

CARACTERISATION DE *BORRELIA VALAISIANA*
ET
IMPLICATIONS CLINIQUES

Thèse

Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences

par

Karine Ryffel-Girardet



Directeur de Thèse:

Prof. Bruno Betschart
Institut de Zoologie
Université de Neuchâtel

Thèse réalisée à Sion à
l'Institut Central des Hôpitaux Valaisans,
Département Maladies Infectieuses et
Immunologie
supervisée par le Dr. Olivier Péter

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

**Caractérisation de *Borrelia valaisiana* et
implications cliniques**

de Mme Karine Ryffel-Girardet

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Mme L. Gern, MM. B. Betschart (directeur de thèse),
O. Péter (Sion) et G. Baranton (Paris)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 12 avril 2000

Le doyen:



J.-P. Derendinger

1. INTRODUCTION	5
1.1 BIOLOGIE DE <i>BORRELIA</i>	5
1.1.1 Le vecteur	5
1.1.2 Taux d'infection des tiques par <i>Borrelia</i>	5
1.1.3 Transmission de <i>Borrelia</i> de la tique à l'hôte	6
1.2 <i>BORRELIA BURGDOFFERI</i>	7
1.2.1 Généralités sur les <i>spirochetaceae</i> , les borrélioses récurrentes et autres	7
1.2.2 Caractères phénotypiques	8
1.2.3 Caractères génotypiques	9
1.2.4 Typisation et distribution géographique de <i>Borrelia</i>	10
1.3 MANIFESTATIONS CLINIQUES	11
1.3.1 Historique de la borréliose de Lyme	11
1.3.2 Symptômes cliniques d'une infection à <i>Borrelia burgdorferi</i> ss.	11
1.3.3 Diagnostic de la borréliose de Lyme chez l'homme	13
1.3.4 Association de l'espèce infectante avec les manifestations cliniques	14
1.3.5 Traitements et prévention	14
1.4 <i>BORRELIA VALAISIANA</i>	15
1.5 BUTS DE L'ETUDE	16
2. MATERIEL ET METHODES	17
2.1 ISOLEMENTS DE <i>BORRELIA</i>	17
2.1.1 Récolte et dissection des tiques <i>I. ricinus</i>	17
2.1.2 Culture de <i>Borrelia</i> et détection par microscopie à fond noir (MFN)	17
2.1.3 Lavage des souches	17
2.1.4 Détection de <i>Borrelia</i> à partir de l'intestin des tiques	17
2.2 CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE <i>BORRELIA BURGDOFFERI</i> SL	18
2.2.1 SDS-Page et Westernblot	18
2.2.2 Caractérisation des bandes protéiques avec des anticorps monoclonaux	18
2.2.3 Typisation des isolats par PCR et au moyen d'anticorps monoclonaux	19
2.2.4 Electrophorèses bidimensionnelles	19
2.2.5 Préparation d'un anticorps monoclonal	20
2.2.6 ELISA	21
2.3 CARACTERISATION GENETIQUE DE <i>BORRELIA VALAISIANA</i>	21
2.3.1 Purification de l'ADN	21
2.3.2 Caractérisation des souches	21
2.3.3 Liste des isolats <i>Borrelia valaisiana</i> et de leurs provenances	21
2.3.4 Séquençage des produits d'amplification	22
2.3.5 Alignement des séquences et analyse phylogénétique	23
2.3.6 Séquence nucléotidique	23
2.3.7 Analyse RFLP	23
2.4 DIAGNOSTIC ET EVALUATION DES ECHANTILLONS CLINIQUES	23
2.4.1 Analyse sérologique des échantillons cliniques	23
2.4.2 Immunoblot quatre espèces (<i>B. burgdorferi</i> ss., <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> et <i>B. valaisiana</i>) avec des séra de patients atteints de borréliose de Lyme	24
2.4.3 Typisation génétique des <i>Borrelia</i> présentes dans les échantillons cliniques	24
3. RESULTATS	26
3.1 COMPARAISON DE TROIS METHODES DE DETECTION DE <i>BORRELIA</i> CHEZ LES TIQUES	27
3.2 CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE <i>BORRELIA VALAISIANA</i>	35
3.2.1 Characterization of <i>Borrelia valaisiana</i> sp. nov. and <i>Borrelia lusitaniae</i> sp. nov., two members of <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato, by 16S ribosomal DNA sequence analysis.	36
3.2.2 Description du profil protéinique de <i>B. valaisiana</i> par électrophorèse bidimensionnelle	51
3.2.3 Identification of <i>Borrelia valaisiana</i> novel species with a monoclonal antibody	59
3.2.4 Identification of <i>Borrelia valaisiana</i> novel species with primers specific to the <i>ospA</i> gene.	67
3.3 IMPLICATION CLINIQUE DE <i>BORRELIA VALAISIANA</i>	81
3.3.1 Scored antibody reactivity by immunoblot shows an association between clinical manifestations and <i>Borrelia burgdorferi</i> ss., <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> and <i>B. valaisiana</i> in humans	82

