleurs, nous n'avons observé aucun effet matrice en matrice peau (extrait de peau à 0,05%) ou sérum dilué 5 fois.



**Figure 47 : Courbe standard du SPIE-IA VlsE.**

Des dilutions en série de la protéine VlsE ont été réalisées afin de déterminer la limite de détection et de quantification. La limite théorique de détection (LoD) et la limite de quantification (LoQ) sont indiquées par les fines lignes horizontales en pointillés représentant l'absorbance atteinte pour la limite de détection (moyenne du non-spécifique + trois écarts types) et la limite de quantification (moyenne du non-spécifique + 10 écarts types). Les points de données représentent les valeurs moyennes d'un doublon ( $n = 2$ ).

Nous avons également vérifié si le couple C6-7/C6-7\* est capable de reconnaître la forme native de VlsE en testant des lysats bactériens à différentes concentrations. Pour les deux souches testées, *Ba* BO23 et *Bbss* B31, une limite de détection de l'ordre de  $1 \times 10^5$  sp/mL a été obtenue, ce qui montre que le mAb C6-7 est capable de réagir avec la protéine VlsE endogène de ces 2 souches et que probablement l'épitope C6 est exposé à la surface de la protéine contrairement à une étude de Embers *et al.* (2007) qui conclut que le peptide immunodominant C6 est largement inaccessible aux anticorps dans la protéine VlsE<sup>356</sup>.

### ***III. Conclusion & perspectives***

Actuellement, les tests sérologiques sont recommandés pour le diagnostic de la Borréliose de Lyme bien qu'ils présentent de sérieuses limitations. Les tests présentent un manque de sensibilité dans la phase de précoce de la maladie en raison du délai d'apparition des anticorps spécifiques produits par l'hôte (entre 4 et 6 semaines). De surcroît, les tests sérologiques ne distinguent pas une infection passée et guérie d'une infection active ou d'une réinfection<sup>262</sup>. Par conséquent, des tests fiables et sensibles permettant un diagnostic direct de la maladie basée sur la détection de *Borrelia* sont nécessaires.

La difficulté majeure de la détection de *Borrelia* dans les échantillons de patients est le niveau extrêmement faible de bactéries circulantes et leur grande variabilité antigénique inter et intra-espèces. De plus, les antigènes de *Borrelia* changent au cours de l'infection, ce qui rend leur détection encore plus compliquée.

Afin d'évaluer l'intérêt de 4 marqueurs pour le diagnostic direct de la maladie de Lyme, nous avons développé des méthodes de dosages de ces protéines. Parmi ces quatre marqueurs, la flagelline et OspA sont des protéines relativement conservées entre les différentes souches de *Borrelia* contrairement à OspC et VlsE qui présentent une grande variabilité. Nous avons donc produit des anticorps monoclonaux selon deux stratégies, soit contre des protéines recombinantes dans le cas d'antigène conservé soit contre des peptides conservés dans le cas d'antigènes peu conservés. La caractérisation et la sélection des meilleurs anticorps monoclonaux, nous ont permis de développer des méthodes de détection immunologiques de type ELISA et western blot.

Dans le cadre des marqueurs FlaB et OspC, avec les 21 AcMs anti-FlaB et les 7 AcMs dirigés contre le peptide C10 d'OspC, nous avons développé des méthodes de détection très sensibles, avec par exemple une limite de détection pour OspC de 17 pg/mL d'échantillons par SPIE-IA. Pour détecter l'antigène FlaB, la limite de détection de l'ELISA sandwich est de l'ordre de  $1 \times 10^4$  sp/mL. Ces outils de détection ont ensuite été évalués et validés dans un modèle d'infection murin. Nous avons retrouvé ces deux marqueurs dans différents organes à 7 jours et 15 jours post-inoculation. Et surtout, nous avons pu détecter la présence de FlaB et d'OspC dans les plasmas de souris infectées. Il s'agit, là, de la première détection d'antigènes de *Borrelia* dans le plasma d'animaux infectés.

Par ailleurs, nous avons également produit des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine OspA et contre le peptide C6, région conservée de VlsE. Après caractérisation des 40 AcMs contre OspA et des 9 AcMs anti-C6, nous avons sélectionné les anticorps monoclonaux permettant d'atteindre les meilleures limites de détection et de reconnaître le plus de souches de *Borrelia*. Nous avons ainsi développé des tests très sensibles, capables de détecter jusqu'à 5 fg d'OspA par western blot et 10 pg d'OspA par mL d'échantillon par ELISA, en ce qui concerne VlsE nous sommes capables de détecter respectivement 1 ng par western blot et 188 pg de VlsE par mL d'échantillon par SPIE-IA. Ces outils restent cependant à évaluer sur un modèle murin, notamment sur un modèle d'infection plus tardif. En effet, la protéine OspA serait exprimée dans les phases plus tardives de la maladie, notamment dans les cas d'arthrite de Lyme<sup>357,358</sup>. Pour le moment, une étude préliminaire a été réalisée sur les plasmas (à 7 et 15 jours d'infection) de souris infectées à *B. afzelii* préalablement utilisées pour l'évaluation de FlaB et OspC. Sur les quelques échantillons à disposition, nous n'avons pas pu détecter la protéine OspA et VlsE. Ce qui est cohérent avec le fait que ces protéines seraient exprimées à un stade plus tardif.

Dans cette étude nous avons focalisé notre attention sur la détection de biomarqueurs dans le plasma, mais évidemment une détection sensible d'antigènes de *Borrelia* présente également un grand intérêt pour rechercher la présence de *Borrelia* dans des fluides comme le liquide articulaire ou céphalo-rachidien de patients afin de déterminer s'il s'agit d'une infection active à *Borrelia*.

Nous avons désormais à notre disposition tous les outils pour aller rechercher des protéines spécifiques de *Borrelia* dans différents fluides et tissus à différentes phases de la maladie. Ces anticorps monoclonaux nous permettent de couvrir le panel d'espèces de *Borrelia* responsables de la Borréliose de Lyme en Europe.

D'autre part, la méthode d'enrichissement et de concentration décrite dans ce travail peut également être très utile pour une la détection simultanée de ces quatre marqueurs dans un même échantillon. Cette méthode pourrait être également couplée à d'autres méthodes de détection que l'immunoblot, telle que la spectrométrie de masse, de façon à améliorer ses performances analytiques.

Pour poursuivre cette étude, il convient de terminer l'évaluation des marqueurs OspA et VlsE sur un modèle murin pertinent et d'évaluer l'intérêt des quatre marqueurs : FlaB, OspC, OspA et VlsE sur des échantillons humains.

# ***CHAPITRE III :***

## ***Analyse d'une cohorte d'échantillons de sérum humain***

## ***I. Introduction***

Les outils d'immunodiagnostic très sensibles décrits dans le chapitre précédent peuvent être d'un grand intérêt pour le diagnostic direct précoce de la maladie de Lyme, notamment à partir d'échantillons sanguins. En effet, nous avons vu que la protéine OspC pouvait être détectée à de forte concentration dans le plasma de souris infectées à des stades précoces. Le test SPIE-IA OspC, rapide et facile à mettre en œuvre, pourrait donc être un complément utile aux tests sérologiques, en particulier dans la phase précoce de la maladie lorsque les anticorps anti-*Borrelia* sont absents.

L'objectif de ce dernier chapitre est d'une part d'évaluer le test SPIE-IA OspC sur une cohorte de sérum de patients atteint de la maladie de Lyme et d'autre part de mettre au point une méthode de décomplexation d'immuno-complexe (IC) OspC/anticorps afin de pouvoir détecter la protéine OspC dans le sérum de patients ayant développé une réponse immunitaire dirigée contre OspC. La formation d'IC affecte la sensibilité des tests sérologiques et des tests antigéniques, car les anticorps et les antigènes engagés dans les complexes ne sont plus disponibles pour les tests. Dans le contexte de la maladie de Lyme, la formation d'immunocomplexes a été décrite dans plusieurs travaux. Plus précisément, des immunocomplexes impliquant des anticorps anti-*Borrelia* ont été détectés dans le sérum de patients sero-négatifs et sero-positifs atteint de la maladie de lyme active<sup>359,360</sup> et ainsi que des antigènes de *Borrelia*<sup>361,362</sup>.

Pour rechercher la présence d'OspC dans le sérum de patient, nous disposons d'une cohorte de 100 échantillons de sérum de patient non caractérisé testés pour une sérologie de Lyme (cf. Matériels et méthodes). Nous avons choisi de sélectionner principalement des patients positifs en IgM et négatifs en IgG (tableau 15) pour cibler des patients avec une infection plutôt précoce. Le statut clinique des patients n'étant pas connu, nous ne savons pas par exemple si les patients présentaient des symptômes ou s'ils avaient été déjà traités aux antibiotiques au moment du prélèvement. La collecte des sérums a été réalisée entre mai et septembre 2019 en France métropolitaine (seulement deux échantillons étant de Martinique et de Monaco).

**Tableau 15 : Résultats des tests ELISA sérologiques réalisés par le laboratoire Cerba Xpert.**

<b>IgG</b>	81 échantillons négatifs	2 échantillons douteux	17 échantillons positifs
<b>IgM</b>	8 échantillons négatifs	1 échantillon douteux	91 échantillons positifs

Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence d'anticorps contre la cible OspC et le peptide C10 dans les échantillons de sérum afin de justifier l'utilisation d'une méthode de décomplexation avant le dosage de l'antigène OspC. Ensuite nous avons développé une méthode de décomplexation d'IC OspC/anticorps. Puis enfin nous avons testé par SPIE-IA OspC les sérums avant et après décomplexation.

## ***II. Résultats et discussion***

### **1. Dosage ELISA des anticorps IgM et IgG des patients dirigés contre OspC et la région C10**

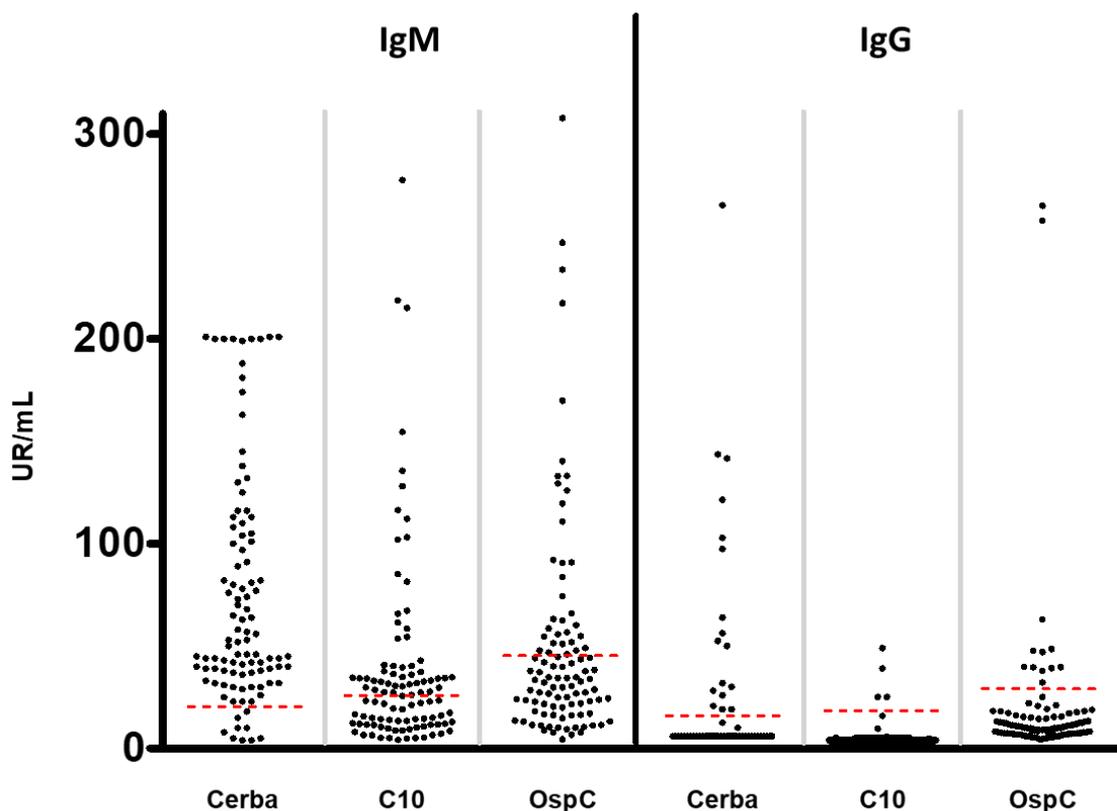
Après avoir développé des dosages ELISA pour la détection d'anticorps IgM et IgG dirigés contre OspC et la région C10 (cf. Matériels et méthodes), nous avons testé 44 échantillons de patients négatifs et les 100 échantillons de la cohorte Lyme. Le seuil de positivité des dosages ELISA IgG et IgM spécifiques dirigés contre la protéine recombinante OspC (qui contient le peptide C10) et le peptide C10 a été déterminé à partir des 44 échantillons de sérums négatifs (donneurs potentiellement « sains ») et correspond à la moyenne de leur absorbance + 3 écarts types. Afin d'uniformiser les valeurs d'absorbances obtenues avec les valeurs des tests de sérologie Lyme (test IgM Euroimmun et test IgG Siemens, unités relatives/mL), nous avons affecté un facteur 200 aux valeurs d'absorbances obtenues.

**Tableau 16 : Seuil de positivité pour les différents dosages ELISA des réponses en IgG et IgM.**

Les seuils ont été obtenus à partir de l'analyse de 44 échantillons négatifs avec les différents tests ELISA. Le seuil de positivité correspondant à l'absorbance moyenne des sérums négatifs + trois écarts types. Pour se rapporter aux échantillons Cerba Xpert, l'absorbance à 414nm a été multipliée par 200. Les seuils sont exprimés en UR (unités relatives) /mL.

Seuil de positivité	Cerba	C10	OspC
IgG	14	16,42	29,48
IgM	22	26,89	44,21

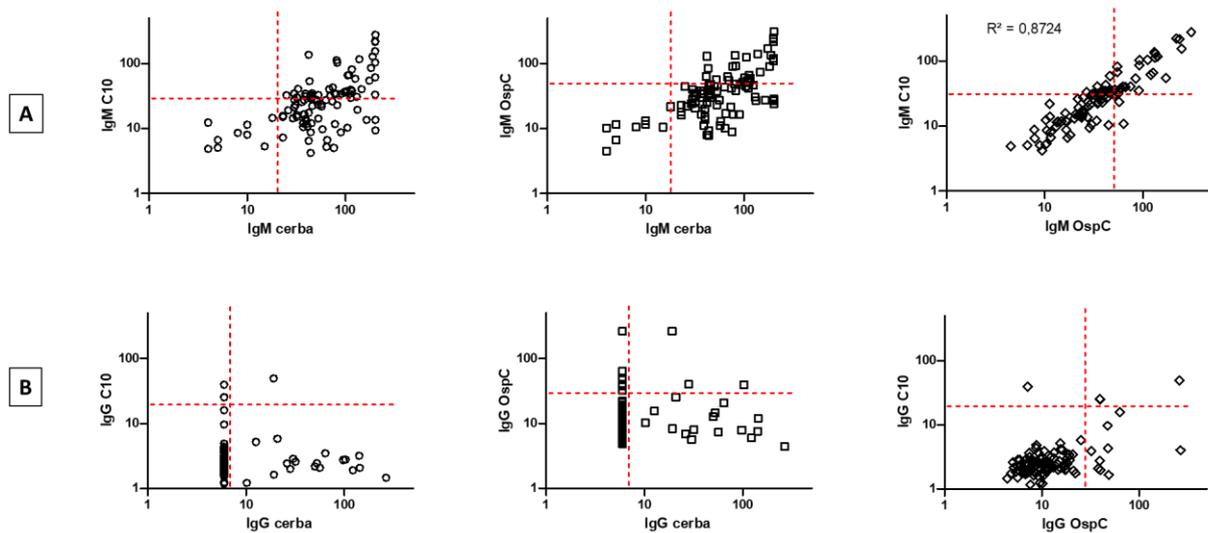
Comme montré dans la figure 48, 50% et 4% des échantillons de sérums de la cohorte sont positifs avec les tests IgM et IgG anti-peptide C10, respectivement. En ce qui concerne OspC, 36% et 12 % des patients sont positifs en anticorps IgM et IgG, respectivement.



**Figure 48 : Distribution des titres en IgG et IgM dans les sérums de patients.**

Les lignes en pointillé rouges représentent les seuils de positivité des ELISA. Les données sont exprimées en UR (unités relatives) /mL.

Des corrélations ont été réalisées entre les résultats obtenus avec les dosages des anticorps anti-OspC, anti-peptide C10 et les dosages d'Euroimmun pour les IgM et Siemens pour les IgG. Les résultats sont représentés ci-dessous dans la figure 49.



**Figure 49 : Corrélation entre les mesures d'IgM et d'IgG dirigés contre la protéine recombinante OspC et/ou le peptide C10.**

(A) Corrélations entre les niveaux d'IgM mesurés chez les patients avec le test Euroimmun (utilisant des antigènes de lysats bactériens de *Bb sensu stricto*, *B. afzelii* et de *B. garinii*) et les ELISA OspC et C10, (B) corrélations entre les niveaux d'IgG. Pour les tests Euroimmun et Siemens dont le taux d'IgG est sous le seuil de positivité (<7), nous avons attribué la valeur de 6. Les lignes en pointillé rouges représentent les seuils de positivité des ELISA.

Une très forte corrélation,  $R = 0,9340$ , (corrélation de Pearson) (95% CI 0,9033-0,9552) est observée entre les niveaux d'IgM dirigés contre le peptide C10 et ceux dirigés contre la protéine recombinante OspC, suggérant que la partie C-terminal d'OspC est un épitope immunodominant d'OspC chez ces patients comme montré dans plusieurs études américaines et européennes<sup>363,364</sup>. L'ELISA C10 apparaît plus sensible que l'ELISA OspC avec la détection de 14 patients supplémentaires. Ceci peut s'expliquer en partie par une meilleure sensibilité analytique liée à l'utilisation de la BSA couplée à de multiples épitopes C10 au lieu d'un seul épitope C10 par molécule OspC.

Les niveaux d'IgM dirigés contre le peptide C10, OspC et ceux mesurés avec le test Euroimmun sont également corrélés ( $R$  de 0,6052 et 0,6523 respectivement avec la corrélation de Pearson), mais 41 patients positifs avec le test Euroimmun (IgM anti-*Borrelia burgdorferi*) sont négatifs avec le peptide C10.

Au contraire, aucune corrélation n'a été observée entre les mesures d'IgG dirigés contre le peptide C10 ou OspC et ceux mesurés avec le test Siemens (IgG anti-*Borrelia burgdorferi*) (figure 49B). Parmi les 17 échantillons positifs en IgG avec le test Siemens, 3 sont positifs avec la protéine OspC et seulement 1 avec le peptide C10.

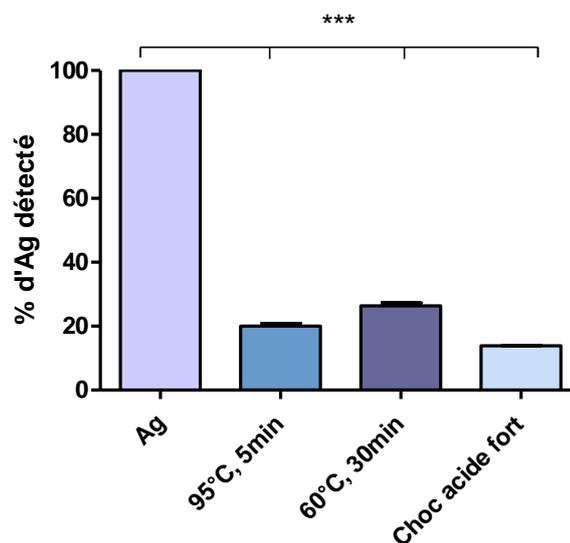
Cependant, il existe une corrélation entre les IgG dirigées contre le peptide C10 et celles dirigées contre la protéine recombinante OspC (R de Pearson de 0,5244).

Étant donné que 50% des patients testés sont positifs en ELISA IgM ou IgG sur le peptide C10 ou la protéine OspC, il est clairement justifié de procéder à une étape de décomplexation des immuno-complexes (IC) avant de réaliser le dosage SPIE-IA OspC sur la cohorte.

## 2. Mise au point d'une méthode de dissociation de complexes immuns impliquant l'épitope C10 d'OspC

Afin de détecter la protéine OspC potentiellement engagée dans des immunocomplexes<sup>365-368</sup>, nous avons développé un protocole de traitement de l'échantillon permettant la détection de la cible recherchée dans le sérum de patients. Pour ce faire, nous avons comparé l'effet de différents traitements sur un mélange d'OspC et d'anticorps AcM C10 pour la détection d'OspC par SPIE-IA.

Dans un premier temps, nous avons contrôlé l'effet de divers traitements sur l'immunoractivité (reconnaissance par le dosage SPIE-IA) d'OspC ajoutée à du sérum. Les résultats présentés dans la figure 50 montrent que la protéine recombinante seule est assez sensible aux différents traitements, avec une perte de réactivité allant de 73,6% à 86,2% selon les traitements.



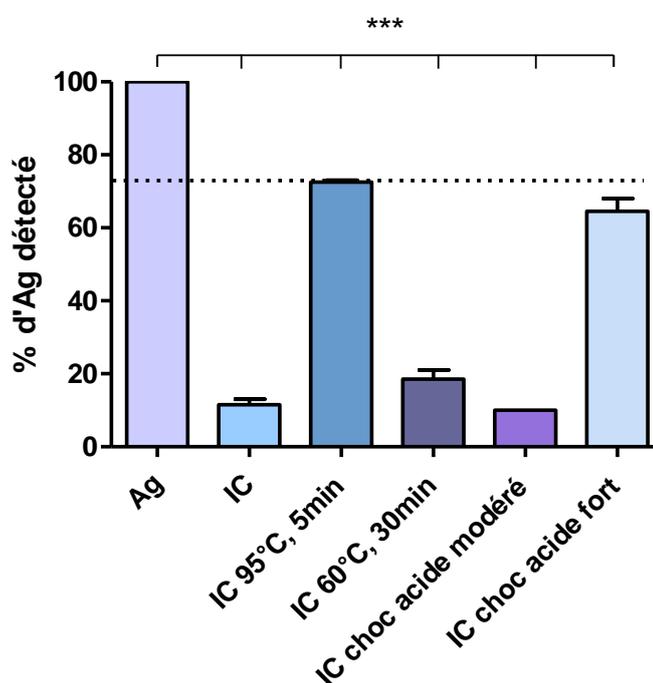
**Figure 50 : Effet de divers traitements sur l'antigène OspC.**

L'antigène OspC (6 ng/mL) a été ajouté à du sérum négatif. Après traitement, les échantillons ont été dosés par la technique du SPIE-IA avec l'AcM C10-11 en tant qu'anticorps de capture et traceur. Ag : antigène. Les données ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey. \*\*\*p<0.001. # p<0.05 (unpaired t-test).

Nous avons ensuite évalué l'effet des différents traitements sur la détection d'OspC engagée dans des IC mAb C10/OspC, formés artificiellement (cf. Matériels et méthodes). Les échantillons traités et non traités ont été analysés par dosage SPIE-IA OspC. Comme montré dans la figure 51, en présence d'anticorps, le signal de détection d'OspC diminue de 90% dû à de la formation d'IC. Après un traitement thermique fort de 5 min à 95°C ou un traitement acide fort (pH 3), on récupère un niveau d'immunoréactivité associé à OspC estimé à 72,5% et 64,5% respectivement. Au contraire, un traitement thermique de 60°C pendant 30min et un traitement acide modéré (pH 5) ne semble pas avoir d'effet sur l'immunoréactivité d'OspC et donc sur l'IC.

Nous pouvons remarquer que la formation du complexe immun permet de protéger OspC face aux différents traitements. En effet, il ne reste environ que 20% de signal après un traitement de 5 min à 95°C de l'OspC seul alors que lorsqu'il est complexé on atteint un signal de 72,5% après traitement.