3.3.2 Détermination du potentiel infectieux de *Borrelia valaisiana* sur des échantillons cliniques
au moyen d'amorces spécifiques..... 96

4. DISCUSSION103

4.1 CLASSIFICATION DES ESPECES *BORRELIA BURGDORFERI* SL. 103

4.2 EPIDEMIOLOGIE DE *BORRELIA VALAISIANA*..... 103

4.3 TYPISATION DES ISOLATS *BORRELIA VALAISIANA*..... 104

4.4 CONCLUSION 109

RESUME110

REMERCIEMENTS.....123

1. Introduction

1.1 Biologie de *Borrelia*

1.1.1 Le vecteur

Les tiques du complexe *Ixodes ricinus* sont les principaux vecteurs de la Borréliose de Lyme. Arthropodes hématophages appartenant à l'ordre des Acariens, les tiques *Ixodes* sont classées en différentes espèces avec des similitudes morphologiques et écologiques. Chacune de ces espèces possède une répartition géographique qui lui est propre. *I. ricinus* est l'espèce de tique communément rencontrée en Suisse. On la trouve de préférence dans des régions forestière de type sous-bois, avec une végétation suffisamment abondante pour lui assurer un taux d'humidité supérieur à 80%. Son cycle reproductif se déroule sur trois stades : larve, nymphe et adulte. Chaque stade est précédé d'un repas sanguin sur un hôte. Il a été démontré qu'*I. ricinus* était capable de parasiter un large éventail d'espèces différentes parmi les mammifères, les oiseaux et les reptiles. Les larves et les nymphes ont cependant une plus grande tendance à se nourrir sur les petits mammifères, les lézards et les oiseaux, tandis que les tiques adultes se nourrissent sur de plus gros mammifères (Aeschlimann 95). Dans ce cycle, l'homme n'est qu'un hôte accidentel.

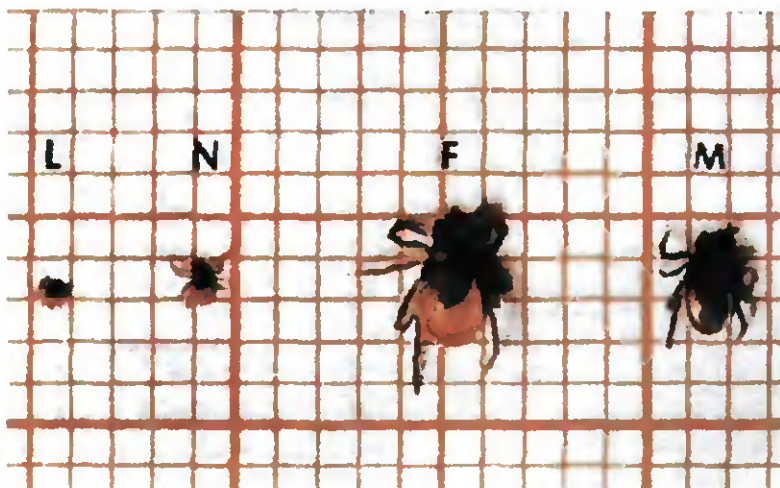


Figure1 : Les trois stades d'*Ixodes ricinus* L : larve, N : nymphe, F : femelle, M : mâle (photo. O. Péter, Sion-CH).

1.1.2 Taux d'infection des tiques par *Borrelia*

Le taux d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl. dépend du stade de développement des tiques. En Suisse, on considère que seules 0 à 3% de larves sont infectées par des spirochètes (Bellet-Edimo 97, Zhioua 94), tandis que les nymphes et les adultes présentent un taux d'infection variant de 5 à 50% avec une médiane d'infection entre 25 et 30% (Aeschlimann 87, Péter 90, Péter 95). La prévalence d'infection plus élevée chez les tiques adultes par rapport aux larves s'explique par la transmission transstadiale. Les larves sont infectées par *Borrelia* lors des repas sanguins qui seront nécessaires à leur développement. Les nymphes, de même que les adultes, vont conserver l'infection après la mue. A partir des glandes salivaires des femelles, les spirochètes se disséminent vers d'autres organes. Leur présence dans les ovaires peut provoquer l'infection des œufs mais ce cas reste extrêmement rare (Bellet-Edimo 97) et explique le faible taux d'infection chez les larves (Zhioua 94).

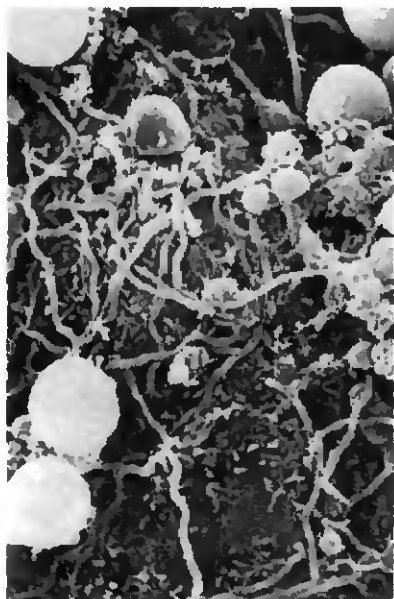


Figure 2 : *B. burgdorferi* dans l'intestin médian d'une tique contaminée.
(photo. W. Burgdorfer, Montana-USA)

Outre *Borrelia*, *I. ricinus* est aussi vecteur de pathogènes, tels que le virus de l'encéphalite à tique (Matile 82), les rickettsies (Péter 81), *Coxiella burnetii* (Aeschlimann 79), *Ehrlichia phagocytophila* (Pfister 87), les protozoaires comme *Babesia divergens* ou *Babesia microti* (Sweeney 98, Weber 80), et les trypanosomes et les nématodes (Aeschlimann 79).

1.1.3 Transmission de *Borrelia* de la tique à l'hôte

Au début d'un repas sanguin, les spirochètes migrent de l'intestin jusqu'aux glandes salivaires de la tique et sont transmis à l'hôte par la salive (Gern 90, Monin 89, Ribeiro 87, Zung 89) ou par régurgitation (Burgdorfer 89). Les spirochètes persistent généralement chez l'hôte après l'infection. Parmi les hôtes potentiels de *Borrelia*, ce sont principalement les rongeurs de petites tailles qui jouent le rôle de réservoirs à spirochètes. Il a été démontré par xénodiagnose que les oiseaux (*Turdus merula*) (Humair^a 98), les écureuils (*Sciurus carolinensis*) (Craine 94, Craine 97, Humair^b 98), les rats (*Rattus norvegicus* et *R. rattus*) (Matuschka 97) et les loirs (*Glis glis*) (Matuschka 94) étaient capables de transmettre des borrélioses aux tiques saines. De par leur longévité plus élevée, les loirs et les rats présentent un potentiel infectieux supérieur à celui des souris et des oiseaux (Matuschka 94). Ils sont cependant moins abondants que les petits rongeurs.

1.2 *Borrelia burgdorferi*

1.2.1 Généralités sur les *spirochetaceae*, les borrelies récurrentes et autres

Borrelia burgdorferi

Appartenant à l'ordre des Spirochaetales, les Spirochaetacea se distinguent des Leptospiraceae de par leurs caractéristiques morphologiques.

Table 1 : Position systématique de *B. burgdorferi* sl. (d'après Preac-Mursic and Wilske 92, modifié).

Ordre	Famille	Genre	Espèce
Spirochaetales	Spirochaetaceae	Cristispira	
		Spirochaeta	
		Treponema	
		Borrelia	B. burgdorferi B. coriaceae B. hermsii B. parkeri B. recurrentis B. turricata
	Leptospiraceae	Leptospira	L. interrogans

Les *Borrelia* se distinguent des autres spirochètes de par leur longueur et leur forme en hélice lâche enroulée dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Ce sont des bactéries Gram négatives qui mesurent de 4 à 30 µm de longueur avec un diamètre de 0.18 à 0.25 µm (Johnson 84, Preac-Mursic 86). Leur structure cellulaire est constituée d'une mince couche mucoïde recouvrant l'enveloppe externe qui entoure le cylindre protoplasmique. Une dizaine de flagelles situés dans l'espace périplasmique assurent la locomotion des spirochètes (Barbour 86, Holt 78).