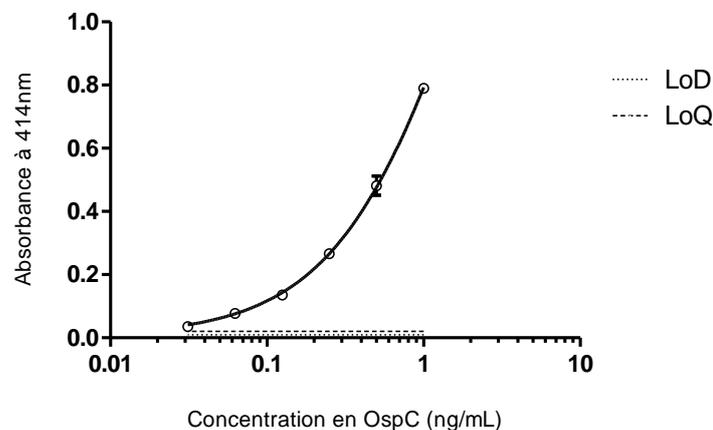
La meilleure condition de décomplexation correspond donc à une dilution du sérum au 1/2 dans de l'eau, suivi d'un chauffage de 5min à 95°C.



**Figure 51 : Effet de divers traitements sur l'antigène OspC complexé avec l'anticorps C10.** L'antigène OspC (40 ng/mL) et/ou l'AcM C10 (10 µg/mL) ont été ajoutés à du sérum négatif. Après traitement, les échantillons ont été dosés par SPIE-IA OspC ; IC : complexes immuns. Les données ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey. \*\*\*p<0.001. # p<0.05 (unpaired t-test).

### 3. Dosage SPIE-IA OspC des échantillons de sérum de patients Lyme après traitement pour décomplexer les IC

Afin d'évaluer l'effet matrice d'un sérum chauffé sur la détection d'OspC, une courbe standard a été réalisée en SPIE-IA OspC à partir d'une gamme de protéine recombinante d'OspC allant de 31 pg/mL à 1 ng/mL, ajoutée à du sérum traité et dilué au 1/2. La limite de détection a été estimée de l'ordre de 15 pg/mL (figure 52), ces résultats montrent que la sensibilité obtenue est équivalente à celle obtenue dans le plasma de souris (17 pg/mL de sensibilité soit environ 85 attomol) (cf. chapitre II). Nous pouvons conclure qu'il n'y a pas d'effet matrice lié au plasma humain traité.



**Figure 52 : Courbe étalon obtenue par SPIE-IA pour la détection OspC dans le sérum dilué au 1/2 après un traitement thermique 5min à 95°C.**

Des dilutions en série de la protéine OspC ont été réalisées dans du sérum humain négatif dilué au 1/2 dans de l'eau et ayant subi un traitement thermique 5min à 95°C. La limite théorique de détection (LoD) et la limite de quantification (LoQ) sont indiquées par les fines lignes horizontales en pointillés représentant l'absorbance atteinte pour la limite de détection (moyenne du non-spécifique + trois écarts types) et la limite de quantification (moyenne du non-spécifique + 10 écarts types). Les points de données représentent les valeurs moyennes d'un doublet (n = 2).

Nous avons ensuite testé les 100 échantillons de sérums de la cohorte, après dilution et traitement thermique à 95°C pendant 5 min. Sur aucun des 100 échantillons traités, nous n'avons pu mettre en évidence l'antigène OspC.

Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat : (i) la sensibilité analytique de la méthode n'est pas suffisante, (ii) la précipitation à la chaleur d'un certain nombre d'échantillons a pu affecter la détection d'OspC (iii) les conditions de stockage des échantillons n'étaient peut-être pas favorables au maintien de l'intégrité d'OspC (iv) OspC n'est pas associée à des complexes dans certains échantillons et le traitement à la chaleur l'a dénaturée (v) les patients ont été traités

par des antibiotiques et l'infection n'est pas active ou les patients n'étaient pas dans un stade précoce de la maladie au moment du prélèvement.

#### 4. Dosage SPIE-IA des échantillons de sérum de patient Lyme sans traitement de décomplexation

Comme dans le paragraphe précédent, nous avons déterminé la limite de détection d'OspC, dans du sérum dilué ¼, cette fois-ci non chauffé. Une courbe standard a été réalisée à partir d'une gamme d'OspC recombinante allant de 31 pg/mL à 1 ng/mL et ajustée à l'aide d'un modèle de régression non linéaire qui est représentée dans la figure 53.

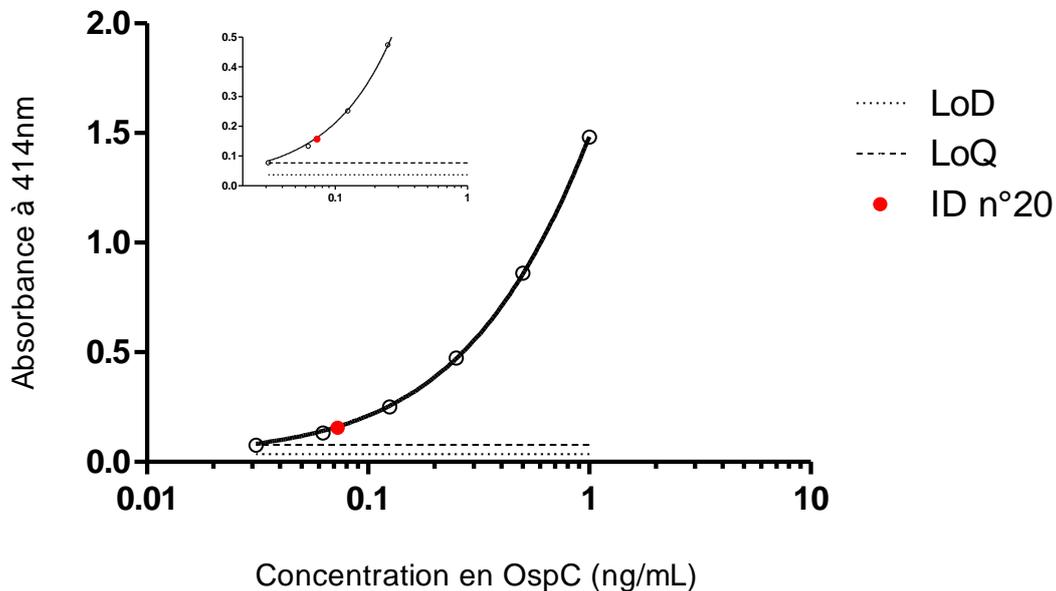
Ensuite, nous avons mesuré le niveau d'OspC dans une sélection de 32 échantillons (16 échantillons de sérum de patients Lyme, 16 échantillons de sérum négatifs) présentés dans le (tableau 17). Les échantillons négatifs nous ont permis de fixer le seuil à une absorbance à 414nm de 0,036.

**Tableau 17 : Echantillons de sérums humains sélectionnés pour le passage en SPIE-IA.**

ID	Genre	Age (années)	IgG anti- <i>B.burgdorferi</i>	IgM anti- <i>B.burgdorferi</i>
1	Femme	63	<7,0	42
10	Homme	52	<7,0	>200,0
19	Femme	55	<7,0	181
20	Femme	57	<7,0	32
21	Homme	67	<7,0	57
23	Femme	54	<7,0	80
27	Femme	26	<7,0	81
28	Homme	52	<7,0	39
31	Homme	49	<7,0	73
35	Homme	56	<7,0	44
55	Femme	72	<7,0	200
64	Femme	69	<7,0	113
67	Homme	53	<7,0	44
68	Femme	71	<7,0	37
76	Homme	39	<7,0	>200,0
93	Femme	78	102,8	15

Parmi les 16 échantillons de sérum de patient Lyme, deux sérums présentaient une absorbance à 414 nm supérieure au seuil fixé : le sérum ID n°20 avec une absorbance de 0,156 et le sérum ID n°67 avec une absorbance de 0,047. L'échantillon numéro 67 étant inférieur à la limite de quantification, nous pouvons juste dire que l'on détecte la présence d'OspC.

Concernant l'échantillon ID n°20 (représenté en rouge sur la courbe de la figure 53), nous mesurons une concentration moyenne de  $292 \pm 17$  pg /mL OspC dans l'échantillon.



**Figure 53 : Courbe étalon obtenue par SPIE-IA pour la détection OspC dans le sérum dilué au  $\frac{1}{4}$ .**

Des dilutions en série de la protéine OspC ont été réalisées dans du sérum humain négatif dilué au  $\frac{1}{4}$  dans du tampon EIA. La limite théorique de détection (LoD) et la limite de quantification (LoQ) sont indiquées par les fines lignes horizontales en pointillés représentant l'absorbance atteinte pour la limite de détection (moyenne du non-spécifique + trois écarts types) et la limite de quantification (moyenne du non-spécifique + 10 écarts types), respectivement. Les points de données représentent les valeurs moyennes d'un doublon ( $n = 2$ ). ID n°20 représente l'échantillon positif parmi la cohorte de patients Lyme.

Il est intéressant de noter que dans les deux échantillons ID n°20 et 67, dans lesquels nous avons pu détecter la présence de l'antigène OspC par SPIE-IA, aucun IgM ou IgG dirigés contre le peptide C10 et contre la protéine recombinante OspC n'a été détecté. Ceci peut expliquer la raison pour laquelle nous avons pu détecter de l'OspC sans décomplexation préalable.

## 5. Discussion générale

Nous avons montré dans le chapitre précédent, que notre anticorps monoclonal C10-11 était capable de se lier à sept peptides différents représentant plus de 90 % des souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Cela suggère qu'avec notre dosage immunométrique SPIE-IA, moins de 10 % des *Bb* s.l. ne peuvent pas être détectés.

Ce dosage se base sur des anticorps dirigés contre le peptide C-terminal, PVVAESPCKP (peptide C10), dont la séquence PKKP présente un rôle essentiel avec la liaison des anticorps immunoglobulines M (IgM), présents chez les patients atteints de borréliose de Lyme<sup>346</sup>.

Le fait que le peptide C10 soit largement reconnu par les anticorps IgM dans les sérums de patients atteints d'érythème migrant ou de neuroborréliose<sup>342</sup> soutient l'hypothèse selon laquelle les antigènes potentiellement présents dans les fluides biologiques pourraient être complexés avec les anticorps du patient.

Les complexes immuns ou d'autres complexes protéiques sont une limitation courante pour la mesure qualitative et quantitative des antigènes. Il est donc nécessaire de trouver une méthode de décomplexation simple et robuste, afin de dissocier irréversiblement les anticorps et les antigènes, tout en conservant un antigène reconnaissable par notre dosage immuno-enzymatique.

Il s'avère que dans notre étude, le peptide C10 est largement reconnu (50% des échantillons) par les anticorps IgM, présents dans les sérums de patients Lyme, d'où l'importance de décomplexer les immuno-complexes potentiellement présents dans les échantillons.

Au contraire, nous avons observé que la réponse en IgG n'est que très peu dirigée contre le peptide C10 (seulement 4% des patients). Nous avons observé un pourcentage de positivité en IgG plus élevé sur la protéine recombinante OspC (12%) que sur le peptide C10. Une constatation similaire a été faite par Izac *et al.* en 2019, où les réponses en IgG bien que dirigées contre l'OspC ne sont pas dirigées contre les régions conservées de la protéine<sup>340</sup>.

À ce jour, plusieurs méthodes ont été publiées pour améliorer la détection d'antigènes dans les sérums et dans diverses matrices biologiques. Ces méthodes sont basées sur l'acidification<sup>365,368</sup>, l'utilisation de réactifs alcalins<sup>359,362</sup> ou sur un traitement thermique<sup>366,367</sup>.

Bien que le traitement thermique (95°C ; 5min) soit le plus adapté dans notre étude pour dissocier efficacement les complexes immuns anticorps/OspC, cette méthode présente l'inconvénient de dénaturer l'antigène et d'autres protéines du sérum produisant des précipités dans certains échantillons. Cette méthode demande donc à être optimisée. Il serait par exemple intéressant de tester d'autres méthodes de décomplexation comme celle en milieu basique<sup>7,8</sup>.

Dans la cadre de notre cohorte, la décomplexation des IC n'a pas permis de détecter la protéine OspC. Seule une détection directe sans traitement a permis de mettre en évidence OspC dans deux des sérums de patients.

### *III. Conclusion et perspectives*

Pour conclure, nous avons montré dans cette partie que l'antigène OspC pouvait potentiellement être détecté dans le sérum de 2 patients. Ce résultat ouvre une piste intéressante mais demande à être conforté en vérifiant la spécificité de la protéine détectée par des expériences d'inhibition avec le peptide et éventuellement une identification précise de la protéine par spectrométrie de masse. Cependant, ces investigations supplémentaires nécessitent de disposer d'un volume suffisant d'échantillon.

Nous avons réuni tous les outils pour analyser des échantillons de sérum de patients avec l'identification d'une cible d'intérêt, le développement d'un test de détection sensible et la mise au point d'une méthode de décomplexation d'IC spécifique.

La plus grande limitation dans cette analyse est la nature de la cohorte elle-même. Il s'agit d'une cohorte non caractérisée pour laquelle nous n'avons aucune indication sur le statut clinique des patients (stade la maladie, symptômes, traitement antibiotique...). Il est donc maintenant primordial de valider nos outils sur une cohorte bien caractérisée et pertinente.

Pour un diagnostic précoce, la sélection de sérum de patients ayant un érythème migrant, seul signe clinique spécifique de la phase précoce de la maladie de Lyme, et non traité par des antibiotiques serait d'un grand intérêt. Ce type d'échantillons n'est cependant pas disponible dans les laboratoires d'analyse puisque les patients présentant un érythème migrant sont généralement traités rapidement aux antibiotiques sans réaliser d'analyse sanguine préalable. Il faudrait donc mettre en place une cohorte de recherche prospective incluant notamment des patients présentant un EM.

Pour poursuivre ce travail, nous pourrions appliquer cette méthode de décomplexation à des échantillons de patients à tous les stades de la maladie confondus pour évaluer l'intérêt des autres biomarqueurs et plus particulièrement VlsE puisque le peptide C6<sup>356</sup> est immunodominant chez les patients atteints de la maladie de Lyme.

*Conclusion générale et  
Perspectives*

La maladie de Lyme touche plus de 50 000 nouvelles personnes chaque année en France. Cette maladie est causée par une infection par *B. burgdorferi* sensu lato. En Europe, les principales espèces de *Borrelia* identifiées (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto) sont responsables de symptômes variés. Le diagnostic de la maladie est donc complexe, il repose à la fois, sur les signes cliniques, l'épidémiologie et sur des tests biologiques en laboratoire. L'EUCALB préconise pour le diagnostic, l'utilisation d'un test sérologique en deux temps : un test immuno-enzymatique dans un premier temps (ELISA), et en cas de positivité ou de doute, la confirmation par immunoempreinte (western blot) dont la spécificité est meilleure. Ces tests mesurent la réponse immunitaire de l'organisme à la maladie, mais ils n'indiquent pas la présence d'une infection active, les anticorps pouvant persister dans l'organisme des années après la guérison. De nouveaux tests de diagnostic sont donc nécessaires afin de poser un diagnostic plus fiable. C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail. L'objectif de cette thèse était de **développer des outils et méthodes de diagnostic spécifiques et sensibles basées sur la détection d'antigènes bactériens.**

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à la **recherche et à l'identification de biomarqueurs** de la maladie de Lyme dans un modèle murin. Après la mise en place de modèles murins et le développement des outils nécessaires au suivi de l'infection, nous avons mis en œuvre la stratégie InMAD<sup>297</sup> (*in vivo microbial antigen discovery*). La stratégie consiste en l'identification d'antigènes microbiens circulants sur la base de la réponse immunitaire humorale d'animaux immunisés avec du plasma de souris infectées. Sur un modèle de souris immunodéprimées, infectées avec la souche *B. burgdorferi* sensu stricto 297, nous avons identifié à 15 jours post-infection **3 potentiels biomarqueurs** : la protéine ribosomale 30S, la flagelline et potentiellement une des trois protéines OspA, OspB et la protéine ribosomale 50S. En ce qui concerne la recherche de marqueurs plus tardifs, cette stratégie d'identification pourrait être également transposée dans un modèle d'infection de souris immunodéprimées. Cependant, dans ce contexte, la pression du système immunitaire adaptative sur l'expression des protéines n'est pas prise en compte. Or la majorité des gènes des lipoprotéines est réprimée lors de l'activation de la réponse adaptative<sup>148</sup>.

Pour confirmer ces biomarqueurs, une identification plus robuste est cependant nécessaire. Notamment, l'extraction des protéines de *Borrelia* et leur séparation par électrophorèse 2D pourraient être optimisées. Pour les protéines faiblement représentées et pour lesquelles peu de peptides sont détectés, une analyse plus précise des peptides par spectrométrie

de masse en tandem (LC-MS/MS) serait requise. Quoiqu'il en soit, nos résultats illustrent la difficulté de rechercher et d'identifier des marqueurs de la maladie de Lyme, pathologie présentant une bactériémie faible. Les outils de détection mis en place devront être extrêmement sensibles pour détecter ces biomarqueurs.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à plusieurs potentiels biomarqueurs décrits dans la littérature **FlaB, OspA, OspC et VlsE**, afin d'évaluer leur intérêt pour le diagnostic de la maladie de Lyme. Pour cela, des anticorps monoclonaux ont été produits contre ces différents antigènes. Deux stratégies d'immunisation ont été utilisées en fonction de l'homologie des séquences protéiques entre les espèces de *Borrelia*. Pour FlaB et OspA, deux protéines hautement conservées, nous avons utilisé des protéines recombinantes comme immunogènes. Alors que pour les protéines OspC et VlsE, qui présentent des variabilités importantes entre les différentes espèces de *Borrelia*, nous avons utilisé des peptides à motif hautement conservé (respectivement le peptide C10 et C6) comme immunogènes. Ce choix nous a permis de produire des anticorps capables de reconnaître les protéines endogènes de 3 espèces de *Borrelia* retrouvées en Europe. Après caractérisation et sélection des meilleurs anticorps monoclonaux, nous avons développé **des tests de détection spécifiques et sensibles**. L'un est basé sur l'immunocapture de l'antigène suivie d'une détection par western blot tandis que l'autre est un test de type ELISA ou SPIE-IA. Nous avons obtenu pour chaque marqueur des dosages très sensibles. Par exemple, le dosage SPIE-IA, dirigé contre le peptide C10 d'OspC, atteint des limites de détections comprises entre 17 et 100 pg/mL (soit environ 0,1 et 0,5 fmol par dosage), selon le type d'échantillon analysé. Les outils développés pour la détection de FlaB et OspC ont ensuite été évalués dans un modèle d'infection murin. Cette approche a permis de détecter les protéines dans différents organes et dans le plasma de souris infectées à 7 et 15 jours d'infection. Il s'agit de la première étude mettant en évidence la présence de ces deux marqueurs dans le plasma d'animaux infectés. Ces résultats suggèrent donc qu'OspC et FlaB peuvent constituer des biomarqueurs intéressants pour le diagnostic direct à un stade précoce de la maladie de Lyme. L'évaluation des deux autres marqueurs OspA et VlsE reste à être réalisée sur un modèle murin pertinent.

La méthode de SPIE-IA, développée pour le dosage d'OspC et VlsE, constitue un test simple et rapide qui peut être facilement mis en œuvre dans n'importe quel laboratoire clinique

Les méthodes développées s'avèrent complémentaires aux autres méthodes de détection directes disponibles, comme la PCR. Actuellement, un kit est commercialisé par Qiagen avec

des sensibilités variables selon les échantillons<sup>184</sup>. La PCR présente une sensibilité de 60 à 90% sur les lésions cutanées et le liquide synovial, mais une sensibilité faible dans le liquide céphalo-rachidien (<10% à 40%)<sup>246</sup>. Il serait intéressant de comparer la sensibilité des tests antigéniques avec celle des tests moléculaires. En effet dans certaines situations les tests immunologiques fonctionnent là où des tests PCR sont perturbés par des interférents (excès d'ADN de matrice, inhibiteurs de polymérase)

Au vu des résultats de la seconde partie, nous avons cherché dans un dernier temps à évaluer l'intérêt de la protéine OspC comme biomarqueur sur une cohorte de patients atteints de la maladie de Lyme. Pour ce faire, nous avons **caractérisé la réactivité de 100 échantillons de sérums humains** sur la protéine OspC et plus particulièrement sur le peptide C10. Nos résultats ont montré que plus de la moitié des échantillons présentaient une réponse en IgM dirigée contre le peptide C10, suggérant qu'il pourrait exister des immuno-complexes antigène/anticorps qui affectent la sensibilité de détection des tests antigéniques. Nous avons donc développé une **méthode pour dissocier** efficacement les immuno-complexes afin de pouvoir détecter ultérieurement l'antigène OspC. Nous avons également recherché directement la protéine OspC, sans étape de dissociation des IC, dans les échantillons de sérums de patients. Cela nous a permis de mettre en évidence la présence de la protéine OspC dans deux sérums, confirmant ainsi l'intérêt d'OspC dans le diagnostic de la maladie de Lyme. Pour poursuivre, il est essentiel de valider nos outils et méthodes de détection sur une cohorte pertinente, avec des échantillons cliniques bien caractérisés et comme nous l'avons fait pour OspC, nous pouvons envisager d'appliquer la stratégie de dosage d'antigènes avant et après décomplexation aux autres marqueurs étudiés.

Pour conclure, mon travail de thèse a ouvert des perspectives intéressantes pour le développement de nouveaux types de test de diagnostic de la maladie de Lyme active basés sur la détection des protéines du pathogène dans les fluides de l'hôte.

# *Matériels et méthodes*

## ***I. Le matériel biologique utilisé***

### **1. Les tampons et réactifs**

Le tampon EIA est composé de phosphate de potassium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, de BSA 0,1 % et d'azide de sodium 0,01%.

Le tampon de lavage est composé de phosphate de potassium 10 mM, pH 7,4 et de Tween 20 0,05%.

Le tampon AE est composé de Tris-HCl 10 mM et d'EDTA 0,5 mM pH 9.

Le tampon Laemmli 1X est composé de Tris 62,5 mM pH 6,8, de SDS 2 %, Glycérol 10 % et de bleu de bromophénol 0,01 %.

Le tampon PBS est composé de phosphate de potassium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, le tampon PBST est quant à lui supplémenté de Tween20 0,1%.

Le tampon LDS est composé d'urée 6M, glycérol 20%, SDS 2% et Tris HCl 375mM pH 8,8.

Le tampon pour l'Octet est composé de tampon EIA supplémenté de Tween20 0,02%.

Le réactif d'Ellman est composé d'un mélange d'acide dithio-bisnitrobenzoïque (DTNB) oxydé ( $2.5 \cdot 10^{-4}$  M) et d'acétylthiocholine iodide ( $7.5 \cdot 10^{-4}$  M) dans du tampon phosphate de potassium 0.1 M, pH 7.4. L'activité enzymatique est exprimée en Unité Ellman (UE), 1 UE étant définie comme la quantité d'acétylcholinestérase (AChE) induisant une augmentation de l'absorbance à 414 nm d'une unité par minute dans 1 mL de réactif d'Ellman, pour un trajet optique de 1 cm à 25°C.

## 2. Les bactéries

### 2.1 La collection bactérienne

Les souches bactériennes commandées chez ATCC et utilisées au cours de la thèse sont recensées dans le tableau 18. Les manipulations ont été réalisées dans le laboratoire de sécurité biologique de niveau 2. Les bactéries, conservées en glycérol 20% à -80°C, ont été cultivées en milieu liquide BSK-II (Sigma-Aldrich) à 34 °C. Les spirochètes ont été comptés et leur mobilité a été vérifiée dans une chambre de Neubauer par microscopie à fond noir. Les souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato utilisées pour les infections correspondent à des souches de faible passage (moins de cinq).

**Tableau 18 : Collection bactérienne de *Borrelia*.**

<b>Souche</b>	<b>Désignation</b>
<i>B. afzelii</i>	BO23 - ATCC® 51992™
<i>B. bavariensis</i>	PBi - ATCC® BAA-2496™
<i>B. Burgdorferi</i> sensu stricto	B31 - ATCC® 35210™
<i>B. garinii</i>	CIP 103362 - ATCC® 51383™
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	297 - ATCC® 53899™

### 2.2 Vérification de la présence du gène *OspC*

L'ADN des différentes souches de *Borrelia* a été extrait à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne) comme décrit dans la partie III.1.1. Les amorces utilisées ciblent le gène *ospC*. Elles ont été décrites dans l'article de Tilly *et al.* datant de 2006<sup>146</sup>.

L'amorce reverse est commune aux différentes souches testées soit (5'-AAAAAAACTCGAGCTAAGGTTTTTTGGACTTCTTGC-3'). L'amorce forward dépend de la souche testée (tableau 19).

**Tableau 19 : Amorces forward utilisées.**

<b>Souche testée</b>	<b>Séquence nucléotidique de l'amorce forward</b>
<i>B. burgdorferi</i>	5' -AAAAAAAAGGATCCGGAAAAGATGGGAATGC-3'
<i>B. bavariensis</i>	5' -AAAAAAAAGGATCCGGTGGGGATTCTGCATC-3'
<i>B. afzelii</i>	5' -AAAAAAAAGGATCCGGGAAAGGTGGGTC-3'

La PCR a été réalisée à l'aide du kit *Taq* PCR CORE (Qiagen, Hilden, Allemagne) avec un volume réactionnel final de 25µL contenant 0,2µM de chaque amorce, 0,2mM de dNTP, 2,5µL de tampon 10X, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,625 unité de Taq Polymérase. La PCR débute par une étape de dénaturation de l'ADN d'une minute à 93°C. Par la suite, 35 cycles de dénaturation (1 min à 93°C), hybridation (1 min à 50°C), élongation (1 min à 72°C) sont réalisés suivis d'une élongation finale de 10 min à 72°C. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler nexus flexlid (Eppendorf, Montesson, France). L'électrophorèse du produit de PCR est réalisée sur un gel d'agarose 2 % préparée en tampon Tris Acétate-EDTA (TAE) contenant du Bromure d'éthidium (BET).

### 3. Les traceurs

#### 3.1 Le couplage des peptides à l'AChE

Pour la sélection des cellules productrices d'anticorps monoclonaux spécifiques, les peptides ont été couplés à l'AChE (forme tétramérique G4) comme décrit précédemment<sup>369</sup> à l'aide du réactif SMCC. Brièvement, 2 nmoles de peptides avec les thiols réduits ont été mélangés avec 0,1 nmole d'AChE-SMCC (N-succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate) dans un tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5, EDTA 5mM puis laissés à réagir pendant une nuit à 4°C. Les traceurs peptide-G4 ont ensuite été purifiés par gel filtration sur des colonnes Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 2 mL (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). L'activité enzymatique des peptides couplés a été déterminée par la méthode d'Ellman<sup>370</sup>. Concernant le traceur streptavidine couplé à l'acétylcholinestérase (streptavidine-AChE), il a été préparé de la même façon.

### **3.2 Le couplage des protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux à la biotine**

Les protéines recombinantes et les anticorps monoclonaux ont été couplés à la biotine de façon covalente pour être utilisés comme traceurs. Brièvement, 0,67 nmoles de protéines ou d'anticorps dans 400 µL de tampon borate 0,1 M pH 9 a été mélangé avec 13,3 nmoles d'ester de biotine-N-hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich) dissous en diméthylformamide anhydre (DMF). Après une incubation de 1h à température ambiante, la réaction est stoppée par l'ajout de 100 µL de Tris-HCl 1 M pH 8, pendant 1h. Enfin, 500 µL de tampon EIA (voir la composition paragraphe I.1) ont été ajoutés et cette préparation a été stockée à - 20 °C jusqu'à son utilisation.

## ***II. L'expérimentation animale***

Toutes les expériences sur les animaux ont été réalisées conformément à la directive européenne 210/63/ECC. Les animaux ont été hébergés dans des installations autorisées par l'Inspection vétérinaire de l'Essonne (France). Les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité d'Ethique du Commissariat à l'Energie Atomique (CEtEA "Comité d'Ethique en Expérimentation Animale" No. 44) et par le Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Pour tous les prélèvements sanguins, les échantillons (entre 100 et 200 µL) ont été placés dans un tube contenant 20 µL d'EDTA 100 mM (éthylène diamine tétra-acétique) pour éviter la coagulation. Le sang a été ensuite centrifugé à 2 000 x g pendant 10 min à 4°C pour récupérer le plasma afin de réaliser les différents dosages.

### **1. L'infection des souris pour la stratégie InMAD**

Des souris BALB/c, C3H/HeN et CB17scid, femelles âgées de quatre semaines commandées chez Janvier, ont été infectées par voie sous-cutanée avec différentes concentrations de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans du milieu BSK. Un groupe témoin a été injecté, en parallèle, avec seulement du milieu BSK. Pour les infections, les animaux ont été placés sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. Le site d'inoculation correspondait à la zone thoracique dorsale. Au cours de l'infection, la largeur des articulations a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse afin de voir la présence d'une potentielle atteinte articulaire.

A différents temps après inoculation, les souris ont été sacrifiées. Le sang, le cœur, la vessie, les articulations, la peau au niveau du site d'inoculation et les oreilles ont été prélevés.

## **2. L'immunisation des souris pour la stratégie InMAD**

Des souris BALB/c, femelles âgées de 12 semaines, ont été immunisées par quatre injections intrapéritonéales, à intervalles de 3 semaines, avec du plasma de souris infectées ou non infectées, filtré (0.22µm), dilué au demi dans du PBS et mélangé à un adjuvant l'hydroxyde d'aluminium (alun). Avant la première injection, un prélèvement sanguin a été réalisé (S0) ainsi qu'après chaque nouvelle immunisation (S1, S2, S3, S4). Ces prélèvements ont été utilisés pour l'identification des antigènes circulants par une analyse en western blot suivi d'une analyse par spectrométrie de masse.

## **3. L'immunisation des souris pour la production d'anticorps monoclonaux**

Quatre souris *Biozzi*, femelles âgées de 12 semaines, ont été immunisées par quatre injections intrapéritonéales, à intervalles de 3 semaines, avec 50 µg de protéine recombinante mélangée à un adjuvant l'hydroxyde d'aluminium (alun, Eurobio) ou avec 50 µg de peptide conjugué à la BSA (le couplage est décrit en paragraphe iv.2.) mélangé à l'alun. Un prélèvement sanguin a été réalisé le jour de la première injection (saignée pré-immune S0) puis deux semaines après chaque injection (saignées S1, S2 et S3). Ces prélèvements ont été utilisés pour évaluer la réponse immunitaire de chaque souris.

### ***III. Méthodes de suivi de l'infection***

#### **1. Détection de l'ADN de *B. burgdorferi* dans les tissus de souris**

##### **1.1 Extraction de l'ADN de *Borrelia***

Afin d'optimiser la détection de *Borrelia* dans les tissus par PCR, nous avons dans un premier temps évalué différents kits d'extraction sur la base de leur rendement en ADN (à partir d'une même quantité de tissus) et de la pureté de l'ADN.

Trois différents kits d'extractions d'ADN ont été évalués sur un échantillon normalisé de 10 mg de biopsie de peau murine :

- Kit Genomic DNA RapidLyse NucleoSpin® Macherey-Nage,
- Kit Genomix DNA from tissue NucleoSpin® Macherey-Nage,
- Kit DNeasy Blood and Tissue Qiagen Hilden.

La concentration (en ng/μL) et la qualité de l'échantillon d'ADN obtenu ont été mesurées avec un spectrophotomètre. Le ratio A260/A280 a été déterminé ainsi que le ratio A260/A230. Le rapport A260/A280 informe de la présence de contaminations par des protéines, des phénols ou d'autres contaminants s'il est inférieur à 1,8 et par de l'ARN si le rapport est supérieur à 1,8. Un rapport de 1,8 correspond à de l'ADN pur. Le rapport A260/A230 renseigne de la présence éventuelle de contaminant tels que de sels, des solvants. Il doit être compris entre 1,8 et 2,2.

La concentration d'ADN extraite avec les différents kits était similaire entre les échantillons avec d'environ  $36,63 \pm 2,65$  ng d'ADN /μL. Concernant le rapport A260/A280, le kit présentant la meilleure pureté fut le kit Qiagen avec un ratio de 1,8 (comparé aux deux autres 1,74 et 1,90). Le kit Genomic DNA RapidLyse NucleoSpin® a copurifié beaucoup de contaminants contrairement aux kits Genomix DNA from tissue NucleoSpin® Macherey-Nage et DNeasy Blood and Tissue Qiagen Hilden. Pour la suite de nos expériences, nous avons décidé de poursuivre nos extractions avec le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'ADN purifié a été élué dans 200μL de tampon AE.

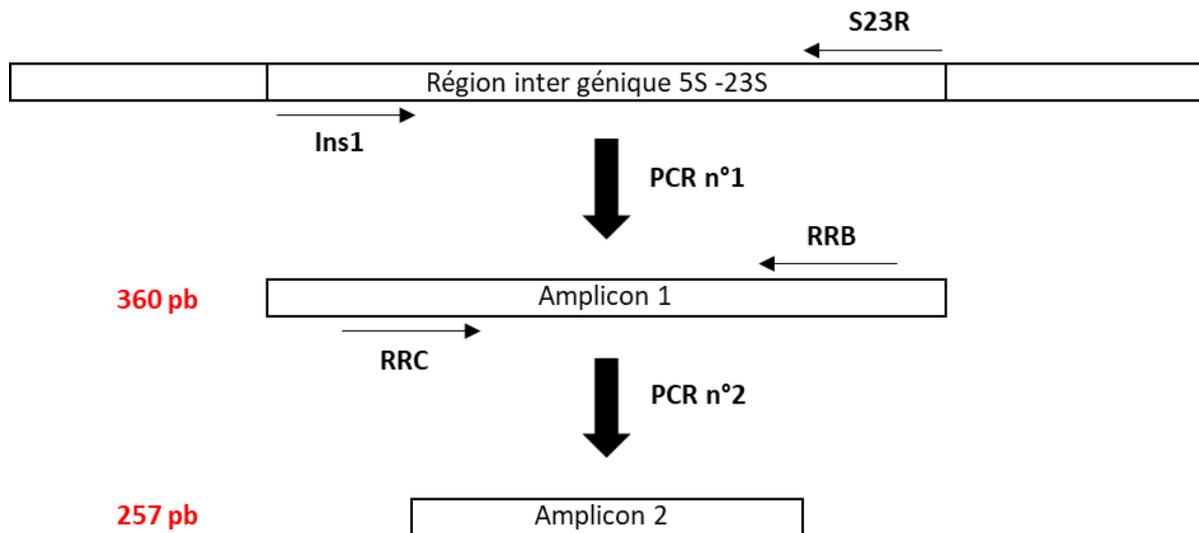
## 1.2 Méthode d'amplification génique

Deux méthodes d'amplification génique ont été évaluées : la PCR nichée et la PCR en temps réel. Pour chaque méthode évaluée, des contrôles négatifs contenant le mélange réactionnel additionné d'eau stérile ou d'un extrait d'ADN de peau non infectée ont été inclus, ainsi qu'un contrôle positif constitué d'ADN de *Borrelia* (souche *B. afzelii* BO23).

### 1.2.1 La PCR nichée

Une des premières méthodes envisagées était la PCR nichée (ou Nested en anglais). Il s'agit d'une méthode très sensible et spécifique. Cette méthode est basée sur l'amplification de la région intergénique codant pour le ribosome 23 et 5S. Il s'agit d'une région particulièrement conservée entre les espèces de *B. burgdorferi*.

Le premier couple d'amorces utilisé est Ins1 (5'-GAAAAGAGGAAACACCTGTT-3') et S23R (5'-TCGGTAATCTTGGGATCAAT-3'), il amplifie un fragment de 360 paires de bases (pb). Le second couple d'amorces est RRC (5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGAG-3') et RRB (5'-AAGCTCCTAGGCATTCACCATA-3'), permettant d'obtenir est un fragment de 257 pb (figure 54).



**Figure 54 : Principe de la PCR nichée pour l'amplification de *B. burgdorferi sensu lato*.**  
<sup>306</sup>(Créé d'après Sertour *et al.* (2018)).

Cette PCR a été réalisée comme décrite dans l'article de Sertour *et al.* (2018)<sup>306</sup>. Pour chaque PCR, 5 µL d'ADN ou de produits de la première amplification ont été utilisés. Après une étape initiale de dénaturation (4 min, 94°C), la PCR se déroule en 3 étapes de 35 cycles : la dénaturation (1 min, 94°C), l'hybridation (1 min à 55°C pour Ins1-S23R et 1 min à 59°C pour RRB-RRC') et l'élongation (1 min, 72°C). Elle est ensuite suivie d'une étape d'élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET).

La PCR nichée est une méthode extrêmement sensible pouvant détecter entre six et dix spirochètes<sup>371</sup>. Cependant, c'est une méthode très sensible aux contaminations contribuant à son manque de robustesse. Il s'agit également d'une méthode longue et fastidieuse : environ 4 heures de réaction dans un thermocycleur, suivi d'une heure pour la séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation. Un autre inconvénient de cette technique est qu'elle est seulement qualitative<sup>372</sup>, justifiant ainsi notre choix de développer une méthode de qPCR.

## 1.2.2 La PCR en temps réel

Cette technologie consiste en la détection et en la quantification d'un marqueur fluorescent dont l'émission est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés et ce en fonction du nombre de cycles. La détection peut se faire grâce à l'utilisation d'un produit se liant à l'ADN double brin (SYBR Green) ou de sondes oligonucléotidiques fluorescentes (Taqman). Ici notre approche se base sur la détection SYBR Green en utilisant le Master Mix Fast EvaGreen® qPCR. Pour mettre au point la qPCR, nous avons testé différentes amorces déjà publiées dans la littérature ciblant les gènes : (i) *fla* codant pour la flagelline ou (ii) la région inter génique codant la région ribosomale 5 – 23S.

Les amorces utilisées respectent les règles de bases de la PCR quantitative : leur longueur est comprise entre 20-40 nucléotides, la teneur en Guanine et Cytosine est de 40 à 60% et elles ne possèdent de motif répété. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (tableau 20).

**Tableau 20 : Amorces utilisées. .**

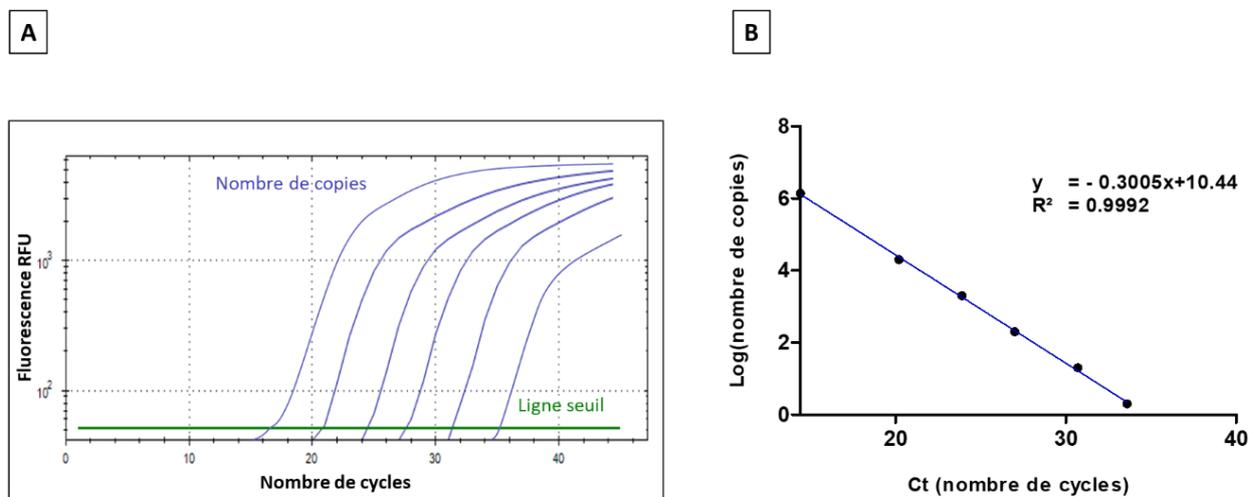
Les amorces Fla Inner et Outer<sup>373</sup> Les amorces pour FlaB<sup>374</sup> et les amorces pour la région inter génique<sup>306</sup>.

Nom des amorces	Séquence nucléotidique	
	Forward	Reverse
Fla Outer	5' -TGGTATGGGAGTTTCTGG-3'	5' -TCTGTCATTGTAGCATCTTT-3'
Fla Inner	5' -CAGACAACAGAGGGAAAT-3'	5' -TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC-3'
FlaB	5' -AACACACCAGCATCACTTTCAGGGT-3'	5' -GAATTAACCTCCGCCTTGAGAAGGTG-3'
Ins1 / S23R	5' -GAAAAGAGGAAACACCTGTT-3'	5' -TCGGTAATCTTGGGATCAAT-3'
RRC / RRB	5' -CTGCGAGTTCGCGGGAGAG-3'	5' -AAGCTCCTAGGCATTACCATA-3'

Après avoir déterminé théoriquement la température d'hybridation des amorces, nous avons comparé l'efficacité d'amplification des différentes combinaisons. Pour cela, nous avons réalisé une gamme de dilution de 10 en 10 d'un standard d'ADN de *B. afzelii* BO23 (de 700 pg à 7 fg). Après comparaison des cycles seuils obtenus ou Ct (cycle threshold : nombre de cycles d'amplification nécessaires afin d'atteindre une valeur seuil de fluorescence, qui permet de déclarer que l'échantillon est positif), nous avons sélectionné la méthode présentant les Ct les plus bas et les plateaux les plus élevés en intensité de fluorescence. Il s'agit de la méthode utilisant les amorces **RRC/RRB codant pour la région inter génique 5 et 23S**.

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur : CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad). Les cycles de PCR ont été réalisés avec une dénaturation initiale de 3 min à 95 °C, 40 cycles de dénaturation pendant 10 secondes à 95 °C, suivi d'une étape d'hybridation de 30 secondes à 63,4 °C.

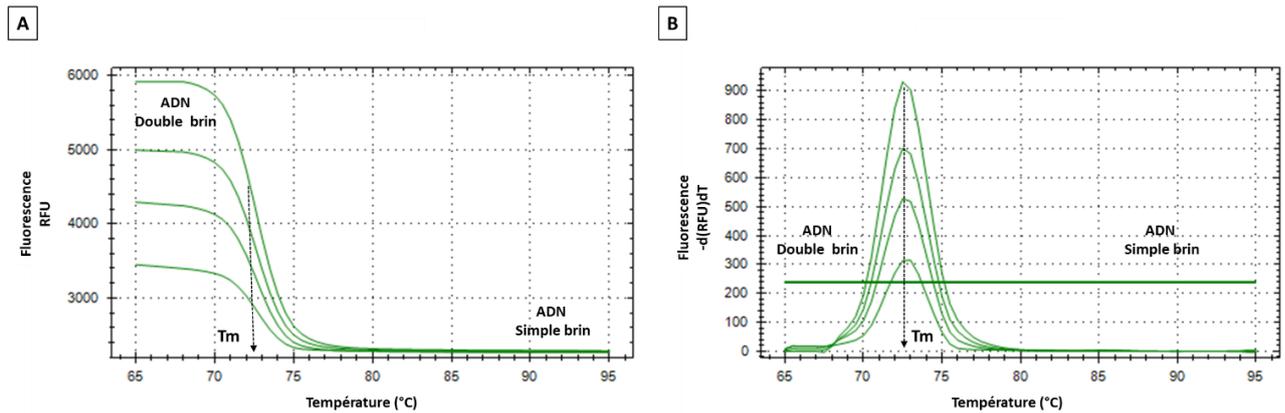
La sensibilité de la technique a été déterminée à l'aide d'une gamme de concentrations connues d'ADN pour différentes souches (*B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*). Les Ct en fonction du nombre de copies par tube étaient similaires pour les différentes souches. À titre d'exemple, la figure 55B présente la courbe standard de la qPCR pour la souche *Borrelia afzelii* BO23.



**Figure 55 : Représentation graphique de la courbe standard de qPCR.**

(A) L'amplification d'une gamme connue d'ADN (ici de *B. afzelii* BO23) est effectuée et la détermination des Ct est réalisée grâce aux courbes d'amplification. (B) Les Ct sont ensuite utilisés pour tracer la courbe standard en fonction du logarithme (Log) de la concentration d'ADN en nombre de copies, une relation linéaire existant entre ces deux.

La spécificité de la PCR a été vérifiée à l'aide de la courbe de fusion obtenue après amplification (de 65 à 95°C pendant 5 min). La courbe de fusion permet de distinguer les différents amplicons en fonction de leur température de fusion ( $T_m$ ) (figure 56). La température de fusion correspond à la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin et l'autre moitié sous forme simple brin. La température spécifique est de 72.5°C.



**Figure 56** Courbe de fusion suite à l'amplification des échantillons.

(A) Le graphique représente la fluorescence enregistrée en fonction de la température. (B) Le graphique représente la dérivée première négative de la fluorescence enregistrée en fonction de la température. Tm : température de fusion de l'ADN.

Nous avons pu déterminer une limite de détection de 10 fg d'ADN bactérien. D'après la littérature, 100 fg d'ADN de *Borrelia* équivaut à 20 génomes<sup>282</sup> ainsi par extrapolation, on peut estimer que la sensibilité est d'environ 2 spirochètes dans le volume réactionnel.

Lorsque l'on applique la détection de l'ADN bactérien par PCR dans des échantillons biologiques, la littérature rapporte de nombreux effets matrices en raison de la présence d'inhibiteurs, comme la mélanine ou l'hémoglobine qui peuvent par exemple interférer avec la polymérase<sup>275</sup>. Pour évaluer l'effet matrice des extraits d'ADN de tissus de souris, nous avons comparé la courbe standard d'une gamme d'ADN de *Borrelia* diluée dans de l'eau avec la gamme ADN standard diluée dans un extrait d'ADN de tissus de souris. Nous avons observé une perte totale du signal d'amplification en matrice ADN de tissus de souris pour une quantité d'ADN de *Borrelia* allant de 100 pg à 7 fg. Seule une dilution au 1/10 de l'ADN de tissus a permis de lever complètement l'inhibition, mais de fait au détriment de la sensibilité de la méthode puisque 10 fois moins d'ADN sont analysés par tube. Le moyen utilisé pour lever totalement cette interférence, et ce sans diluer notre échantillon, est d'ajouter de la BSA dans le volume réactionnel<sup>375</sup>.

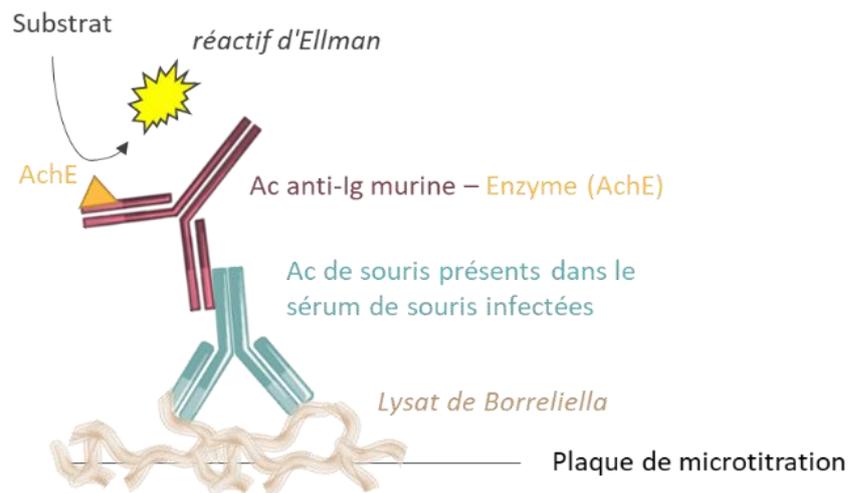
Ainsi le volume réactionnel final est composé de 20µL contenant 10µL de Fast EvaGreen, 400µg de BSA/µL, 500nM de chaque amorce RRC (5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGAG-3') et RRB (5'-AAGCTCCTAGGCATTCACCATA-3') et de 2 µL d'échantillons.

Cette méthode de qPCR a été utilisée afin de déterminer la présence d'ADN de *Borrelia* dans les différents organes de souris infectées. Comparé à la PCR nichée, la qPCR est une méthode rapide, facile à mettre en œuvre et beaucoup moins sensible aux contaminations. De plus, elle peut être facilement normalisée grâce à la courbe standard permettant ainsi d'estimer

la quantité d'ADN de *Borrelia* présent dans les échantillons. Cette méthode présente néanmoins une marge de progression, la détection d'un gène endogène dit « gène de ménage » de souris, comme la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase)<sup>376</sup> ou la microglobuline<sup>377</sup>, pourrait être ajouté afin de corriger les variations d'efficacité de la qPCR et les potentielles erreurs de quantification des échantillons.

Nous avons également mis en place une méthode de détection qPCR pour rechercher la présence de *Borrelia* dans le sang après une étape de culture. Après 15 jours de culture à 34°C de 30µL de sang dans 5,5mL de milieu BSK-II supplémenté de 50µg/mL de rifampicine, les tubes ont été centrifugés, les surnageants éliminés et les culots lavés plusieurs fois en PBS avant extraction de l'ADN et analyse par qPCR comme décrit précédemment.

## 2. L'ELISA pour le suivi de la réponse polyclonale



**Figure 57 : Format du test ELISA utilisé.**

(Créé avec des images tirées de Servier Medial Art, Creative Commons Attribution 3.0 Unported License). Le test utilisé est un ELISA direct. Les plaques sont préparées par adsorption passive des protéines d'un lysat bactérien.

### 2.1 La préparation des phases solides

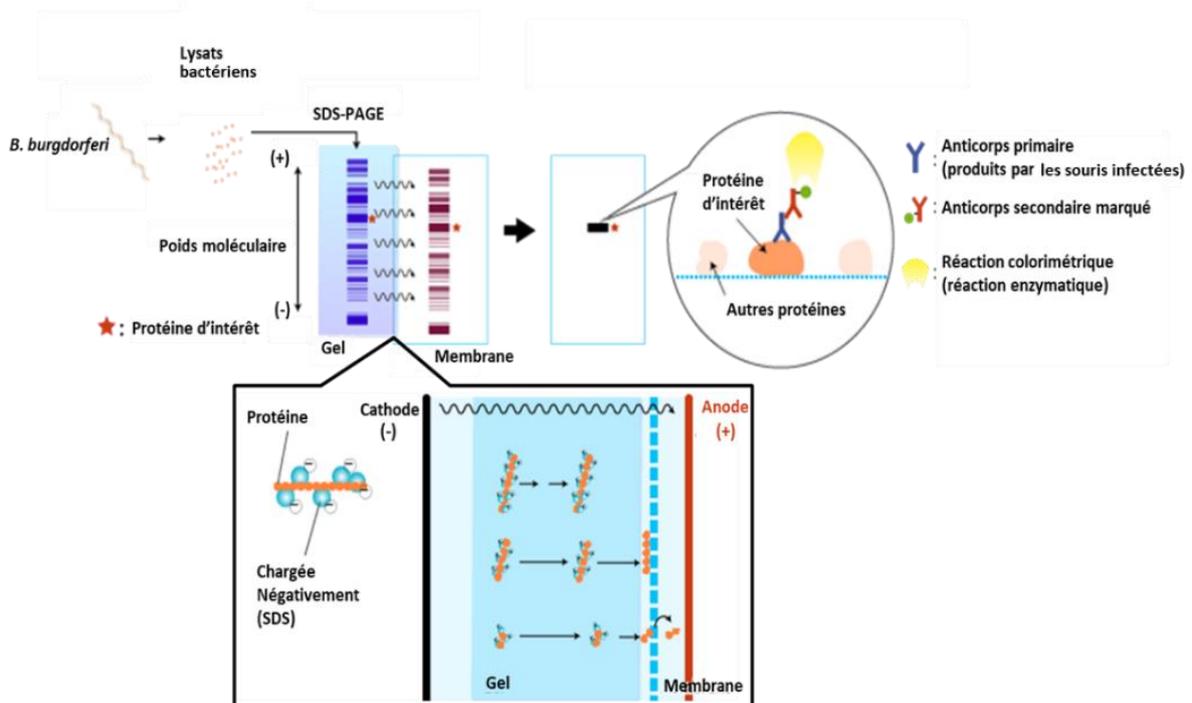
Tous les tests immuno-enzymatiques ont été effectués dans des plaques de microtitration MaxiSorp 96 puits (Nunc). Les phases solides ont été préparées par adsorption passive des protéines à leur surface. Les bactéries entières cultivées ont été centrifugées durant 10 min à 5000 x g, le culot a ensuite été resuspendu dans 200 µL de PBS et soniqué. Le lysat bactérien a ensuite été dilué dans de l'eau pour obtenir une concentration finale équivalente à  $1 \times 10^7$  spirochètes/mL. 50µL de lysat bactérien ont ensuite été déposés dans chaque puits d'une plaque

de microtitration et mis à sécher sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Les plaques ont ensuite été saturées avec du tampon EIA (4 h à température ambiante ou 18 h à 4°C) puis conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

## 2.2 Le test ELISA

Les saignées à tester ont été diluées en tampon EIA puis déposées dans les puits d'une plaque de microtitration (50 µL par puits) revêtue de lysat bactérien. Après 2 heures de réaction à température ambiante, les plaques ont été lavées 3 fois et incubées pendant 4 h à température ambiante avec le traceur CAS-AChE (anticorps de chèvre anti-souris marqués à l'AChE, 50 µL/puits à 2UE/mL). Après trois lavages, l'activité AChE a été révélée par l'ajout de 200 µL/puits de réactif d'Ellman.

## 3. Le western blot



**Figure 58 : Principe du western blot.**

(Adapté avec des images tirées MBL International Corporation). Le western blot se déroule en deux étapes : (1) les protéines sont séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane, (2) les anticorps sont hybridés et la détection de la protéine d'intérêt se fait par une réaction enzymatique. Les anticorps secondaires les plus couramment utilisés sont couplés à la HRP (la peroxydase de raifort).

Pour l'évaluation des réponses polyclonales, les culots bactériens des différentes souches de *Borrelia* ont été mis en suspension à  $5 \times 10^8$  spirochètes dans du tampon Laemmli contenant 5% de  $\beta$ -mercapto-éthanol. Les échantillons bactériens ont été ensuite dénaturés pendant 5 minutes à 95°C puis les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (10 ou 13,4 %) contenant du SDS. Les protéines ont été ensuite transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) en utilisant le système de transfert turbo Trans-Blot (Bio-Rad). Après saturation avec 5% de BSA en tampon PBST pendant 1 h, les membranes ont été incubées avec les saignées diluées au 1:1000 dans du tampon PBST/BSA 1% à 4°C pendant une nuit. Après trois lavages en PBST, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire « Stabilized Goat anti-mouse IgG (H+L) Horse Radish Peroxidase » (Thermo Fisher Scientific) dilué au 1:2000 en tampon PBST/BSA 3% pendant 25 minutes à température ambiante. Après quatre lavages en PBST et un dernier en PBS, les protéines d'intérêt ont été détectées par chimiluminescence (ECL Select, GE Healthcare) en utilisant le système d'imagerie ChemiDoc (Bio-Rad). Les western blots ont été analysés à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc Touch et du logiciel Image Lab Touch Software version 2.2.0.08. Toutes les expositions utilisées correspondent à l'exposition optimale du système. Cette méthode a aussi été utilisée pour la recherche et l'identification des biomarqueurs, les saignées utilisées sont alors celles des souris immunisées.

### ***III. Recherche et identification des biomarqueurs***

#### **1. L'électrophorèse bidimensionnelle**

L'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer des protéines selon deux propriétés distinctes : la charge et la taille moléculaire. Une première séparation des protéines a lieu en fonction de leur charge nette par focalisation isoélectrique (IEF), puis une seconde séparation en fonction de leur masse moléculaire (par SDS-PAGE). Ici, la dimension en fonction du point isoélectrique est comprise entre 3 et 10.

Pour ce faire, des strips de gradient linéaire pH 3 – 10 (ZOOM™ IPG Strips) ont été réhydratés toute la nuit à température ambiante avec 100 ou 200  $\mu$ g de protéines bactériennes contenues dans une solution de réhydratation (urée 8M, 50 $\mu$ L d'ampholyte (3-10), 2% de CHAPS, et 0,002% de Bleu de Bromophénol). Après l'installation des strips dans la chambre d'électrophorèse, la migration (focalisation isoélectrique) a été effectuée à 175V pendant 15

min, de 175V à 2000V pendant 45 min et à 2000V pendant 30min. Après migration, les strips ont été équilibrées dans un bain dénaturant de LDS supplémenté de dithiothréitol 130mM pendant 10 min puis dans un bain LDS supplémenté d'iodoacétamide 135 mM, durant 10 min également. Les protéines contenues dans les strips ont ensuite été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 10%. Les protéines ont été ensuite soit colorées avec une solution de bleu de coomassie (Imperial™ Protein Stain) soit transférées sur une membrane de PVDF.

## 2. Analyse des protéines d'intérêt par MALDI-TOF

Les bandes ou les spots d'intérêts ont été excisés d'un gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie, découpées en petits cubes et placés dans des tubes 1,5 mL (Eppendorf). 100µL d'un mélange de bicarbonate d'ammonium (100mM pH 8) et d'acétonitrile (V/V) ont été ajoutés dans chaque tube et incubés jusqu'à la décoloration des cubes de gel. Les gels ont été ensuite déshydratés par ajout de 500µL d'acétonitrile. Une digestion enzymatique des protéines a ensuite été réalisée en tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM en présence de trypsine (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin) à 13 ng/µL, pendant une nuit à 37°C sous agitation. Ensuite, un microlitre d'un mélange (V/V) d'échantillons et d'une solution d' $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique hydroxycinnamique ( $\alpha$ -CHCA) ont été déposés sur une plaque MTP AnchorChip 384 BC (Bruker) pour analyse MADI-TOF.

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un instrument UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) fonctionnant en mode reflectron à ions positifs. Avant la détection des peptides d'intérêt, l'instrument a été calibré à l'aide du : Peptide Calibration Standard II (Bruker, Palaiseau, France). Les spectres MS ont été obtenus sur la gamme 500 à 5000 Da et les spectres ont été analysés par le logiciel FlexControl (version 3.4.135, Bruker Daltonics, Allemagne). Les pics d'autolyse de la trypsine, des contaminants (notamment kératine) et de la matrice ont été soustraits. Les données expérimentales ainsi obtenues ont été comparées à des listes de masses théoriques obtenues par digestion *in silico* de l'ensemble des séquences protéiques connues dans la banque de données. Les protéines ont été identifiées à l'aide du logiciel MS-fit qui permet notamment de sélectionner la souche *Borrelia burgdorferi* au sein de la base de données : SwissProt.2021.06.18. Pour l'analyse, nous avons toléré une marge d'erreur de masses moléculaires pas trop restreinte, de  $\pm 1,2$  Da, afin de se donner plus de chance d'aboutir à des affectations significatives. De plus, pour l'identification d'une protéine, nous avons sélectionné un minimum de 4 peptides reconnus. Concernant les modifications, nous avons sélectionné comme modification fixe la carbamidométhylation de la cystéine.

Nous avons également pris en compte des modifications post-traductionnelles qui peuvent s'appliquer à certains résidus comme l'oxydation des méthionines, l'acétylation des amines N-terminales ou encore la conversion du glutamate N-terminal en pyroglutamate. Nous avons aussi ajouté la possible omission de coupure par la trypsine au nombre de 1.

## ***IV. Production des anticorps monoclonaux***

### **1. Production et purification des protéines recombinantes**

Les protéines recombinantes ont été produites à partir de gènes synthétiques (GeneCust, Boynes, France) sur la base de séquences publiées dans la GenBank. Les références des séquences utilisées sont : (i) ABA42057.1 pour OspC, (ii) AB253532.1 pour OspA, (iii) GU826786 pour FlaB et (iv) AJ850088.1 pour VlsE. Les protéines ont été produites soit dans la fraction soluble des bactéries pour OspA et OspC soit dans des corps d'inclusions pour FlaB, VlsE. Chaque gène synthétique a été inséré entre les sites de restriction *NdeI* et *XhoI* du vecteur pET22b (Novagen) inductible à l'IPTG, permettant l'expression des protéines recombinantes avec une étiquette histidine.

#### **1.1 Production des protéines recombinantes dans la fraction soluble**

*Escherichia coli* BL21 (DE3) transformé avec le plasmide pET22b contenant le gène synthétique d'intérêt a été cultivé dans du bouillon Luria supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline à 37 °C sous agitation à 220 rpm jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance (densité optique (DO) à 600 nm entre 0,4 et 0,6) et induit avec l'addition de 1 mM d'isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG) pendant 4 h à 37 °C. La culture a été centrifugée pendant 20 min à 2500×g à 4 °C et les cellules ont été remises en suspension dans le tampon de liaison A (tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4, 300 mM NaCl) complété par 1 mM de chlorhydrate de fluorure de 4-(2-aminoéthyl) benzène sulfonyle (AEBSF). Les cellules ont été soniquées (1 min à 14 W), puis centrifugées à 14 000×g pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant final, correspondant à la fraction soluble.

#### **1.2 Production des protéines recombinantes dans les corps d'inclusion**

Les protéines recombinantes FlaB et VlsE ont été produites comme décrit ci-dessus, sauf que le tampon de liaison A a été remplacé par un tampon dénaturant contenant 100 mM de

tampon phosphate de potassium, 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 8 M d'urée, AEBSF 1mM pH 8. Le surnageant récupéré correspond ici aux corps d'inclusions solubilisés.

### 1.3 Purification des protéines par chromatographie d'affinité

Les purifications des protéines recombinantes ont été réalisées sur colonne de « Chelating Sepharose Fast Flow » (Cytiva) chargée avec des ions Ni<sup>2+</sup> selon les recommandations du fournisseur. Les surnageants correspondant aux fractions protéiques solubles ou insolubles ont été mis en contact avec le gel de Ni<sup>2+</sup> pendant 2h à température ambiante sous agitation. Après lavage avec le tampon de liaison, l'élution des protéines recombinantes a été réalisée en tampon de liaison supplémenté de 0,5M d'imidazole. Les fractions éluées les plus concentrées en protéine ont été regroupées et dialysées contre un tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM pendant une nuit à 4°C.

### 1.4 Dosage des protéines recombinantes

Les protéines recombinantes purifiées ont été quantifiées en utilisant le kit de dosage des protéines BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) et la pureté a été évaluée par électrophorèse sur puce microfluidique (kit Protein 230, agilent) au moyen du système de bioanalyse Agilent 2100. Les protéines ont été conservées à - 20 °C jusqu'à leur utilisation.

## 2. Le couplage des peptides à la BSA-SMC

Le peptide d'intérêt pour la protéine OspC correspond au peptide C-terminal : PVVAESPKKP, il sera nommé par la suite peptide C10<sup>343</sup>. Pour la protéine VlsE le peptide d'intérêt est : MKKDDQIAAAIALRGMAKDGGKFAV, il correspond au peptide C6<sup>356</sup>. Ces deux peptides additionnés d'une cystéine en N-terminale ont été pesés de sorte à obtenir 0,8 μmol de chaque. Chaque peptide a été repris selon sa solubilité en méthanol ou en tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,0. Après une mesure des thiols des cystéines par la méthode d'Ellman, 0.375μmol de BSA couplé à la SMC (6-Maleimidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester) a été ajoutée au mélange. Après incubation sur la nuit à 4°C, les couplages peptide-BSA-SMC ont été conservés à -20°C. Les couplages ont été vérifiés par une analyse MALDI-TOF.

### **3. Production des anticorps monoclonaux (AcMs)**

#### **3.1 L'immunisation des souris**

Les souris ont été immunisées comme décrit dans le paragraphe II.3.

#### **3.2 L'obtention des hybridomes par fusion**

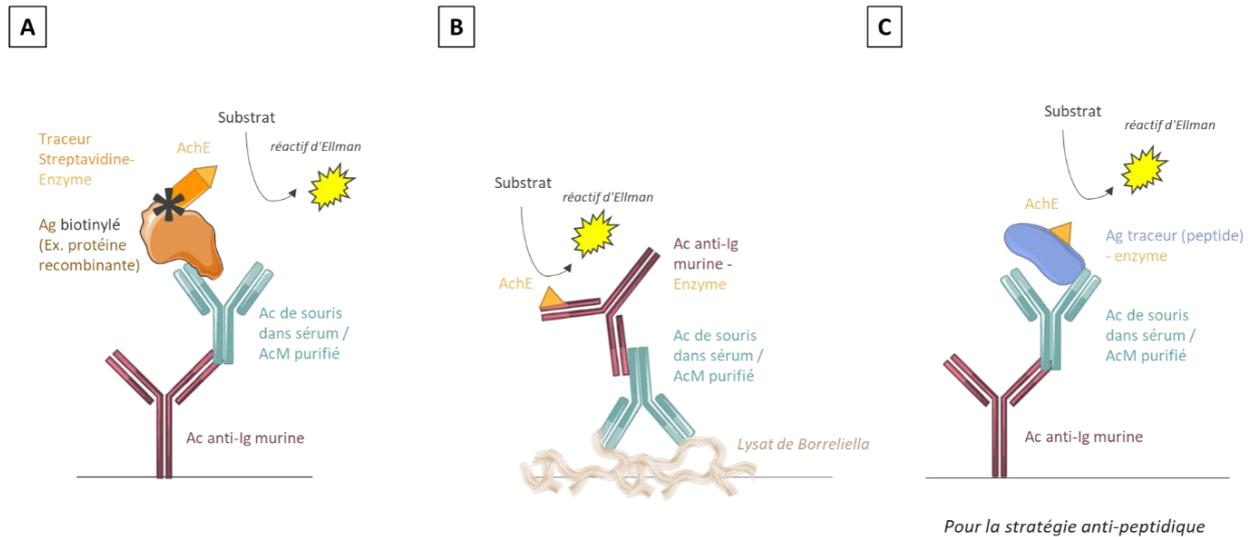
Afin d'obtenir des hybridomes producteurs d'anticorps, des fusions entre les lymphocytes B des souris immunisées et des cellules de myélome ont été réalisées selon la technique décrite par Köhler et Milstein<sup>378</sup>. Après immunisation, les deux souris présentant le titre en anticorps le plus élevé ont été sélectionnées puis sacrifiées afin de prélever les rates riches en splénocytes. Les cellules de rate ont été fusionnées avec des cellules de myélome murin (NS1) par remise en suspension avec du polyéthylène glycol (PEG400). Les cellules ont été ensuite reprises en milieu sélectif Hypoxanthine Aminoptérine-Thymidine (HAT), reparties en microplaques 96 puits et incubées à 37°C sous 7% CO<sub>2</sub> (en milieu RPMI, 15% SVF). Dans ces conditions, seuls les hybridomes sont capables de proliférer. Tout au long du processus de sélection et des étapes de clonage des hybridomes, les surnageants de culture ont été testés pour confirmer la présence d'anticorps spécifiques de l'immunogène à l'aide d'un test immuno-enzymatique (comme décrit dans le paragraphe iv.4.). Les hybridomes, sécréteurs d'anticorps spécifiques, ont été clonés par la méthode de dilution limite comme décrit précédemment<sup>369</sup>.

#### **3.3 La purification et l'isotypage des anticorps monoclonaux**

Les AcM ont été produits en surnageant de culture et purifiés par chromatographie d'affinité protéine G (HiTrap Protein G ; Cytiva) en utilisant un système ÄKTExpress (Cytiva). Les fractions d'anticorps les plus concentrées ont été regroupées et dialysées une nuit à 4 °C contre du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 en utilisant une membrane semi-perméable (Spectra/Por Molecular porous membrane tubing MWCO 12-14 kD). Après dialyse, la concentration des anticorps monoclonaux a été déterminée par mesure de leur absorbance à 280 nm avec le système Nanodrop ND1000 (Labtech). La pureté des anticorps a ensuite été évaluée par une analyse électrophorétique avec le système 2100 Bioanalyzer (Agilent). L'isotypage des AcMs obtenus a été réalisé avec le kit « Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping » (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) selon les consignes du fournisseur.

## 4. Les dosages immuno-enzymatiques pour le criblage des anticorps monoclonaux

Pour mesurer les anticorps monoclonaux dans les plasmas des souris immunisées et dans les surnageants de culture d'hybridomes, plusieurs formats de dosages immuno-enzymatiques ont été réalisés (figure 59).



**Figure 59 : Format des dosages immuno-enzymatiques pour le criblage de nos AcMs.**

(Créé avec des images tirées de Servier Medical Art, Creative Commons Attribution 3.0 Unported License).

(A) Ce format de test est utilisé pour déterminer si les AcMs reconnaissent les protéines recombinantes correspondantes. (B) Ce test permet de déterminer si les AcMs reconnaissent les protéines natives d'intérêt contenues dans un lysat bactérien. (C) Ce test est utilisé afin de déterminer si les anticorps anti-peptides reconnaissent les peptides d'intérêts, pour ce faire les peptides ont été couplés avec le peptide G4.

Des plaques de microtitration revêtues d'anticorps de chèvre anti-souris (Jackson ImmunoResearch) et saturées avec de la BSA, ont été incubées avec 50  $\mu$ L de dilution de sérum (1/100, 1/1000, 1/10000 et 1/100000) ou de surnageant de culture d'hybridomes pendant 2 h à température ambiante (RT). Après trois lavages, 50  $\mu$ L de protéines biotinyllés (100ng/ml) ou de peptide marqué à l'AChE (1 UE/ml) ont été ajoutés par puits et incubés 2h à température ambiante. Pour les plaques avec le traceur biotinyllé, après une étape de lavage, 50 $\mu$ L de traceur streptavidine-AChE (2 UE/mL) ont été incubés pendant 30 min à RT. Les plaques ont été ensuite lavées trois fois et 200 $\mu$ L de réactif d'Ellman ont ajoutés par puits. L'absorbance à 414 nm a été mesurée après 30 min de réaction à RT.

Pour évaluer la reconnaissance de *Borrelia* par les anticorps, nous avons utilisé l'ELISA comme décrit dans le partie partie III.2.2.

## ***IV. Caractérisation des anticorps monoclonaux***

### **1. L'analyse combinatoire**

Pour déterminer les meilleures paires d'AcMs à utiliser dans un test immunométrique à deux sites, une analyse combinatoire a été réalisée en utilisant chaque AcM soit comme anticorps de capture, soit comme anticorps traceurs biotinylés. L'analyse combinatoire a été réalisée en utilisant la protéine recombinante d'intérêt ou différentes souches de *Borrelia*.

#### **1.1 La préparation des phases solides**

Les anticorps de capture ont été immobilisés sur des plaques de microtitration en distribuant 100 µL/puits d'anticorps à 10 µg/mL dans un tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 7,4 et en incubant les plaques pendant une nuit à RT. Les plaques ont ensuite été saturées avec du tampon EIA pendant 4 heures à température ambiante, puis conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

#### **1.2 Le test ELISA pour la combinatoire**

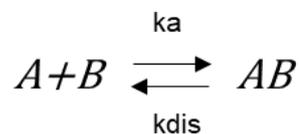
Les plaques revêtues d'anticorps ont été lavées trois fois puis incubées une nuit à 4°C avec 100 µL d'une suspension contenant 10<sup>6</sup> spirochètes/mL soniquées ou 100 µL de protéine recombinante (10 ng/mL et 1 ng/mL). Après une étape de lavage, 100 µL d'AcM traceur marqué à la biotine (100 ng/mL) ont été ajoutés par puits et incubés pendant 4h à RT. Après un nouveau lavage, 100 µL/puits de streptavidine-AChE (2 UE/mL) ont été ajoutés et incubés pendant une heure à RT. Après un dernier lavage, l'activité de l'AChE a été révélée avec le réactif d'Ellman. Une analyse combinatoire similaire a été réalisée pour la sélection des meilleures paires d'anticorps anti-peptidique en utilisant l'OspC ou VlsE recombinant (de 100 pg à 2 ng/mL) par la méthode SPIE-IA (cf.v.1.2).

### **2. L'interférométrie de bio-couche (Bio-layer interferometry ou BLI)**

La cinétique d'interaction des anticorps avec leur cible a été mesurée en utilisant l'interférométrie en couche biologique avec le système Octet Red96e de fortéBio (Sartorius) selon les instructions du fabricant.

L'étude cinétique comprend 5 grandes parties : le chargement des anticorps sur les capteurs, l'établissement de la ligne de base, suivi de l'étape d'association, puis de l'étape de dissociation et éventuellement de la régénération des biosenseurs.

Brièvement, les AcMs ont été chargés sur des biocapteurs AMC (IgG anti-souris se liant à la partie Fc des IgG) de fortéBio (Sartorius), préalablement hydratés avec du tampon d'essai décrit dans (i.1.) pendant 10 minutes. Les mesures ont été réalisées à 25 °C sous agitation à 1000 rpm. Pour la détermination de la constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ), chaque AcM a été chargé sur un capteur à 10 µg/mL. Avant toute analyse la ligne de base a été établie afin d'évaluer la dérive causée par la liaison non spécifique ou l'effet tampon. La ligne de base a été réalisée dans le tampon d'essai. Les capteurs ont ensuite été exposés à différentes concentrations de protéines recombinantes (de 200 à 5 nM) et l'association a été mesurée pendant 300s. Les biocapteurs ont ensuite été plongés pendant 10 min dans la solution tampon sans analyte, c'est l'étape de dissociation. Les surfaces des biocapteurs ont été régénérées par trempage dans un tampon glycine 10 mM à pH 1,3 pendant 20s. L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel d'analyse de données de l'Octet, version 10.0 (fortéBio LLC, Sartorius). Après soustraction de la valeur de référence correspondant au capteur exposée à une solution sans antigène, les données expérimentales ont été ajustées avec les équations décrivant un modèle de liaison classique 1:1.



L'association et la dissociation sont décrites par un modèle exponentiel. La constante de vitesse d'association ( $K_a$ ), la constante de vitesse de dissociation ( $K_{dis}$ ) et le  $K_D$  ont été obtenus à l'aide des équations du modèle. L'équation caractéristique de l'association pour ce modèle est la suivante<sup>379,380</sup>:

$$y = Rmax \frac{1}{1 + \frac{K_{dis}}{K_a[analyte]}} (1 - e^{-(K_a[analyte]+K_{dis})t})$$

$Rmax$  : capacité maximale de fixation sur le biocapteur

$t$  : temps

$[Analyte]$  : concentration du composé d'intérêt dans la solution analysée

L'équation caractéristique de l'association pour ce modèle est la suivante<sup>379</sup>:

$$y_0 = R_{max} \frac{1}{1 + \frac{K_{dis}}{K_a[analyte]}} (1 - e^{-(K_a[analyte] + K_{dis})t_0})$$

$$y = y_0 e^{-kd(t-t_0)}$$

$y_0$  : taux de liaison au temps  $t_0$

$t_0$  : temps marquant la transition association/dissociation

Les valeurs  $K_D$  ont été calculées comme le rapport  $K_{dis}/K_a$ .

### 3. Détermination de la sensibilité de détection en western blot

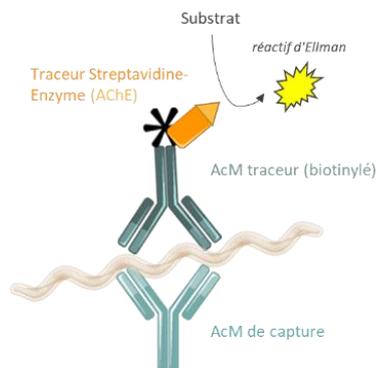
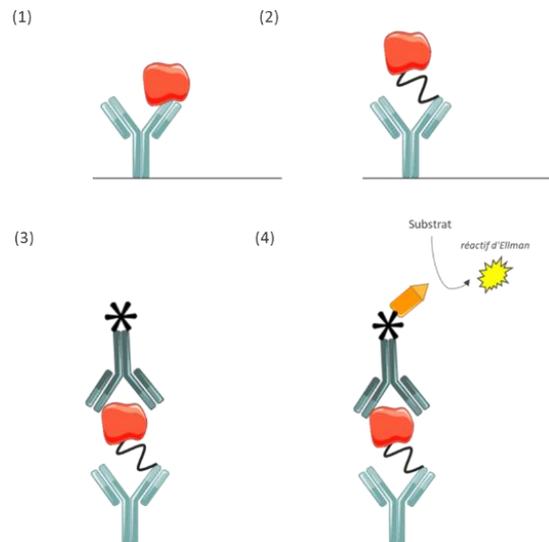
Pour déterminer la sensibilité de détection obtenue avec les anticorps monoclonaux, des suspensions bactériennes de différentes souches de *Borrelia* ou des protéines recombinantes ont été séparées par électrophorèse SDS PAGE et transférées sur membrane PVDF (cf. paragraphe iii.3.). Pour optimiser la détection, de nombreux paramètres ont été évalués comme (i) la composition du tampon de saturation de la membrane de PVDF, (ii) la nature de l'anticorps primaire, conjugué ou non à biotine et (iv) le kit de révélation chimiluminescent. Les conditions optimales retenues sont celles décrites ci-dessous.

Les AcMs couplés à la biotine ont été utilisés dilués à 0,5 µg/mL dans 1% de BSA, PBST pendant 1h à RT. La membrane de PVDF a ensuite été lavée trois fois en PBST et incubée pendant 20 min à RT avec de la streptavidine couplée à de la peroxydase polymérisée diluée au 1:40 000 (Pierce, Thermo Fisher Scientific) en tampon 3% de BSA/PBST. Après quatre lavages en tampon PBST, les protéines ont été détectées par chimiluminescence (ECL Select, GE Healthcare).

## V. Mise en place des différentes méthodes de dosages

### 1. Les dosages immunométriques

Deux types de tests ELISA ont été mis en place selon le format montré dans la figure 60.

**A****B**

**Figure 60 : Format des tests ELISA pour le dosage des cibles.**

(Créé avec des images tirées de Servier Medical Art, Creative Commons Attribution 3.0 Unported License). **(A)** Test immunométrique à deux sites : ELISA sandwich. Ce test est réalisé pour la détection de FlaB et d'OspA. **(B)** Dosage SPIE-IA pour détecter les cibles OspC et VlsE. (1) L'antigène est capturé par l'anticorps coâté sur les microplaques ; (2) l'antigène et l'anticorps sont liés de façon covalente ; (3) le complexe anticorps/analyte est dissocié entraînant une libération de l'épitope ; (4) l'anticorps traceur biotinylé fixe l'épitope libéré, lequel est ensuite détecté par la liaison de streptavidine couplé à l'AChE puis révélation avec le réactif d'Ellman.

## 1.1 Dosage sandwich pour la détection de FlaB et OspA

L'ELISA ou dosage sandwich de FlaB et OspA a été réalisé comme décrit pour l'analyse combinatoire dans le paragraphe iv.1.2.

## 1.2 Le SPIE-IA pour le dosage d'OspC et VlsE

La méthode SPIE-IA (*Solid phase-immobilized epitope immunoassay*) a été développée il y a plusieurs années dans notre laboratoire<sup>381</sup>. Cette méthode permet la mesure de petites molécules dans un format « immunométrique à deux sites ». Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un épitope unique reconnu successivement par l'anticorps de capture et l'anticorps traceur et implique une liaison covalente de l'analyte à la phase solide.

Pour résumé, les échantillons ont été déposés sur une phase solide revêtue d'AcM anti-peptide pendant 2 heures à RT. Après une première étape de lavage, la protéine liée à la phase solide a été immobilisée de façon covalente avec l'AcM de capture en utilisant du glutaraldéhyde (0,1 % pendant 5 minutes à RT). Après une deuxième étape de lavage, les antigènes liés à la phase solide ont été ensuite libérés des épitopes des anticorps de capture par

l'action de HCL 1M. Après une troisième étape de lavage, les puits ont été incubés avec les AcMs biotinylés (100 ng/mL), pendant 2h à RT. Après une étape de lavage, les puits ont été incubés avec le traceur streptavidine-AChE (1 EU/mL) pendant 45 minutes, puis révélé avec le réactif d'Ellman.

### **1.3 La limite théorique de détection et de quantification des immunodosages**

Pour tous les ELISA, la LoD et la LoQ ont été calculées à l'aide du logiciel PRISM® v.5.04 (GraphPad Software Inc) avec un modèle de régression non linéaire utilisant un ajustement de courbe de liaison spécifique à deux sites. La LoD est définie comme la plus faible concentration de protéine donnant un signal supérieur à la liaison non spécifique. La LoD est calculée comme la moyenne de 8 mesures minimum du tampon ou de la matrice + 3 écarts types. La LoQ est définie comme la plus faible concentration de protéine qui peut être déterminée quantitativement. La LoQ est calculée comme la moyenne de 8 mesures minimum du tampon ou de la matrice + 10 écarts types.

## **2. L'immunocapture suivie du western blot**

Pour améliorer la détection des antigènes dans les tissus et les échantillons de sérum, nous avons développé une méthode de concentration basée sur l'enrichissement par immunoaffinité avec des billes magnétiques (Dynabeads M-280 tosyl-activated, Thermo Fisher Scientific) couplées à nos AcMs suivi d'une détection par western blot.

L'efficacité des expériences d'immunocapture est un facteur important pour la détection de protéines peu abondantes, en particulier dans les matrices complexes. Pour déterminer les conditions optimales d'immunocapture, nous avons étudié différents paramètres notamment (i) la sélection des anticorps liés aux billes, (ii) la dilution de l'échantillon, (iii) le temps d'immunocapture et (iv) l'étape de lavage.

Les meilleures conditions sélectionnées correspondent : (i) anticorps FlaB-15, OspA-22, C10-11, C6-7, (ii) un extrait de tissus à 0,5% (poids/volume) ou du plasma dilué au 1/10, (iii) l'immunocapture dure pendant 1h, (iv) et trois lavages étaient suffisant.

Ces conditions nous ont permis d'obtenir de bons rendements, de plus de 90% pour FlaB et OspC à partir de 5 mg de tissus ou de 50 µL de plasma.

L'immunoprécipitation a été réalisée comme suit : les AcMs (200 µg) ont été couplés à 10 mg de billes magnétiques et saturées de BSA. Les échantillons (100 µL) ont été dilués au 1/10 en tampon EIA et incubés avec 20 µL de billes couplées aux anticorps pendant 1 h à RT. Après trois lavages avec du PBS-Tween, les billes ont été remises en suspension dans 15 µL de tampon Laemmli. Les étapes d'incubation et de lavage ont été réalisées à l'aide du robot King Fisher Duo Prime (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) et les protéines liées ont été analysées par immunoblot comme décrit précédemment.

### 3. L'extraction protéique des échantillons murins

Les tissus de souris ont été collectés dans un tube propre avec des instruments aseptiques et stockés à - 20 °C jusqu'à leur utilisation.

Nous avons optimisé l'extraction des tissus en testant : (i) différents tampons d'extraction (ii) de conditions de lyse mécanique des cellules sur une biopsie de peau de 15mg. La concentration de protéine extraite pour chaque condition a été déterminée à l'aide du kit de dosage des protéines BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

Nous avons comparé deux tampons de lyses<sup>382</sup> :

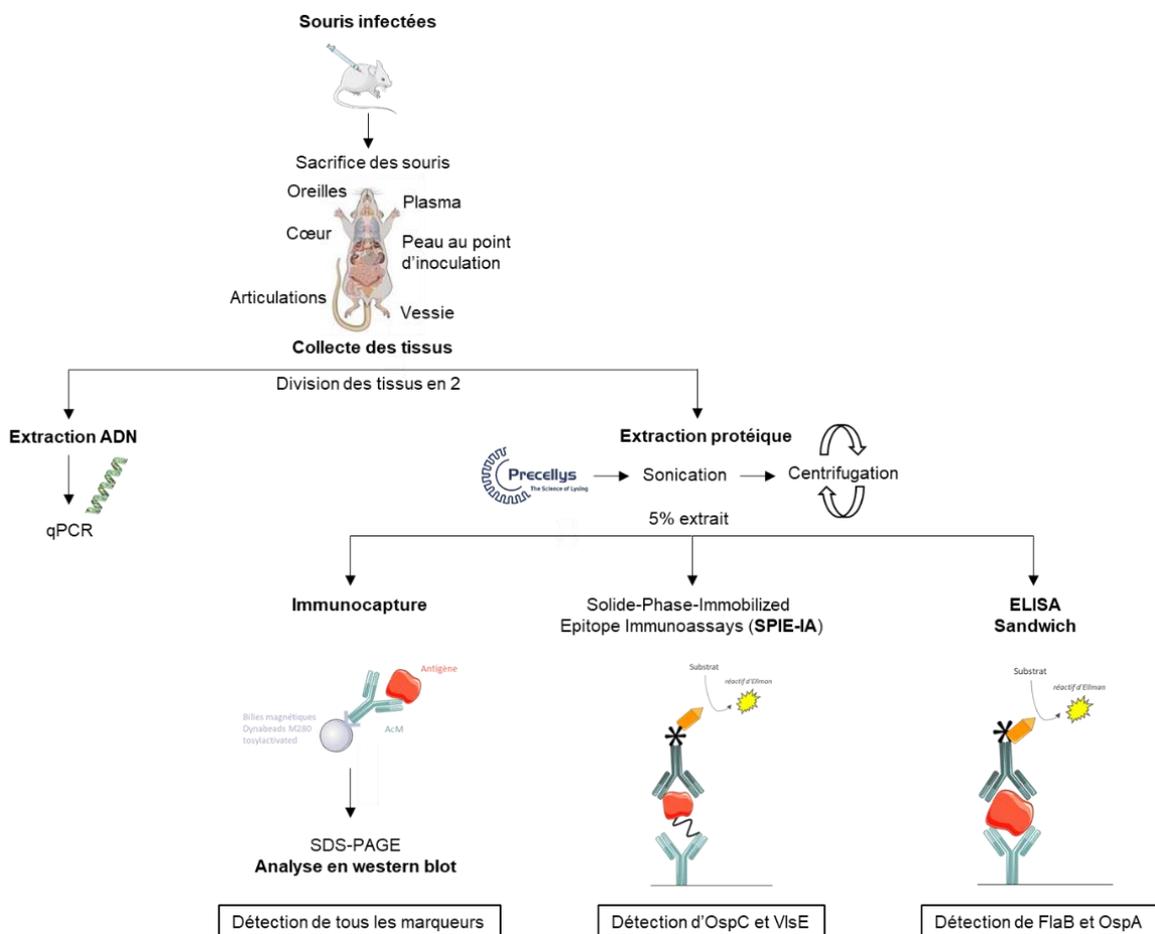
- Un tampon contenant 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0,5% de désoxycholate de sodium ;
- Un autre composé de 150mM de NaCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1% de triton X-100, pH 7,8.

Nous avons obtenu une extraction 1,25 fois supérieure avec le premier tampon. La concentration de protéines extraites avec ce tampon a été estimée à 2 mg/mL de protéine soit : 40 µg de protéines/mg tissue<sup>383-385</sup>.

Concernant le protocole d'extraction, les échantillons subissent une étape de broyage mécanique dans le tampon suivi de cycles de sonication. Nous avons tout d'abord testé 2 types de billes différentes puis nous avons testé deux cycles différents de broyages. Pour les billes, un mélange de billes de verres et de céramique SK28 a été comparé des billes en céramiques CK28 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). En présence d'une étape de sonication, nous avons obtenu un rendement similaire de 46,6 µg de protéines/ mg de biopsie<sup>385</sup>. En ce qui concerne les cycles de broyage, nous avons comparé l'effet de deux cycles de broyage contre quatre. Nous avons remarqué que quatre cycles permettaient une lyse totale de l'échantillon et de multiplier par 1,5 le rendement d'extraction.

L'ensemble des optimisations réalisées pour l'extraction des protéines a permis de retenir ces conditions finales :

L'échantillon de tissus (15 mg) a été placé dans des tubes de lyse de 2mL avec deux billes en céramique **CK28** (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France), 300  $\mu$ L de **tampon de lyse** (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0,5% de désoxycholate de sodium) et avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). L'échantillon a été traité avec un homogénéisateur de tissus Precellys 24 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) en utilisant **quatre cycles** de 20 secondes à 6500 rpm. L'échantillon a ensuite été soniqué deux fois pendant 1 minute et centrifugé pendant 10 min à 15 000 $\times$  g, le surnageant a été recueilli et la concentration en protéine a été déterminée à l'aide du kit de dosage des protéines BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).



**Figure 61 : Schéma décrivant les étapes pour l'analyse des tissus infectés à *Borrelia*.**

(Créé avec des images tirées de Servier Medical Art, Creative Commons Attribution 3.0 Unported License et l'image de l'anatomie de la souris provient de Wikimedia Commons, Creative Commons Attribution-share Alike 4.0 international License). Après l'infection et le sacrifice des souris, les organes sont collectés pour la quantification de *Borrelia* par qPCR et pour l'analyse des protéines. Trois méthodes sont utilisées pour détecter les marqueurs: une méthode duplex pour la détection de tous les marqueurs comprenant une étape d'immuno-enrichissement avant une analyse par western blot, un ELISA sandwich pour la détection de FlaB et OspA, et SPIE-IA pour la détection d'OspC et de VlsE.

## VI. Analyse d'une cohorte d'échantillons de sérum humain

### 1. Les sérums Cerba

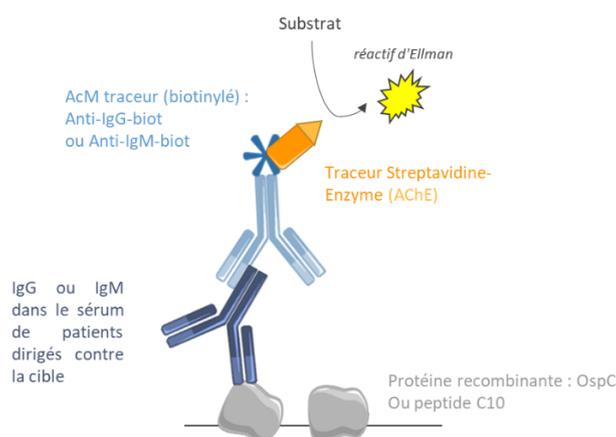
Les sérums proviennent du laboratoire Cerba Xpert. Les échantillons ont été caractérisés par deux tests ELISA décrit dans le tableau 21. Parmi les 100 échantillons de sérums, nous avons demandé des échantillons positifs en IgM et négatifs en IgG

**Tableau 21 : Tests sérologiques utilisés par le laboratoire Cerba Xpert.**

Euroimmun			
Anticorps anti-Borrelia (IgM)	Détecte les Ig dirigés contre les antigènes de <i>Borrelia</i>	Mélange d'extraits totaux de <i>Bb ss</i> , <i>Ba</i> , <i>Bg</i>	Négatif < 16 Douteux 16-22 Positif > 22 UR/mL (unités relatives)
Siemens			
Enzygnost Lyme link VlsE/IgG	Détecte les Ac anti- <i>B. burgdorferi</i>	Mélange d'Ag <i>Bb</i> inactivé (extrait Pko de <i>Ba</i> ), de VlsE recombinant de <i>Ba</i> , <i>Bg</i> , <i>Bb ss</i>	Négatif < 7 Douteux 7-14 Positif > 14 U/mL

### 2. Dosage ELISA des réponses IgG et IgM dirigées contre le peptide C10

Les dosages immunoenzymatiques des IgG et IgM spécifiques dirigés contre la protéine recombinante OspC (constitué du peptide C10) et le peptide C10 ont été réalisés par dosage ELISA dont le principe est montré dans la figure 62.



**Figure 62 : Format du test ELISA pour le dosage des IgG et IgM spécifiques sur antigènes immobilisés.**

(Créé avec des images tirées de Servier Medial Art, Creative Commons Attribution 3.0 Unported License). Ce test comprend 4 grandes étapes : (1) Les IgG ou IgM présents dans le sérum se fixent spécifiquement sur la protéine recombinante OspC ou le peptide C10 immobilisés sur la phase solide ; (2) des AcM anti-IgG ou IgM humain biotinylés se fixent sur les IgM ou IgM humain ; (3) La streptavidine-AChE se fixe aux anticorps biotinylés ; (4) l'activité AChE est révélée.

Les phases solides revêtues d'OspC (à 5 µg/mL) ou de peptide C10 couplé à la BSA (2 µg/mL) sont préparées comme décrit précédemment (cf. iii.2.1.).

Les sérums dilués au 1/100 dans du tampon « séro » optimisé par le laboratoire pour le dosage des IgG et IgM ont été déposés sur des plaques revêtues d'OspC ou de BSA-C10. Après une incubation de 2h à RT, les plaques ont été incubées avec un anticorps monoclonal anti-IgG humain produit au laboratoire et couplé à la biotine (100 ng/mL par puits). De la même façon pour la détection des anticorps IgM humains, un anticorps anti-IgM humain produit au laboratoire et couplé à la biotine a été utilisé. Après 2h d'incubation à RT, les puits ont été lavés et du traceur streptavidine-AChE a été ajouté à 4 EU/mL et incubé pendant 45min à RT. Après trois lavages, l'activité AChE a été révélée par l'ajout de 200 µL/puits de réactif d'Ellman. Les valeurs d'absorbance à 414nm sont mesurées.

### **3. Mise au point d'une méthode de dissociation de complexes immuns**

Nous avons développé un protocole de traitement de l'échantillon qui permet la dissociation de complexes immuns anticorps/OspC formés artificiellement en vue de la détection de la protéine OspC dans la circulation sanguine. Pour ce faire, nous avons comparé l'effet de différents traitements sur un complexe antigène-anticorps impliquant la protéine d'OspC et l'anticorps AcM C10.

L'AcM C10-11 à 10µg/mL a été incubé avec 40 ng/mL de la protéine recombinante OspC dans 200µL de sérum, pendant 1h sous légère agitation à 37°C afin de former les complexes antigène-anticorps. Des témoins sans anticorps ont été réalisés. cinq conditions de décomplexation ont été évaluées<sup>366-368</sup> :

- (1) Dilution au ½ du sérum dans de l'eau et chauffage 5min à 95°C ;
- (2) Dilution au ½ du sérum dans de l'eau et chauffage 30min à 60°C ;
- (3) Dilution au ½ du tampon phosphate de potassium 10mM à pH 7,4 et chauffage 30min à 60°C. Une centrifugation à 10 000xg pendant 10min est réalisé. Le surnageant est ensuite récupéré et tamponné à 7,4 à l'aide du tampon phosphate additionné de BSA à 5mg/mL ;
- (4) Choc acide du sérum avec du tampon acétate de sodium 1M à pH 5 et chauffage 30 min à 60°C. Une centrifugation à 10 000xg pendant 10min est réalisé. Le surnageant est

ensuite récupéré et tamponné à 7,4 à l'aide du tampon phosphate additionné de BSA à 5mg/mL ;

- (5) Choc acide du sérum avec du tampon citrate de sodium 1M à pH 3 et chauffage 30min à 60°C. Une centrifugation à 10 000xg pendant 10min est réalisé. Le surnageant est ensuite récupéré et tamponné à 7,4 à l'aide du tampon phosphate additionné de BSA à 5mg/mL.

Un dosage de type SPIE-IA décrit dans le V.1.2 avec le couple C10-11 / C10-11\* est réalisé afin de doser l'OspC libre.

# *Bibliographie*

1. Marques, A. R., Strle, F. & Wormser, G. P. Comparison of Lyme Disease in the United States and Europe. *Emerg Infect Dis* **27**, 2017–2024 (2021).
2. Wang, G., van Dam, A. P., Schwartz, I. & Dankert, J. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* **12**, 633–653 (1999).
3. 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).
4. Eldin, C. *et al.* Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Med Mal Infect* **49**, 121–132 (2019).
5. Steere, A. C. & Sikand, V. K. The presenting manifestations of Lyme disease and the outcomes of treatment. *N Engl J Med* **348**, 2472–2474 (2003).
6. Hyde, J. A. *Borrelia burgdorferi* Keeps Moving and Carries on: A Review of Borrelial Dissemination and Invasion. *Front Immunol* **8**, 114 (2017).
7. Russell, A. L. R., Dryden, M. S., Pinto, A. A. & Lovett, J. K. Lyme disease: diagnosis and management. *Practical Neurology* **18**, 455–464 (2018).
8. Talagrand-Reboul, E., Raffetin, A., Zachary, P., Jaulhac, B. & Eldin, C. Immunoserological Diagnosis of Human Borreliosis: Current Knowledge and Perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 241 (2020).
9. Raffetin, A. *et al.* Unconventional diagnostic tests for Lyme borreliosis: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* **26**, 51–59 (2020).
10. Santé publique France. La maladie de Lyme, Réseau Sentinelles, UMR S 1136, Inserm/UPMC. <https://www.sentiweb.fr/france/fr/?page=table&maladie=18>.
11. Mead, P. S. Epidemiology of Lyme Disease. *Infectious Disease Clinics of North America* **29**, 187–210 (2015).

12. Burgdorfer, W. The Historical Road to the Discovery of *Borrelia burgdorferi*. in *Aspects of Lyme Borreliosis* 21–28 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1993).
13. Dammin, G. J. Erythema Migrans: A Chronicle. *Rev Infect Dis* **11**, 142–151 (1989).
14. Kassis, V., Kassis, E. & Thomsen, H. K. Erythema chronicum migrans: Afzelius and Lipschütz. *Journal of the American Academy of Dermatology* **13**, 663–664 (1985).
15. Garin, Ch. & Bujadoux, MM. Paralyse par les Tiques. *Le journal de médecine de Lyon* 765 (1922).
16. Hollstrom, E. Successful treatment of erythema migrans Afzelius. *Acta Derm Venereol* **31**, 235–243 (1951).
17. Binder, E., Doepfmer, R. & Hornstein, O. Experimental transmission of chronic erythema migrans from man to man. *Hautarzt* **6**, 494–496 (1955).
18. Scrimenti, R. J. Erythema Chronicum Migrans. *Archives of Dermatology* **102**, 104–105 (1970).
19. Steere, A. C. *et al.* An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis & Rheumatism* **20**, 7–17 (1977).
20. Burgdorfer, W. *et al.* Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**, 1317–1319 (1982).
21. Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W., Steigerwalt, A. G. & Brenner, D. J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **34**, 496–497 (1984).
22. Schoch, C. L. *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* **2020**, baaa062 (2020).
23. Brites-Neto, J., Duarte, K. M. R. & Martins, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Vet World* **8**, 301–315 (2015).

24. Boulanger, N. & McCoy, K. Chapitre 25. Les tiques (Acari : Ixodida). in *Entomologie médicale et vétérinaire* (eds. Duvallet, G., Fontenille, D. & Robert, V.) 553–596 (IRD Éditions, 2018).
25. Guglielmone, A. A. *et al.* The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world : a list of valid species names. (2010).
26. Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E. & Hansmann, Y. Ticks and tick-borne diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses* **49**, 87–97 (2019).
27. Xu, G., Fang, Q. Q., Keirans, J. E. & Durden, L. A. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J Parasitol* **89**, 452–457 (2003).
28. Barker, S. C. & Murrell, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* **129 Suppl**, S15–36 (2004).
29. Anderson, J. F. & Magnarelli, L. A. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America* **22**, 195–215 (2008).
30. Bonnet, S. *et al.* 2. Biologie des tiques. in *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie* (eds. Boulanger, N. & McCoy, K. D.) 53–84 (IRD Éditions, 2017).
31. Bonnet, S. *et al.* 2. Biologie des tiques. in *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie* (eds. Boulanger, N. & McCoy, K. D.) 53–84 (IRD Éditions, 2017).
32. Sonenshine, D. E. *Biology of Ticks*. vol. 1 (1991).
33. Herrmann, C. & Gern, L. Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors* **8**, (2015).
34. Anderson, J. F. Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis Suppl* **77**, 23–34 (1991).

35. Eisen, L. Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: A review. *Ticks Tick Borne Dis* **11**, 101359 (2020).
36. Carr, A. L. *et al.* Tick Haller's Organ, a New Paradigm for Arthropod Olfaction: How Ticks Differ from Insects. *Int J Mol Sci* **18**, 1563 (2017).
37. Perret, J.-L., Guerin, P. M., Diehl, P. A., Vlimant, M. & Gern, L. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Experimental Biology* **206**, 1809–1815 (2003).
38. Diuk-Wasser, M. A., Vannier, E. & Krause, P. J. Coinfection by the tick-borne pathogens *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi*: ecological, epidemiological and clinical consequences. *Trends Parasitol* **32**, 30–42 (2016).
39. Belozero, V. N. Diapause and quiescence as two main kinds of dormancy and their significance in life cycles of mites and ticks. (2009).
40. Schwan, T. G. & Piesman, J. Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks. *Emerg Infect Dis* **8**, 115–121 (2002).
41. Sertour, N. *et al.* Infection Kinetics and Tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Mouse After Natural (via Ticks) or Artificial (Needle) Infection Depends on the Bacterial Strain. *Front Microbiol* **9**, 1722 (2018).
42. Cook, M. J. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *International Journal of General Medicine* **8**, 1 (2015).
43. Wilhelmsson, P. *et al.* Prevalence, Diversity, and Load of *Borrelia* species in Ticks That Have Fed on Humans in Regions of Sweden and Åland Islands, Finland with Different Lyme Borreliosis Incidences. *PLoS One* **8**, (2013).
44. Piesman, J. & Eisen, L. Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol* **53**, 323–343 (2008).

45. Lantos, P. M. Chronic Lyme Disease. *Infect Dis Clin North Am* **29**, 325–340 (2015).
46. Wormser, G. P. *et al.* Co-infections in Persons with Early Lyme Disease, New York, USA. *Emerging Infectious Diseases* **25**, 748 (2019).
47. Stanek, G. & Reiter, M. The expanding Lyme Borrelia complex—clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection* **17**, 487–493 (2011).
48. Eldin, C., Jaulhac, B., Mediannikov, O., Arzouni, J.-P. & Raoult, D. Values of diagnostic tests for the various species of spirochetes. *Médecine et Maladies Infectieuses* **49**, 102–111 (2019).
49. Adeolu, M. & Gupta, R. S. 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 Borreliella gen. nov. containing the members of the Lyme disease Borrelia (Borrelia burgdorferi sensu lato complex). *Antonie Van Leeuwenhoek* **105**, 1049–1072 (2014).
50. Gupta, R. S. Distinction between Borrelia and Borreliella is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos' *et al.* 'The genus Borrelia reloaded' (PLoS ONE 13(12): e0208432). *PLOS ONE* **14**, e0221397 (2019).
51. Pritt, B. S. *et al.* Identification of a novel pathogenic Borrelia species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* **16**, 556–564 (2016).
52. Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. & Oliver, J. H. Updates on Borrelia burgdorferi sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* **2**, 123–128 (2011).
53. Rauer, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. *Ger Med Sci* **18**, Doc03 (2020).

54. Hubálek, Z. & Halouzka, J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* **13**, 951–957 (1997).
55. Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L. & Gray, J. 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**, 837–861 (2012).
56. Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H. & Fish, D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol* **11**, 1545–1563 (2011).
57. Barbour, A. G. & Hayes, S. F. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* **50**, 381–400 (1986).
58. Rosa, P. A., Tilly, K. & Stewart, P. E. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 129 (2005).
59. Takayama, K., Rothenberg, R. J. & Barbour, A. G. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **55**, 2311–2313 (1987).
60. Ben-Menachem, G., Kubler-Kielb, J., Coxon, B., Yergey, A. & Schneerson, R. A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7913–7918 (2003).
61. Rudenko, N., Golovchenko, M., Kybicova, K. & Vancova, M. Metamorphoses of Lyme disease spirochetes: phenomenon of *Borrelia* persists. *Parasites Vectors* **12**, 1–10 (2019).
62. Lantos, P. M., Auwaerter, P. G. & Wormser, G. P. A Systematic Review of *Borrelia burgdorferi* Morphologic Variants Does Not Support a Role in Chronic Lyme Disease. *Clin Infect Dis* **58**, 663–671 (2014).
63. Brorson, O. & Brorson, S. H. Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection* **25**, 240–246 (1997).

64. Miklossy, J. *et al.* Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation* **5**, 40 (2008).
65. Fritzsche, M. Chronic Lyme borreliosis at the root of multiple sclerosis--is a cure with antibiotics attainable? *Med. Hypotheses* **64**, 438–448 (2005).
66. Di Domenico, E. G. *et al.* The Emerging Role of Microbial Biofilm in Lyme Neuroborreliosis. *Front Neurol* **9**, (2018).
67. Sapi, E. *et al.* Evidence of In Vivo Existence of *Borrelia* Biofilm in Borrelial Lymphocytomas. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* **6**, 9–24 (2016).
68. Feng, J., Li, T. & Zhang, Y. Biofilm Structures of *Borrelia burgdorferi* Not Only Display More Tolerance to Lyme Antibiotics But Also Cause More Severe Pathology In a Mouse Arthritis Model: Implications for Understanding Persistence, PTLDS and Treatment. *bioRxiv* 440461 (2018) doi:10.1101/440461.
69. 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).
70. Veinović, G., Čakić, S., Mihaljica, D., Sukara, R. & Tomanović, S. Comparison of growth and morphology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in BSK-H and BSK-II media stored for prolonged periods. *APMIS* **128**, 552–557 (2020).
71. Wang, G. *et al.* Variations in Barbour-Stoenner-Kelly Culture Medium Modulate Infectivity and Pathogenicity of *Borrelia burgdorferi* Clinical Isolates. *Infect Immun* **72**, 6702–6706 (2004).
72. Pollack, R. J., Telford, S. R. & Spielman, A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* **31**, 1251–1255 (1993).
73. Coulter, P. *et al.* Two-Year Evaluation of *Borrelia burgdorferi* Culture and Supplemental Tests for Definitive Diagnosis of Lyme Disease. *J Clin Microbiol* **43**, 5080–5084 (2005).

74. Heroldová, M., Němec, M. & Hubálek, Z. Growth parameters of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto at various temperatures. *Zentralbl Bakteriol* **288**, 451–455 (1998).
75. Fraser, C. M. *et al.* Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**, 580 (1997).
76. Schramm, F., Grillon, A., Martino, S. D. & Jaulhac, B. La borréliose de Lyme. *Revue Francophone des Laboratoires* **2013**, 35–49 (2013).
77. Baril, C., Richaud, C., Baranton, G. & Girons, I. S. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Research in Microbiology* **140**, 507–516 (1989).
78. Stewart, P. E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K. & Rosa, P. A. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* **53**, 1–13 (2005).
79. Jewett, M. W. *et al.* Genetic basis for retention of a critical virulence plasmid of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* **66**, 975–990 (2007).
80. Hinnebusch, J. & Barbour, A. G. Linear plasmids of *Borrelia burgdorferi* have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus. *Journal of Bacteriology* **173**, 7233 (1991).
81. Picardeau, M., Lobry, J. R. & Hinnebusch, B. J. Analyzing DNA Strand Compositional Asymmetry to Identify Candidate Replication Origins of *Borrelia burgdorferi* Linear and Circular Plasmids. *Genome Res* **10**, 1594–1604 (2000).
82. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6th Edition | CDC Laboratory Portal | CDC. <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html> (2021).
83. Pal, U. *et al.* TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* **119**, 457–468 (2004).
84. Fikrig, E. & Narasimhan, S. *Borrelia burgdorferi*--traveling incognito? *Microbes Infect.* **8**, 1390–1399 (2006).

85. Schwan, T. G. & Piesman, J. Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme Disease-Associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of Infection in Ticks and Mice. *J Clin Microbiol* **38**, 382–388 (2000).
86. Carroll, J. A., Cordova, R. M. & Garon, C. F. Identification of 11 pH-regulated genes in *Borrelia burgdorferi* localizing to linear plasmids. *Infect Immun* **68**, 6677–6684 (2000).
87. Carroll, J. A., Garon, C. F. & Schwan, T. G. Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **67**, 3181–3187 (1999).
88. Fuchs, H., Wallich, R., Simon, M. M. & Kramer, M. D. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12594–12598 (1994).
89. Coleman, J. L. *et al.* *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect Immun* **63**, 2478–2484 (1995).
90. Coleman, J. L. *et al.* Plasminogen Is Required for Efficient Dissemination of *B. burgdorferi* in Ticks and for Enhancement of Spirochetemia in Mice. *Cell* **89**, 1111–1119 (1997).
91. Zhang, L. *et al.* Molecular Interactions that Enable Movement of the Lyme Disease Agent from the Tick Gut into the Hemolymph. *PLoS Pathog* **7**, e1002079 (2011).
92. Pal, U. *et al.* OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J Clin Invest* **113**, 220–230 (2004).
93. Schwan, T. G. Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Biochemical Society Transactions* **31**, 108–112 (2003).
94. Grimm, D. *et al.* Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3142–3147 (2004).

95. Brouwer, M. A. E., van de Schoor, F. R., Vrijmoeth, H. D., Netea, M. G. & Joosten, L. A. B. A joint effort: The interplay between the innate and the adaptive immune system in Lyme arthritis. *Immunol Rev* **294**, 63–79 (2020).
96. Barthold, S. W., Persing, D. H., Armstrong, A. L. & Peeples, R. A. Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am J Pathol* **139**, 263–273 (1991).
97. Liang, L. *et al.* Rapid clearance of *Borrelia burgdorferi* from the blood circulation. *Parasit Vectors* **13**, (2020).
98. Cadavid, D., O'Neill, T., Schaefer, H. & Pachner, A. R. Localization of *Borrelia Burgdorferi* in the Nervous System and Other Organs in a Nonhuman Primate Model of Lyme Disease. *Lab Invest* **80**, 1043–1054 (2000).
99. Halperin, J. J. Lyme disease and the peripheral nervous system. *Muscle & Nerve* **28**, 133–143 (2003).
100. Lin, Y.-P. *et al.* Strain-specific joint invasion and colonization by Lyme disease spirochetes is promoted by outer surface protein C. *PLoS Pathog* **16**, (2020).
101. Zambrano, M. C., Beklemisheva, A. A., Bryksin, A. V., Newman, S. A. & Cabello, F. C. *Borrelia burgdorferi* binds to, invades, and colonizes native type I collagen lattices. *Infect Immun* **72**, 3138–3146 (2004).
102. Kenedy, M. R. *et al.* Structural Modeling and Physicochemical Characterization Provide Evidence that P66 Forms a  $\beta$ -Barrel in the *Borrelia burgdorferi* Outer Membrane. *J Bacteriol* **196**, 859–872 (2014).
103. Gebbia, J. A., Coleman, J. L. & Benach, J. L. *Borrelia* Spirochetes Upregulate Release and Activation of Matrix Metalloproteinase Gelatinase B (MMP-9) and Collagenase 1 (MMP-1) in Human Cells. *Infect Immun* **69**, 456–462 (2001).

104. Anderson, C. & Brissette, C. A. The Brilliance of Borrelia: Mechanisms of Host Immune Evasion by Lyme Disease-Causing Spirochetes. *Pathogens* **10**, 281 (2021).
105. Tracy, K. E. & Baumgarth, N. Borrelia burgdorferi Manipulates Innate and Adaptive Immunity to Establish Persistence in Rodent Reservoir Hosts. *Front Immunol* **8**, (2017).
106. Locke, J. W. Complement Evasion in Borrelia spirochetes: Mechanisms and Opportunities for Intervention. *Antibiotics (Basel)* **8**, 80 (2019).
107. Garcia, B. L., Zhi, H., Wager, B., Höök, M. & Skare, J. T. Borrelia burgdorferi BBK32 Inhibits the Classical Pathway by Blocking Activation of the C1 Complement Complex. *PLoS Pathog* **12**, e1005404 (2016).
108. Kraiczy, P. *et al.* Immune evasion of Borrelia burgdorferi: mapping of a complement-inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family. *European Journal of Immunology* **33**, 697–707 (2003).
109. Kazimírová, M. & Štibrániová, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 43 (2013).
110. Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E. & de Silva, A. Biochemical and functional characterization of Salp20, an Ixodes scapularis tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol. Biol.* **16**, 469–479 (2007).
111. Klein, M. *et al.* Tick Salivary Sialostatin L Represses the Initiation of Immune Responses by Targeting IRF4-Dependent Transcription in Murine Mast Cells. *J Immunol* **195**, 621–631 (2015).
112. Aslam, B., Nisar, M. A., Khurshid, M. & Farooq Salamat, M. K. Immune escape strategies of Borrelia burgdorferi. *Future Microbiology* **12**, 1219–1237 (2017).
113. Hovius, J. W. R. *et al.* Identification of Salp15 homologues in Ixodes ricinus ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**, 296–303 (2007).

114. Schuijt, T. J. *et al.* The Tick Salivary Protein Salp15 Inhibits the Killing of Serum-Sensitive *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Isolates. *Infect Immun* **76**, 2888–2894 (2008).
115. Hovius, J. W. R. *et al.* Salp15 Binding to DC-SIGN Inhibits Cytokine Expression by Impairing both Nucleosome Remodeling and mRNA Stabilization. *PLOS Pathogens* **4**, e31 (2008).
116. Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J. & Bonnet, S. I. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, (2017).
117. Malawista, S. E. & Chevance, A. de B. Clocking the Lyme Spirochete. *PLOS ONE* **3**, e1633 (2008).
118. Gueye, S. *et al.* La néphrite de Lyme chez l’homme : bases physiopathologiques et spectre lésionnel rénal. *Néphrologie & Thérapeutique* **15**, 127–135 (2019).
119. Gebbia, J. A., Coleman, J. L. & Benach, J. L. Selective induction of matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* via toll-like receptor 2 in monocytes. *J Infect Dis* **189**, 113–119 (2004).
120. Collins, A. M. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol Cell Biol* **94**, 949–954 (2016).
121. Tunev, S. S. *et al.* Lymphadenopathy during lyme borreliosis is caused by spirochete migration-induced specific B cell activation. *PLoS Pathog* **7**, e1002066 (2011).
122. Hastey, C. J., Elsner, R. A., Barthold, S. W. & Baumgarth, N. Delays and diversions mark the development of B cell responses to *Borrelia burgdorferi* infection. *J Immunol* **188**, 5612–5622 (2012).
123. Yegutkin, G. G. *et al.* Disordered lymphoid purine metabolism contributes to the pathogenesis of persistent *Borrelia garinii* infection in mice. *J Immunol* **184**, 5112–5120 (2010).

124. Barthold, S. W. Specificity of infection-induced immunity among *Borrelia burgdorferi* sensu lato species. *Infect Immun* **67**, 36–42 (1999).
125. Barbour, A. G. & Restrepo, B. I. Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerg Infect Dis* **6**, 449–457 (2000).
126. Steere, A. C. *et al.* Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers* **2**, 1–19 (2016).
127. Norris, S. J. vls Antigenic Variation Systems of Lyme Disease *Borrelia*: Eluding Host Immunity through both Random, Segmental Gene Conversion and Framework Heterogeneity. *Microbiol Spectr* **2**, (2014).
128. Hartiala, P. *et al.* Transcriptional response of human dendritic cells to *Borrelia garinii*—defective CD38 and CCR7 expression detected. *Journal of Leukocyte Biology* **82**, 33–43 (2007).
129. Kenedy, M. R., Lenhart, T. R. & Akins, D. R. The Role of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* **66**, 1–19 (2012).
130. Liang, F. T. *et al.* *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infect Immun* **72**, 5759–5767 (2004).
131. Howe, T. R., LaQuier, F. W. & Barbour, A. G. Organization of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. *Infect Immun* **54**, 207–212 (1986).
132. Barbour, A. G. & Garon, C. F. Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science* **237**, 409–411 (1987).
133. Bergström, S., Bundoc, V. G. & Barbour, A. G. Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* **3**, 479–486 (1989).
134. Kenedy, M. R., Lenhart, T. R. & Akins, D. R. The Role of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* **66**, 1–19 (2012).

135. Becker, M. *et al.* Structural investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a bactericidal Fab target. *J Biol Chem* **280**, 17363–17370 (2005).
136. Li, H., Dunn, J. J., Luft, B. J. & Lawson, C. L. Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3584–3589 (1997).
137. Crowley, H. & Huber, B. T. Host-Adapted *Borrelia burgdorferi* in Mice Expresses OspA during Inflammation. *Infect Immun* **71**, 4003–4010 (2003).
138. Crother, T. R. *et al.* Antigenic Composition of *Borrelia burgdorferi* during Infection of SCID Mice. *Infect Immun* **71**, 3419–3428 (2003).
139. 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. *Infect Immun* **71**, 5042–5055 (2003).
140. Kurokawa, C. *et al.* Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nat Rev Microbiol* **18**, 587–600 (2020).
141. Xu, H. *et al.* Role of Acetyl-Phosphate in Activation of the Rrp2-RpoN-RpoS Pathway in *Borrelia burgdorferi*. *PLoS Pathog* **6**, (2010).
142. Kumaran, D. *et al.* Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *EMBO J* **20**, 971–978 (2001).
143. Gilbert, M. A., Morton, E. A., Bundle, S. F. & Samuels, D. S. Artificial regulation of ospC expression in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* **63**, 1259–1273 (2007).
144. Ramamoorthi, N. *et al.* The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* **436**, 573–577 (2005).
145. Fung, B. P., McHugh, G. L., Leong, J. M. & Steere, A. C. Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the

- immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect Immun* **62**, 3213–3221 (1994).
146. Tilly, K. *et al.* Borrelia burgdorferi OspC Protein Required Exclusively in a Crucial Early Stage of Mammalian Infection. *Infect Immun* **74**, 3554–3564 (2006).
147. Earnhart, C. G. *et al.* Identification of residues within ligand-binding domain 1 (LBD1) of the Borrelia burgdorferi OspC protein required for function in the mammalian environment. *Molecular Microbiology* **76**, 393–408 (2010).
148. Liang, F. T., Nelson, F. K. & Fikrig, E. Molecular Adaptation of Borrelia burgdorferi in the Murine Host. *J Exp Med* **196**, 275–280 (2002).
149. Wang, I. N. *et al.* Genetic diversity of ospC in a local population of Borrelia burgdorferi sensu stricto. *Genetics* **151**, 15–30 (1999).
150. Wilske, B. *et al.* Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for Borrelia vaccine development. *Infection* **24**, 208–212 (1996).
151. Earnhart, C. G., Buckles, E. L., Dumler, J. S. & Marconi, R. T. Demonstration of OspC Type Diversity in Invasive Human Lyme Disease Isolates and Identification of Previously Uncharacterized Epitopes That Define the Specificity of the OspC Murine Antibody Response. *Infect Immun* **73**, 7869–7877 (2005).
152. Seinost, G. *et al.* Four Clones of Borrelia burgdorferi Sensu Stricto Cause Invasive Infection in Humans. *Infect Immun* **67**, 3518–3524 (1999).
153. Barbour, A. G. & Travinsky, B. Evolution and Distribution of the ospC Gene, a Transferable Serotype Determinant of Borrelia burgdorferi. *mBio* **1**, e00153-10 (2010).
154. Guo, B. P., Brown, E. L., Dorward, D. W., Rosenberg, L. C. & Höök, M. Decorin-binding adhesins from Borrelia burgdorferi. *Mol Microbiol* **30**, 711–723 (1998).
155. Ojaimi, C. *et al.* Profiling of temperature-induced changes in Borrelia burgdorferi gene expression by using whole genome arrays. *Infect Immun* **71**, 1689–1705 (2003).

156. Zhang, J. R., Hardham, J. M., Barbour, A. G. & Norris, S. J. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell* **89**, 275–285 (1997).
157. Suard, A., Péter, O. & Zwahlen, A. La borréliose de Lyme en Europe. (2008).
158. Norris, S. J. The vls antigenic variation systems of Lyme disease *Borrelia*: eluding host immunity through both random, segmental gene conversion and framework heterogeneity. *Microbiol Spectr* **2**, (2014).
159. Zhang, J. R. & Norris, S. J. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of vlsE in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **66**, 3689–3697 (1998).
160. Purser, J. E. & Norris, S. J. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13865–13870 (2000).
161. Coutte, L., Botkin, D. J., Gao, L. & Norris, S. J. Detailed Analysis of Sequence Changes Occurring during vlsE Antigenic Variation in the Mouse Model of *Borrelia burgdorferi* Infection. *PLOS Pathogens* **5**, e1000293 (2009).
162. Chaconas, G., Castellanos, M. & Verhey, T. B. Changing of the guard: How the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *J Biol Chem* **295**, 301–313 (2020).
163. Stone, B. L. & Brissette, C. A. Host Immune Evasion by Lyme and Relapsing Fever *Borreliae*: Findings to Lead Future Studies for *Borrelia miyamotoi*. *Front Immunol* **8**, 12 (2017).
164. Herrmann, J. L. Animal models and Lyme disease. *Clinical Microbiology and Infection* **1**, 72–73 (1995).
165. Roberts, E. D. *et al.* Pathogenesis of Lyme Neuroborreliosis in the Rhesus Monkey: The Early Disseminated and Chronic Phases of Disease in the Peripheral Nervous System. *J Infect Dis* **178**, 722–732 (1998).

166. Roberts, E. D. *et al.* Chronic lyme disease in the rhesus monkey. *Lab Invest* **72**, 146–160 (1995).
167. Pachner, A. R. The rhesus model of Lyme neuroborreliosis. *Immunological Reviews* **183**, 186–204 (2001).
168. Embers, M. E. *et al.* Persistence of *Borrelia burgdorferi* in Rhesus Macaques following Antibiotic Treatment of Disseminated Infection. *PLoS One* **7**, (2012).
169. Philipp, M. T. *et al.* Early and early disseminated phases of Lyme disease in the rhesus monkey: a model for infection in humans. *Infect Immun* **61**, 3047–3059 (1993).
170. Appel, M. J. G. *et al.* Experimental Lyme Disease in Dogs Produces Arthritis and Persistent Infection. *J Infect Dis* **167**, 651–654 (1993).
171. Mather, T. N., Fish, D. & Coughlin, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **205**, 186–188 (1994).
172. Foley, D. M. *et al.* 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**, 965–975 (1995).
173. Philipp, M. T. & Johnson, B. J. Animal models of Lyme disease: pathogenesis and immunoprophylaxis. *Trends Microbiol* **2**, 431–437 (1994).
174. Akins, D. R., Bourell, K. W., Caimano, M. J., Norgard, M. V. & Radolf, J. D. A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state. *J Clin Invest* **101**, 2240–2250 (1998).
175. Munson, E., Nardelli, D. T., Du Chateau, B. K., Callister, S. M. & Schell, R. F. Hamster and Murine Models of Severe Destructive Lyme Arthritis. *Clinical and Developmental Immunology* vol. 2012 e504215 <https://www.hindawi.com/journals/jir/2012/504215/> (2012).

176. Sonnesyn, S. W., Manivel, J. C., Johnson, R. C. & Goodman, J. L. A guinea pig model for Lyme disease. *Infect Immun* **61**, 4777–4784 (1993).
177. Preac Mursic, V. *et al.* Persistence of *Borrelia burgdorferi* and histopathological alterations in experimentally infected animals. A comparison with histopathological findings in human Lyme disease. *Infection* **18**, 332–341 (1990).
178. Levine, J. F., Wilson, M. L. & Spielman, A. Mice as Reservoirs of the Lyme Disease Spirochete. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34**, 355–360 (1985).
179. Wooten, R. M. & Weis, J. J. Host–pathogen interactions promoting inflammatory Lyme arthritis: use of mouse models for dissection of disease processes. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 274–279 (2001).
180. Wang, G. *et al.* Disease Severity in a Murine Model of Lyme Borreliosis Is Associated with the Genotype of the Infecting *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto Strain. *The Journal of Infectious Diseases* **186**, 782–791 (2002).
181. The severe combined immunodeficiency (scid) mouse. A laboratory model for the analysis of Lyme arthritis and carditis. *J Exp Med* **170**, 1427–1432 (1989).
182. Ristow, L. C. *et al.* Integrin binding by *Borrelia burgdorferi* P66 facilitates dissemination but is not required for infectivity. *Cell Microbiol* **17**, 1021–1036 (2015).
183. Barthold, S. W., Beck, D. S., Hansen, G. M., Terwilliger, G. A. & Moody, K. D. Lyme Borreliosis in Selected Strains and Ages of Laboratory Mice. *The Journal of Infectious Diseases* **162**, 133–138 (1990).
184. HCSP. *La borrélieuse de Lyme*. 86 [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140328\\_borrelioselyme.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140328_borrelioselyme.pdf) (2014).
185. Hinckley, A. F. *et al.* Lyme disease testing by large commercial laboratories in the United States. *Clin Infect Dis* **59**, 676–681 (2014).

186. CDC. Recent Lyme disease surveillance data | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/recent-surveillance-data.html> (2021).
187. ECDC comment: European Commission updates communicable disease surveillance list - Lyme neuroborreliosis now under EU/EEA surveillance. *European Centre for Disease Prevention and Control* <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-comment-european-commission-updates-communicable-disease-surveillance-list-lyme> (2018).
188. Petrulionienė, A. *et al.* Epidemiology of Lyme Disease in a Highly Endemic European Zone. *Medicina (Kaunas)* **56**, (2020).
189. Figoni, J. *et al.* Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French Scientific Societies (I): prevention, epidemiology, diagnosis. *Médecine et Maladies Infectieuses* **49**, 318–334 (2019).
190. réseau Sentinelles, INSERM/Sorbonne Université. Réseau Sentinelles, La maladie de Lyme.
191. Dumin, I. & Severnini, E. “Ticking Bomb”: The Impact of Climate Change on the Incidence of Lyme Disease. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **2018**, e5719081 (2018).
192. Mac, S., da Silva, S. R. & Sander, B. The economic burden of Lyme disease and the cost-effectiveness of Lyme disease interventions: A scoping review. *PLoS One* **14**, (2019).
193. van den Wijngaard, Cees. C. *et al.* The cost of Lyme borreliosis. *European Journal of Public Health* **27**, 538–547 (2017).
194. Zhang, X. *et al.* Economic Impact of Lyme Disease. *Emerg Infect Dis* **12**, 653–660 (2006).
195. Adrion, E. R., Aucott, J., Lemke, K. W. & Weiner, J. P. Health care costs, utilization and patterns of care following Lyme disease. *PLoS One* **10**, e0116767 (2015).

196. RG 19. Tableau - Tableaux des maladies professionnelles - INRS.  
<https://www.inrs.fr/publications/bdd/mp/tableau.html?refINRS=RG%2019>.
197. Stanek, G. *et al.* Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* **17**, 69–79 (2011).
198. Steere, A. C. *et al.* Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16090 (2016).
199. Müllegger, R. R. & Glatz, M. Skin Manifestations of Lyme Borreliosis. *Am J Clin Dermatol* **9**, 355–368 (2008).
200. Sanchez, J. L. Clinical Manifestations and Treatment of Lyme Disease. *Clinics in Laboratory Medicine* **35**, 765–778 (2015).
201. CDC. Signs and symptoms of Lyme disease | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* [https://www.cdc.gov/lyme/signs\\_symptoms/index.html](https://www.cdc.gov/lyme/signs_symptoms/index.html) (2021).
202. Oksi, J. *et al.* Early dissemination of *Borrelia burgdorferi* without generalized symptoms in patients with erythema migrans. *APMIS* **109**, 581–588 (2001).
203. Aspects dermatologiques au cours de la maladie de Lyme. *Médecine et Maladies Infectieuses* **37**, 540–547 (2007).
204. Lipsker, D., Antoni-Bach, N., Hansmann, Y. & Jaulhac, B. Long-term prognosis of patients treated for erythema migrans in France. *Br. J. Dermatol.* **146**, 872–876 (2002).
205. Steere, A. C. *et al.* The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* **99**, 76–82 (1983).
206. Barton-Forbes, M. *et al.* Tick bites in the Lyme light. *Paediatr Child Health* **20**, 237–238 (2015).
207. Strle, F. & Stanek, G. Clinical Manifestations and Diagnosis of Lyme Borreliosis. **37**, 51–110 (2009).
208. Nadelman, R. B. & Wormser, G. P. Erythema migrans and early Lyme disease. *Am J Med* **98**, 15S-23S; discussion 23S-24S (1995).

209. Palmen, C., Jamblin, P., Florkin, B. & Hoyoux, C. Le lymphocytome borrélien du lobe de l'oreille. *Archives de Pédiatrie* **17**, 1159–1161 (2010).
210. Nau, R., Christen, H.-J. & Eiffert, H. Lyme Disease—Current State of Knowledge. *Dtsch Arztebl Int* **106**, 72–82 (2009).
211. Jaulhac, B. *et al.* Direct Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Species in Synovial Samples from Patients with Lyme Arthritis. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1895–1900 (2000).
212. S, B. & T, N. Psychosis in *Borrelia burgdorferi* infection - part I: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment of neuroborreliosis. *Psychiatr Pol* **53**, 629–640 (2019).
213. Rojko, T. *et al.* *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with peripheral facial palsy. *Ticks and Tick-borne Diseases* **10**, 398–406 (2019).
214. Lorentzen, Å. R. *et al.* Lyme neuroborreliosis: do we treat according to guidelines? *J Neurol* **264**, 1506–1510 (2017).
215. Zajkowska, J., Czupryna, P., Pancewicz, S. A., Kondrusik, M. & Moniuszko, A. Acrodermatitis chronica atrophicans. *The Lancet Infectious Diseases* **11**, 800 (2011).
216. Carriveau, A., Poole, H. & Thomas, A. Lyme Disease. *Nursing Clinics of North America* **54**, 261–275 (2019).
217. Kowalski, T. J., Tata, S., Berth, W., Mathiason, M. A. & Agger, W. A. Antibiotic Treatment Duration and Long-Term Outcomes of Patients with Early Lyme Disease from a Lyme Disease–Hyperendemic Area. *Clin Infect Dis* **50**, 512–520 (2010).
218. Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J. & Strle, F. Lyme borreliosis. *The Lancet* **379**, 461–473 (2012).
219. Recommandations Lyme (maladie de). VIDAL  
<https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/lyme-maladie-de-4063.html>.

220. Haute Autorité de Santé. *Recommandation de bonne pratique – Borréliose de Lyme et autres maladies vectorielles à tique.* 1–9 [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-06/fiche\\_rbp\\_2\\_borreliose\\_de\\_lyme-v1-180618.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-06/fiche_rbp_2_borreliose_de_lyme-v1-180618.pdf) (2018).
221. Baker, P. J. A Review of Antibiotic-Tolerant Persisters and Their Relevance to Posttreatment Lyme Disease Symptoms. *The American Journal of Medicine* **133**, 429–431 (2020).
222. Sharma, B., Brown, A. V., Matluck, N. E., Hu, L. T. & Lewis, K. *Borrelia burgdorferi*, the Causative Agent of Lyme Disease, Forms Drug-Tolerant Persister Cells. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 4616–4624 (2015).
223. Caskey, J. R. & Embers, M. E. Persister Development by *Borrelia burgdorferi* Populations In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 6288–6295 (2015).
224. Šmit, R. & Postma, M. J. Lyme borreliosis: reviewing potential vaccines, clinical aspects and health economics. *Expert Review of Vaccines* **14**, 1549–1561 (2015).
225. Jefferson, T. Pediatricians Alerted to Five New Vaccines. *JAMA* **281**, 1973–1975 (1999).
226. Krupka, I. & Straubinger, R. K. Lyme Borreliosis in Dogs and Cats: Background, Diagnosis, Treatment and Prevention of Infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **40**, 1103–1119 (2010).
227. ANSES. *Efficacité des biocides répulsifs contre les tiques et aux modalités de leur utilisation.* 16 [http://www.chru-strasbourg.fr/sites/default/files/documents/ANSES\\_Repulsifs\\_tiques\\_BIOC2018SA0105.pdf](http://www.chru-strasbourg.fr/sites/default/files/documents/ANSES_Repulsifs_tiques_BIOC2018SA0105.pdf) (2018).
228. Biesiada, G., Czepiel, J., Leśniak, M. R., Garlicki, A. & Mach, T. Lyme disease: review. *Arch Med Sci* **8**, 978–982 (2012).

229. Eldin, C. *et al.* Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Med Mal Infect* **49**, 121–132 (2019).
230. Arnaud, D. C. EVALUATION DES PROCEDURES DE DEPISTAGE. 11.
231. Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J. & Strle, F. Lyme borreliosis. *The Lancet* **379**, 461–473 (2012).
232. Olesen, K., Hejlesen, O., Dessau, R., Beltoft, I. & Trangeled, M. Diagnosing Lyme disease - Tailoring patient specific Bayesian networks for temporal reasoning. in *Probabilistic Graphical Models* (2006).
233. Molins, C. R., Delorey, M. J., Sexton, C. & Schriefer, M. E. Lyme Borreliosis Serology: Performance of Several Commonly Used Laboratory Diagnostic Tests and a Large Resource Panel of Well-Characterized Patient Samples. *Journal of Clinical Microbiology* **54**, 2726–2734 (2016).
234. Aguero-Rosenfeld, M. E. Lyme Disease: Laboratory Issues. *Infectious Disease Clinics of North America* **22**, 301–313 (2008).
235. CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BORRELIA. *Rapport annuel d'activité - Année d'exercice 2012- CNR des Borrelia*.
236. 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).
237. François-Burg, E., Jaulhac, B. & Roure-Sobas, C. *Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale - Sérologie de la borréliose de Lyme*. 13 (2019).
238. Aguero-Rosenfeld, M. E. & Wormser, G. P. Lyme disease: diagnostic issues and controversies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **15**, 1–4 (2015).
239. Haute Autorité de Santé. *Performances des tests diagnostiques actuellement recommandés*. 1 [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-06/fs-rbp\\_performances\\_des\\_tests\\_diagnostiques\\_recommandes-190618-v5.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-06/fs-rbp_performances_des_tests_diagnostiques_recommandes-190618-v5.pdf) (2018).

240. Eldin, C., Jaulhac, B., Mediannikov, O., Arzouni, J.-P. & Raoult, D. Values of diagnostic tests for the various species of spirochetes. *Med Mal Infect* **49**, 102–111 (2019).
241. Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I. & Wormser, G. P. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev* **18**, 484–509 (2005).
242. Lenčáková, D., Štefančíková, A., Ivanová, R. & Petko, B. Immune complexes in early Lyme disease. *Can. J. Microbiol.* **53**, 1375–1377 (2007).
243. Schutzer, S. E., Coyle, P. K., Belman, A. L., Golightly, M. G. & Drulle, J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *The Lancet* **335**, 312–315 (1990).
244. Jares, T. M., Mathiason, M. A. & Kowalski, T. J. Functional outcomes in patients with *Borrelia burgdorferi* reinfection. *Ticks and Tick-borne Diseases* **5**, 58–62 (2014).
245. Kalish, R. A. *et al.* Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10–20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis* **33**, 780–785 (2001).
246. Raffetin, A. *et al.* Unconventional diagnostic tests for Lyme borreliosis: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* (2019) doi:10.1016/j.cmi.2019.06.033.
247. Legler, D. F. *et al.* B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* **187**, 655–660 (1998).
248. Rupprecht, T. A. *et al.* Diagnostic value of cerebrospinal fluid CXCL13 for acute Lyme neuroborreliosis. A systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection* **24**, 1234–1240 (2018).
249. Rupprecht, T. A. *et al.* *Borrelia garinii* Induces CXCL13 Production in Human Monocytes through Toll-Like Receptor 2. *Infect Immun* **75**, 4351–4356 (2007).

250. Markowicz, M. *et al.* CXCL13 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other neurological disorders determined by Luminex and ELISA. *Ticks and Tick-borne Diseases* **9**, 1137–1142 (2018).
251. Aucott, J. N. *et al.* CCL19 as a Chemokine Risk Factor for Posttreatment Lyme Disease Syndrome: a Prospective Clinical Cohort Study. *Clin Vaccine Immunol* **23**, 757–766 (2016).
252. Crowley, J. T. *et al.* A Highly Expressed Human Protein, Apolipoprotein B-100, Serves as an Autoantigen in a Subgroup of Patients With Lyme Disease. *J Infect Dis* **212**, 1841–1850 (2015).
253. von Baehr, V., Doebis, C., Volk, H.-D. & von Baehr, R. The Lymphocyte Transformation Test for *Borrelia* Detects Active Lyme Borreliosis and Verifies Effective Antibiotic Treatment. *Open Neurol J* **6**, 104–112 (2012).
254. Zoschke, D. C., Skemp, A. A. & Defosse, D. L. Lymphoproliferative Responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme Disease. *Ann Intern Med* **114**, 285–289 (1991).
255. Hofmann, H. *et al.* Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger Med Sci* **15**, Doc14 (2017).
256. Callister, S. M. *et al.* Detection of IFN- $\gamma$  Secretion by T Cells Collected Before and After Successful Treatment of Early Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases* **62**, 1235–1241 (2016).
257. Nordberg, M. *et al.* Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis? *Cells* **1**, 153–167 (2012).
258. Jin, C., Roen, D. R., Lehmann, P. V. & Kellermann, G. H. An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells* **2**, 607–620 (2013).

259. Stricker, R. B. & Winger, E. E. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunology Letters* **76**, 43–48 (2001).
260. Marques, A. *et al.* Xenodiagnosis to Detect *Borrelia burgdorferi* Infection: A First-in-Human Study. *Clinical Infectious Diseases* **58**, 937–945 (2014).
261. Schutzer, S. E. *et al.* Direct Diagnostic Tests for Lyme Disease. *Clin Infect Dis* **68**, 1052–1057 (2018).
262. Schutzer, S. E. *et al.* Direct Diagnostic Tests for Lyme Disease. *Clin Infect Dis* **68**, 1052–1057 (2018).
263. Schwartz, I. *et al.* Polymerase chain reaction amplification of culture supernatants for rapid detection of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **12**, 879–882 (1993).
264. Liveris, D. *et al.* Improving the Yield of Blood Cultures from Patients with Early Lyme Disease ▽. *J Clin Microbiol* **49**, 2166–2168 (2011).
265. Wormser, G. P. *et al.* Yield of large-volume blood cultures in patients with early Lyme disease. *J Infect Dis* **184**, 1070–1072 (2001).
266. Borchers, A. T., Keen, C. L., Huntley, A. C. & Gershwin, M. E. Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity* **57**, 82–115 (2015).
267. Sapi, E. *et al.* Improved Culture Conditions for the Growth and Detection of *Borrelia* from Human Serum. *Int J Med Sci* **10**, 362–376 (2013).
268. Schwartz, I. *et al.* Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions. *J Clin Microbiol* **30**, 3082–3088 (1992).
269. Karlsson, M., Hovind-Hougen, K., Svenungsson, B. & Stiernstedt, G. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* **28**, 473–479 (1990).

270. Rosa, P. A. & Schwan, T. G. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **160**, 1018–1029 (1989).
271. Schmidt, B. L. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev* **10**, 185–201 (1997).
272. Dunaj, J., Moniuszko, A., Zajkowska, J. & Pancewicz, S. The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. *Prezgl epidemio* **67**, 35–39 (2013).
273. Melchers, W. *et al.* Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease. *J Clin Microbiol* **29**, 2401–2406 (1991).
274. Schwaiger, M., Péter, O. & Cassinotti, P. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) infections using a real-time PCR assay. *Clin Microbiol Infect* **7**, 461–469 (2001).
275. Brettschneider, S., Bruckbauer, H., Klugbauer, N. & Hofmann, H. Diagnostic Value of PCR for Detection of *Borrelia burgdorferi* in Skin Biopsy and Urine Samples from Patients with Skin Borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2658–2665 (1998).
276. Picken, M. M. *et al.* A two year prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for the detection and diagnosis of Lyme borreliosis. *Mol Pathol* **50**, 186–193 (1997).
277. Liveris, D. *et al.* Quantitative Detection of *Borrelia burgdorferi* in 2-Millimeter Skin Samples of Erythema Migrans Lesions: Correlation of Results with Clinical and Laboratory Findings. *J Clin Microbiol* **40**, 1249–1253 (2002).
278. Moter, S. E., Hofmann, H., Wallich, R., Simon, M. M. & Kramer, M. D. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA-specific PCR. *J Clin Microbiol* **32**, 2980–2988 (1994).

279. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 1014–1026 (2012).
280. Al-Soud, W. A. & Rådström, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* **39**, 485–493 (2001).
281. Chan, K., Marras, S. A. & Parveen, N. Sensitive multiplex PCR assay to differentiate Lyme spirochetes and emerging pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*. *BMC Microbiol* **13**, 295 (2013).
282. Nunes, M., Parreira, R., Carreira, T., Inácio, J. & Vieira, M. L. Development and evaluation of a two-step multiplex TaqMan real-time PCR assay for detection/quantification of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Ticks and Tick-borne Diseases* **9**, 176–182 (2018).
283. Arvikar, S. L. & Steere, A. C. 5. Diagnosis and Treatment of Lyme Arthritis. *Infect Dis Clin North Am* **29**, 269–280 (2015).
284. Dorward, D. W., Schwan, T. G. & Garon, C. F. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *J Clin Microbiol* **29**, 1162–1170 (1991).
285. Coyle, P. K. *et al.* Detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in cerebrospinal fluid. *Neurology* **43**, 1093–1098 (1993).
286. Harris, N. S. & Stephens, B. G. Detection of *Borrelia burgdorferi* Antigen in Urine from Patients with Lyme Borreliosis. *Journal of Spirochetal and Tick-Borne Disease* **2**, (1995).
287. Klempner, M. S. *et al.* Intralaboratory reliability of serologic and urine testing for Lyme disease. *Am J Med* **110**, 217–219 (2001).
288. Cheung, C. S. F. *et al.* Quantification of *Borrelia burgdorferi* membrane proteins in human serum is a new concept for detection of bacterial infection. *Anal Chem* **87**, 11383–11388 (2015).

289. Magni, R. *et al.* Application of Nanotrap technology for high sensitivity measurement of urinary outer surface protein A carboxyl-terminus domain in early stage Lyme borreliosis. *J Transl Med* **13**, 346 (2015).
290. Nanotrap® Lyme Antigen test update. *Innatoss* <https://www.innatoss.com/en/nanotrap-lyme-antigen-test-update/> (2018).
291. Schnell, G. *et al.* Discovery and Targeted Proteomics on Cutaneous Biopsies Infected by *Borrelia* to Investigate Lyme Disease. *Mol Cell Proteomics* **14**, 1254–1264 (2015).
292. Lefeuvre, B. *et al.* Effects of topical corticosteroids and lidocaine on *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mouse skin: potential impact to human clinical trials. *Sci Rep* **10**, (2020).
293. Elbir, H. *et al.* Multiplex Real-Time PCR Diagnostic of Relapsing Fevers in Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **7**, e2042 (2013).
294. Grange, P. A. *et al.* Evaluation of a PCR Test for Detection of *Treponema pallidum* in Swabs and Blood. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 546–552 (2012).
295. Toyokawa, T., Ohnishi, M. & Koizumi, N. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **9**, 111–121 (2011).
296. Chaves, S. J., Schegg, K., Kozel, T. R. & Aucoin, D. P. In Vivo Microbial Antigen Discovery (InMAD) to identify diagnostic proteins and polysaccharides that are circulating during microbial infections. *Methods Mol. Biol.* **1061**, 155–165 (2013).
297. Nuti, D. E. *et al.* Identification of Circulating Bacterial Antigens by In Vivo Microbial Antigen Discovery. *mBio* **2**, e00136-11.
298. Eyles, J. E. *et al.* Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray. *Proteomics* **7**, 2172–2183 (2007).
299. Pappin, D. J. C., Hojrup, P. & Bleasby, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* **3**, 327–332 (1993).

300. Plomion, C. *et al.* Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* **6**, 6509–6527 (2006).
301. Damodaran, S., Wood, T. D., Nagarajan, P. & Rabin, R. A. Evaluating Peptide Mass Fingerprinting-based Protein Identification. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **5**, 152–157 (2007).
302. Baldwin, M. A. Protein Identification by Mass Spectrometry: Issues to be Considered \*. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 1–9 (2004).
303. Biron, D. G. *et al.* The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. *PROTEOMICS* **6**, 5577–5596 (2006).
304. Barrett, J., Brophy, P. M. & Hamilton, J. V. Analysing proteomic data. *International Journal for Parasitology* **35**, 543–553 (2005).
305. Protein identification-Peptide mass fingerprinting (PMF) – Creative Proteomics Blog. <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/protein-identification-peptide-mass-fingerprinting-pmf/>.
306. Sertour, N. *et al.* Infection Kinetics and Tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Mouse After Natural (via Ticks) or Artificial (Needle) Infection Depends on the Bacterial Strain. *Front Microbiol* **9**, 1722 (2018).
307. Steere, A. C. Lyme Disease. *New England Journal of Medicine* **345**, 115–125 (2001).
308. Armstrong, A. L., Barthold, S. W., Persing, D. H. & Beck, D. S. Carditis in Lyme Disease Susceptible and Resistant Strains of Laboratory Mice Infected with *Borrelia Burgdorferi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **47**, 249–258 (1992).
309. Schwan, T. G., Burgdorfer, W. & Garon, C. F. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infect Immun* **56**, 1831–1836 (1988).

310. Barbour, A. G. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol* **26**, 475–478 (1988).
311. Masuzawa, T., Kurita, T., Kawabata, H. & Yanagihara, Y. Relationship between infectivity and OspC expression in Lyme disease *Borrelia*. *FEMS Microbiology Letters* **123**, 319–324 (1994).
312. Bunikis, I., Kutschan-Bunikis, S., Bonde, M. & Bergström, S. Multiplex PCR as a tool for validating plasmid content of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Microbiological Methods* **86**, 243–247 (2011).
313. 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**, (2015).
314. Barthold, S. W., de Souza, M. S., Janotka, J. L., Smith, A. L. & Persing, D. H. Chronic Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *Am J Pathol* **143**, 959–971 (1993).
315. Janvier Labs. *Spécifications détaillées : Souris C3H*.
316. Ford, L. & Tufts, D. M. Lyme Neuroborreliosis: Mechanisms of *B. burgdorferi* Infection of the Nervous System. *Brain Sci* **11**, 789 (2021).
317. Schaible, U. E. *et al.* Lyme borreliosis in the severe combined immunodeficiency (scid) mouse manifests predominantly in the joints, heart, and liver. *Am J Pathol* **137**, 811–820 (1990).
318. Casselli, T. *et al.* A murine model of lyme disease demonstrates that *Borrelia burgdorferi* colonizes the dura mater and induces inflammation in the central nervous system. *PLOS Pathogens* **17**, e1009256 (2021).
319. Bockenstedt, L. K., Wooten, R. M. & Baumgarth, N. Immune Response to *Borrelia*: Lessons from Lyme Disease Spirochetes. *Curr Issues Mol Biol* **42**, 145–190 (2021).

320. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856–2860 (2006).
321. Qiu, W.-G. & Martin, C. L. Evolutionary Genomics of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Findings, Hypotheses, and the Rise of Hybrids. *Infect Genet Evol* **27**, 576–593 (2014).
322. Casjens, S. *et al.* A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* **35**, 490–516 (2000).
323. Norris, S. J., Carter, C. J., Howell, J. K. & Barbour, A. G. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* **60**, 4662–4672 (1992).
324. Norris, S. J., Howell, J. K., Garza, S. A., Ferdows, M. S. & Barbour, A. G. High- and low-infectivity phenotypes of clonal populations of in vitro-cultured *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **63**, 2206–2212 (1995).
325. Nuti, D. E. *et al.* Identification of Circulating Bacterial Antigens by In Vivo Microbial Antigen Discovery. *mBio* **2**, e00136-11 (2011).
326. Liang, L. *et al.* Rapid clearance of *Borrelia burgdorferi* from the blood circulation. *Parasites & Vectors* **13**, 191 (2020).
327. Homer, M. J. *et al.* Identification and Characterization of Putative Secreted Antigens from *Babesia microti*. *J Clin Microbiol* **41**, 723–729 (2003).
328. Gauthier, Y. P. *et al.* Study on the pathophysiology of experimental *Burkholderia pseudomallei* infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **30**, 53–63 (2001).
329. Bandouchova, H. *et al.* Tularemia induces different biochemical responses in BALB/c mice and common voles. *BMC Infectious Diseases* **9**, 101 (2009).

330. Pflughoeft, K. J. *et al.* Multi-platform Approach for Microbial Biomarker Identification Using *Borrelia burgdorferi* as a Model. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, (2019).
331. Schwan, T. G. & Piesman, J. Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme Disease-Associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of Infection in Ticks and Mice. *J Clin Microbiol* **38**, 382–388 (2000).
332. Hübner, A. *et al.* Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN-RpoS regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12724–12729 (2001).
333. Kern, A. *et al.* Tick Saliva Represses Innate Immunity and Cutaneous Inflammation in a Murine Model of Lyme Disease. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 1343–1350 (2011).
334. Grillon, A. *et al.* Identification of *Borrelia* protein candidates in mouse skin for potential diagnosis of disseminated Lyme borreliosis. *Scientific Reports* **7**, 16719 (2017).
335. Talagrand-Reboul, E. *et al.* Proteomic as an Exploratory Approach to Develop Vaccines Against Tick-Borne Diseases Using Lyme Borreliosis as a Test Case. *Vaccines* **8**, 463 (2020).
336. Lagal, V., Postic, D., Ruzic-Sabljić, E. & Baranton, G. Genetic Diversity among *Borrelia* Strains Determined by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the ospC Gene and Its Association with Invasiveness. *J Clin Microbiol* **41**, 5059–5065 (2003).
337. Zumstein, G. *et al.* Genetic polymorphism of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol* **181**, 57–70 (1992).
338. Earnhart, C. G., Buckles, E. L., Dumler, J. S. & Marconi, R. T. Demonstration of OspC Type Diversity in Invasive Human Lyme Disease Isolates and Identification of Previously Uncharacterized Epitopes That Define the Specificity of the OspC Murine Antibody Response. *Infect Immun* **73**, 7869–7877 (2005).

339. Xiang, X. *et al.* Investigation of ospC Expression Variation among *Borrelia burgdorferi* Strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, (2017).
340. Izac, J. R. *et al.* Analysis of the antigenic determinants of the OspC protein of the Lyme disease spirochetes: Evidence that the C10 motif is not immunodominant or required to elicit bactericidal antibody responses. *Vaccine* **37**, 2401–2407 (2019).
341. Grassi, J. *et al.* Des dosages immunométriques pour les haptènes. *Immunoanal. biol. spec* **11**, 240–248 (1996).
342. Mathiesen, M. J. *et al.* Peptide-Based OspC Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *J Clin Microbiol* **36**, 3474–3479 (1998).
343. Arnaboldi, P. M. *et al.* Outer Surface Protein C Peptide Derived from *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto as a Target for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. *Clin Vaccine Immunol* **20**, 474–481 (2013).
344. Davis, I. R. C. *et al.* Performance of a Modified Two-Tiered Testing Enzyme Immunoassay Algorithm for Serologic Diagnosis of Lyme Disease in Nova Scotia. *Journal of Clinical Microbiology* **58**, e01841-19.
345. Earnhart, C. G. *et al.* Assessment of the potential contribution of the highly conserved C-terminal motif (C10) of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C (OspC) in transmission and infectivity. *Pathog Dis* **70**, 176–184 (2014).
346. Mathiesen, M. J. *et al.* The dominant epitope of *Borrelia garinii* outer surface protein C recognized by sera from patients with neuroborreliosis has a surface-exposed conserved structural motif. *Infect Immun* **66**, 4073–4079 (1998).
347. Grillon, A. *et al.* Identification of *Borrelia* protein candidates in mouse skin for potential diagnosis of disseminated Lyme borreliosis. *Sci Rep* **7**, 16719 (2017).

348. Barthold, S. W., Persing, D. H., Armstrong, A. L. & Peeples, R. A. Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am J Pathol* **139**, 263–273 (1991).
349. Cohen, L., Keegan, A. & Walt, D. R. Single-Molecule Arrays for Ultrasensitive Detection of Blood-Based Biomarkers for Immunotherapy. *Methods Mol Biol* **2055**, 399–412 (2020).
350. Ultra-Sensitive Biomarker Detection | Quanterix. <https://www.quanterix.com/>.
351. Indest, K. J. *et al.* Analysis of *Borrelia burgdorferi* vlsE gene expression and recombination in the tick vector. *Infect Immun* **69**, 7083–7090 (2001).
352. Liang, F. T. & Philipp, M. T. Epitope Mapping of the Immunodominant Invariable Region of *Borrelia burgdorferi* VlsE in Three Host Species. *Infection and Immunity* **68**, 2349–2352 (2000).
353. Waddell, L. A. *et al.* The Accuracy of Diagnostic Tests for Lyme Disease in Humans, A Systematic Review and Meta-Analysis of North American Research. *PLoS One* **11**, e0168613 (2016).
354. Eicken, C. *et al.* Crystal Structure of Lyme Disease Variable Surface Antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*\*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21691–21696 (2002).
355. Doria, G., Agarossi, G. & Biozzi, G. In vitro immune response of spleen cells from mice genetically selected for high or low antibody production. *Immunology* **34**, 999–1005 (1978).
356. Embers, M. E., Jacobs, M. B., Johnson, B. J. B. & Philipp, M. T. Dominant Epitopes of the C6 Diagnostic Peptide of *Borrelia burgdorferi* Are Largely Inaccessible to Antibody on the Parent VlsE Molecule. *Clin Vaccine Immunol* **14**, 931–936 (2007).

357. Kalish, R. A., Leong, J. M. & Steere, A. C. Association of treatment-resistant chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and antibody reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **61**, 2774–2779 (1993).
358. Krupka, M. *et al.* Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **151**, 175–186 (2007).
359. Schutzer, S. E., Coyle, P. K., Belman, A. L., Golightly, M. G. & Drulle, J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* **335**, 312–315 (1990).
360. Schutzer, S. E., Coyle, P. K., Reid, P. & Holland, B. *Borrelia burgdorferi*–Specific Immune Complexes in Acute Lyme Disease. *JAMA* **282**, 1942–1946 (1999).
361. Zhong, W., Oschmann, P. & Wellensiek, H. J. Detection and preliminary characterization of circulating immune complexes in patients with Lyme disease. *Med Microbiol Immunol* **186**, 153–158 (1997).
362. Brunner, M. & Sigal, L. H. Immune Complexes from Serum of Patients with Lyme Disease Contain *Borrelia burgdorferi* Antigen and Antigen-Specific Antibodies: Potential Use for Improved Testing. *J Infect Dis* **182**, 534–539 (2000).
363. Jobe, D. A., Lovrich, S. D., Schell, R. F. & Callister, S. M. C-Terminal Region of Outer Surface Protein C Binds *Borrelia burgdorferi* Antibodies in Sera from Patients with Lyme Disease. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 573–578 (2003).
364. Bacon, R. M. *et al.* Serodiagnosis of Lyme Disease by Kinetic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant VlsE1 or Peptide Antigens of *Borrelia burgdorferi* Compared with 2-Tiered Testing Using Whole-Cell Lysates. *J Infect Dis* **187**, 1187–1199 (2003).

365. Bernard, H. *et al.* Circulating Ara h 6 as a marker of peanut protein absorption in tolerant and allergic humans following ingestion of peanut-containing foods. *Clin Exp Allergy* **50**, 1093–1102 (2020).
366. Steindl, F., Armbruster, C., Pierer, K., Purtscher, M. & W.D Katinger, H. A simple and robust method for the complete dissociation of HIV-1 p24 and other antigens from immune complexes in serum and plasma samples. *Journal of Immunological Methods* **217**, 143–151 (1998).
367. Da Rocha Queiroz Lima, M. *et al.* A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. *Journal of Virological Methods* **204**, 105–108 (2014).
368. Beall, M. J. *et al.* Validation of immune complex dissociation methods for use with heartworm antigen tests. *Parasit Vectors* **10**, (2017).
369. Frobert, Y. & Grassi, J. Screening of monoclonal antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase. *Methods Mol Biol* **80**, 57–68 (1998).
370. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**, 88–95 (1961).
371. Wills, M. K. B., Kirby, A. M. & Lloyd, V. K. Detecting the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia Burgdorferi*, in Ticks Using Nested PCR. *J Vis Exp* 56471 (2018) doi:10.3791/56471.
372. Pahl, A., Kühlbrandt, U., Brune, K., Röllinghoff, M. & Gessner, A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **37**, 1958–1963 (1999).

373. Wodecka, B., Leońska, A. & Skotarczak, B. 2010. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. *Journal of Medical Microbiology* **59**, 309–314.
374. Carlson, D. *et al.* Lack of *Borrelia burgdorferi* DNA in synovial samples from patients with antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **42**, 2705–2709 (1999).
375. Hedman, J. & Rådström, P. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR. in *PCR Detection of Microbial Pathogens* vol. 943 17–48 (Humana Press, 2013).
376. Lefeuvre, B. *et al.* Effects of topical corticosteroids and lidocaine on *Borrelia burgdorferi* *sensu lato* in mouse skin: potential impact to human clinical trials. *Sci Rep* **10**, 10552 (2020).
377. Bil-Lula, I., Matuszek, P., Pfeiffer, T. & Woźniak, M. Lyme Borreliosis--the Utility of Improved Real-Time PCR Assay in the Detection of *Borrelia burgdorferi* Infections. *Adv Clin Exp Med* **24**, 663–670 (2015).
378. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
379. Tobias, R. *Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet Platform*. (2013).
380. Orthwein, T., Huergo, L. F., Forchhammer, K. & Selim, K. A. Kinetic Analysis of a Protein-protein Complex to Determine its Dissociation Constant (KD) and the Effective Concentration (EC50) of an Interplaying Effector Molecule Using Bio-layer Interferometry. *Bio Protoc* **11**, e4152 (2021).
381. Volland, H. *et al.* A solid-phase immobilized epitope immunoassay (SPIE-IA) permitting very sensitive and specific measurement of angiotensin II in plasma. *Journal of Immunological Methods* **228**, 37–47 (1999).
382. Buffer Formulations\_Biorad.

383. Berglund, S. R. *et al.* Optimized Methodology for Sequential Extraction of RNA and Protein from Small Human Skin Biopsies. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 349–353 (2007).
384. Parkinson, E. *et al.* Proteomic Analysis of the Human Skin Proteome after In Vivo Treatment with Sodium Dodecyl Sulphate. *PLOS ONE* **9**, e97772 (2014).
385. Boeuf, A. Développement d’approches protéomiques pour l’étude des interactions tique / *Borrelia* / peau. (Université de Strasbourg, 2013).
386. van Burgel, N. D., Brandenburg, A., Gerritsen, H. J., Kroes, A. C. M. & van Dam, A. P. High sensitivity and specificity of the C6-peptide ELISA on cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis patients. *Clinical Microbiology and Infection* **17**, 1495–1500 (2011).

# *Annexes*

Pour réaliser les alignements de séquences, les séquences corrigées, de chaque protéine, issues de la banque de données Swiss-Prot ont été sélectionnées. Les séquences issues de Swiss-Prot sont des données extraites de la littérature ou d'analyses informatiques, toutes deux étant vérifiées et annotées manuellement. Pour la protéine OspA, nous avons sélectionné 5 séquences non redondantes, pour la protéine OspC, nous avons sélectionné 2 séquences (correspondant à *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31 et 297) et pour la flagelline une séquence (correspondant à *Bbss* B31). Aucune séquence corrigée (Swiss-Prot) pour VlsE n'a été trouvée.

De manière à compléter les alignements *in silico*, nous avons sélectionné des séquences protéiques encore non intégrées à la banque Swiss-Prot (issu de TrEMBL). Ces séquences ont été obtenues par traitement informatique avec une vérification et une annotation automatique. Nous avons choisi les séquences d'organismes que nous avons à disposition au laboratoire (soit *B. afzelii* BO23, *B. bavariensis* PBi, *B. burgdorferi* s.s. B31, *B. burgdorferi* s.s. 297, *B. garinii* CIP 103362), de tailles similaires à celle déjà vérifiées quand cela était possible. Pour la protéine VlsE, les séquences complètes (exceptée la séquence pour *B. burgdorferi* B31) n'étaient pas disponibles pour les différentes souches. Lorsque cela est possible, nous avons sélectionné la séquence la plus longue disponible.







## Annexe 4 : Aligement des séquences en acides aminés des protéines VlsE de *B. burgdorferi* s.l.

Aligement multiple de séquences protéiques de 4 espèces : *Bbss* B31, *Ba* BO23, *Bbav* PBI, *Bg* CIP103362. Un astérisque (\*) indique les positions qui sont conservées à 100% dans l'aligement, Les deux points (:) indiquent la conservation entre les groupes de propriétés fortement similaires, tandis que le point (.) indique la conservation entre les groupes de propriétés faiblement similaires. L'encadré rouge représente un peptide conservé, le peptide C6<sup>386</sup>.

tr Q5DVL7 Q5DVL7_BORBG	MKKISSAILLTTFFVFINCKSQVAD---- <td>55</td>	55
tr Q5DVL9 Q5DVL9_BORGR	MKKISSAIFLLAFFVFTNCKNNAELAEAEAKNQSAKDFYHAIKLYGDFVDFNAIGGLV	60
tr Q5DVM0 Q5DVM0_BORAF	MKKISSAIFLTALLVFINCKNNVAVGK-GNDDKDSVKTFYESIINLGNFGIDVFNAFSGLV	59
tr Q5DVM3 Q5DVM3_BORBP	MKKISSAIFIVAFALIGCKNNVGGD-DK-KDTAASIFYQSIINLGNFGIEVFNAFSGLV	58
	*****: : : : . * . . . . . . . . * : : * : * : * : * : * : * : *	
tr Q5DVL7 Q5DVL7_BORBG	AEAFGFKSDPKKSDVKTYFTTVAAKLEKTKTDLNSLPKEKSDISSTTGKPDSTGSGVTAV	115
tr Q5DVL9 Q5DVL9_BORGR	SDVF-YKADPKKSDVKNYFDSIASILKETQTKLDALSKEQGGG-----DGGT---QV	108
tr Q5DVM0 Q5DVM0_BORAF	ADTF-FKSDPKKSDVKTYFESISSTLKATKGGKLDLVSACKGE-----G-GSVKASV	109
tr Q5DVM3 Q5DVM3_BORBP	ADAF-SKADPKKSDVKTYFDSITKTLKDTKTKLEDISKEKTTGG-----EKTPAVEGI	109
	: : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
tr Q5DVL7 Q5DVL7_BORBG	EEAIKEVSELLDKLVTAVKTAE--GASSGTAAGIENVDDA----GAAKAADKASVTGIAK	169
tr Q5DVL9 Q5DVL9_BORGR	VDAAKKAGEWIKEMHKAVEDTAKAGGEGGSESIANVAAGGGNDGAGAKADVNSVTGIAK	168
tr Q5DVM0 Q5DVM0_BORAF	ESAVDEVSKWLEEMIKAEEAAKVGTTGGDGKIGDSAANH-----GAKADKDSVKGIAK	163
tr Q5DVM3 Q5DVM3_BORBP	AEVVKTGWEWLDGLIKAAEGGGKAADGGGSDKIGNVAAGG-----GAGADKESVNGIAG	163
	. . . . : : : : * : : . * * : : . . . . * * * * * * *	
tr Q5DVL7 Q5DVL7_BORBG	GIKEIVEAAGGSEKLKA-----VAAAKGGNEKAGKLFKGAGASANG-----DSEAASKA	218
tr Q5DVL9 Q5DVL9_BORGR	GMKAIVDAAGKAGVE-LKPA----AAGGAAANDAGKLFASGANANAAAANADDAEGAAEAA	223
tr Q5DVM0 Q5DVM0_BORAF	GIKGIVDAAGKALGKGLKDVKAAADDEANADAGKLFAGNANAAVGAAADI-----AKA	218
tr Q5DVM3 Q5DVM3_BORBP	AIKGIIVEAAKKVEGVKFPKAAADAAAADGNKKAGKLFGTAAAGADAG---DV-----KDA	215
	. *	
tr Q5DVL7 Q5DVL7_BORBG	AGAVSAVSGEQILSAIVKAAGAAAGDQEGKKPEEAKNPIAAAIGNKNGD---AEFGNE-M	274
tr Q5DVL9 Q5DVL9_BORGR	GKAVSAVSGDQILKAIVDAAGAT---AGKKANEATNAVEAAIGDDNAGQAGAFAAGMQ	279
tr Q5DVM0 Q5DVM0_BORAF	AGAVTAVSGEQILKAIVEAAGDPA-NQAGKKAEAKNPIAAAIGTD--DDNGAAFKDE-M	274
tr Q5DVM3 Q5DVM3_BORBP	AAAVGAVSGEQILNAIVTAAGQ-A-GQAGKKADEAKNAIEAAIGAA--GDA--DFGDDIK	269
	. *	
tr Q5DVL7 Q5DVL7_BORBG	KKDDQIAAAIAFRGMAKDGFVAVKNNEKKAEGAIGAGEYTVRKVLGAIITGLIGNPVGP	334
tr Q5DVL9 Q5DVL9_BORGR	NKNDQIAAAIVLRLGAKSGKFANE-----	303
tr Q5DVM0 Q5DVM0_BORAF	KKSDKIAAAIVLRGVAKDGFVAVK-----	298
tr Q5DVM3 Q5DVM3_BORBP	KKNDQIAAALVLRGVAKDGFVAVK-----	293
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
tr Q5DVL7 Q5DVL7_BORBG	GLKKVGDVSKAASKETPPALNKCL	358
tr Q5DVL9 Q5DVL9_BORGR	-----	303
tr Q5DVM0 Q5DVM0_BORAF	-----	298
tr Q5DVM3 Q5DVM3_BORBP	-----	293

**Titre :** Identification de marqueurs de la maladie de Lyme et développement de méthodes de détection directe d'antigènes de *Borrelia burgdorferi*

**Mots clés :** Maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, Diagnostic biologique, Antigènes circulants, Dosages immunologiques, Anticorps monoclonaux

**Résumé :** La Borréliose, aussi appelée la maladie de Lyme, est une maladie infectieuse due à la transmission d'une bactérie, *Borrelia burgdorferi*, lors d'une piqûre de tique infectée. Le diagnostic de la maladie de Lyme est complexe, il repose à la fois, sur les signes cliniques, l'épidémiologie et sur des tests biologiques en laboratoire. Les tests de diagnostics de routine actuels reposent presque exclusivement sur des tests indirects basés sur la recherche d'anticorps dirigés contre la bactérie (diagnostic sérologique). Ces tests manquent de fiabilité, de sensibilité et de standardisation, notamment dans la phase précoce de la maladie en raison de la faible quantité d'anticorps spécifiques produits par l'hôte. De plus, ces tests ne permettent pas de prouver l'existence d'une infection active. Des tests de diagnostic direct sont donc nécessaires. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était de développer un test de diagnostic direct et précoce basé sur la détection d'antigènes circulants produits par la bactérie au cours de l'infection. Pour ce faire, dans une première partie de la thèse, nous avons recherché de potentiels marqueurs bactériens dans le plasma de souris infectées avec une souche de *Borrelia burgdorferi*.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à plusieurs potentiels biomarqueurs reportés dans la littérature tels que les protéines bactériennes FlaB, OspA, OspC et VlsE. Afin d'évaluer leur intérêt pour le diagnostic de la maladie de Lyme, nous avons développé diverses méthodes de détection immunologiques (ELISA, Western Blot). Pour cela, des anticorps monoclonaux ont été produits contre les différents antigènes. Les outils développés ont ensuite été évalués dans un modèle d'infection murin. Deux marqueurs précoces : la protéine flagellaire FlaB et la protéine de surface externe OspC ont été détectées dans les tissus et le plasma de souris. Il s'agit de la première détection d'antigènes de *Borrelia* dans le plasma d'animaux infectés. Ces résultats suggèrent que particulièrement OspC pourrait être un bon marqueur sanguin pour le diagnostic de la Borréliose de Lyme. Une première évaluation de ce marqueur a également été réalisée sur une cohorte de patients non caractérisés.

**Title:** Identification of markers for Lyme disease and development of methods for direct detection of *Borrelia burgdorferi* antigens

**Keywords:** Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, Biological diagnosis, Circulating antigens, Immunological assays, Monoclonal antibodies

**Abstract:** Borreliosis, also known as Lyme disease, is an infectious disease caused by the transmission of a bacterium, *Borrelia burgdorferi*, through the bite of an infected tick. The diagnosis of Lyme disease is complex, based on clinical signs, epidemiology and laboratory tests. Current routine diagnostic tests rely almost exclusively on indirect tests based on the search for antibodies directed against the bacteria (serological diagnosis). These tests lack reliability, sensitivity and standardization, especially in the early phase of the disease due to the low amount of specific antibodies produced by the host. Moreover, these tests do not prove the existence of an active infection. Direct diagnostic tests are therefore necessary. In this context, the objective of the thesis was to develop a direct and early diagnostic test based on the detection of circulating antigens produced by the bacteria during the infection. In the first part of the thesis, we searched for potential bacterial markers in the plasma of mice infected with a *Borrelia burgdorferi* strain.

In the second part, we focused on potential biomarkers reported in the literature such as the bacterial proteins FlaB, OspA, OspC and VlsE. In order to evaluate their interest for the diagnosis of Lyme disease, we developed various immunological detection methods (ELISA, Western Blot). For this purpose, monoclonal antibodies were produced against the different antigens. The immunological tools developed were then evaluated in a mouse infection model. Two early markers: the flagellar protein FlaB and the external surface protein OspC were detected in mouse tissues and plasma. This is the first detection of *Borrelia* antigens in the plasma of infected animals. These results suggest that OspC in particular could be a good blood marker for the diagnosis of Lyme Borreliosis. A first evaluation of this marker was also performed on a cohort of uncharacterized patients.