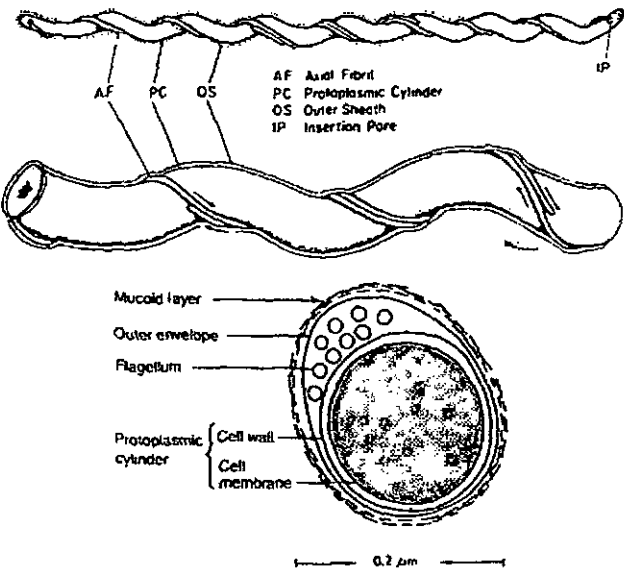


Figure 3 : Morphologie générale du spirochète (d'après Holt 1978) et représentation transversale des structures internes (d'après Simon et al 1991).

La culture de *B. burgdorferi* s'effectue en aérobiose. La croissance maximum se situe entre 30 et 37°C en fonction du milieu nutritif. Ce milieu, dérivé du milieu de Kelly (Kelly 71) a été adapté à de nombreuses occasions (Barbour 83, Barbour 84, Stoenner 82). Cependant, malgré l'amélioration de la qualité du milieu, la culture des spirochètes demeure particulièrement lente, comparée à celle des autres bactéries. Chaque spirochète s'allonge puis se divise en deux

cellules. Le temps de génération varie de 6 à 24 heures. On obtient, ainsi, en 4 à 6 jours $1-4 \times 10^8$ spirochètes/ml (Barbour 84). La culture à partir de prélèvements pathologiques est d'autant plus difficile que les spirochètes sont en petit nombre. Le taux d'isollements dépasse rarement 10% (Hubalek 98, Péter 95). Au fil des cultures, *B. burgdorferi* perd sa pathogénicité. En effet, après 10 à 15 passages, les spirochètes perdent leur potentiel infectieux (Schwan 88).

L'infection d'une tique par *Borrelia* peut être mise en évidence par différentes méthodes. La détection de *B. burgdorferi* sl. peut se faire par observation au microscope sur fond noir (MFN) d'un frottis d'intestin de tique ou du milieu de culture après quelques jours d'incubation en milieu BSK, ou par immunofluorescence directe ou indirecte (IF), qui consiste à visualiser les spirochètes dans un frottis fixé sur une lame à l'aide d'anticorps spécifiques fluorescents. Ces méthodes sont peu coûteuses et permettent de détecter les spirochètes avec une bonne sensibilité (Gilot 96, Hubalek 98, Kahl 98, Péter 95, Zeman 98).



Figure 4 : Détection des spirochètes par immunofluorescence directe. (photo. O. Péter, Sion-CH)

Parallèlement à l'immunofluorescence, la PCR est une méthode couramment employée. Après extraction de l'ADN, des fragments sont amplifiés et visualisés sur gel d'agarose avec du bromure d'éthidium (Persing 90). Cette méthode ne permet pas de savoir si l'infection est toujours active. En effet, comme toutes les méthodes de détection, à l'exception de la culture et de la MFN, la réaction s'opère aussi bien sur du matériel vivant que mort. La sensibilité de la PCR dépend de chaque méthode de détection. Une étude récente considère cependant, que l'IF présente une sensibilité plus élevée que la PCR (Kahl 98).

1.2.2 Caractères phénotypiques

Les premières recherches se sont portées sur la caractérisation des protéines de *Borrelia burgdorferi* sl., le profil protéique relevant plus de 30 protéines comprises entre 7 kDa et 100 kDa (Barbour 86). Il s'est avéré que les protéines de poids moléculaire (PM) inférieur à 40 kDa variaient d'une espèce à l'autre, tandis que celles dont le PM était supérieur à 40 kDa présentaient plus d'homologie (Wilske 86, Wilske 88).

Parmi les protéines comportant un PM variant d'une souche à l'autre, un certain nombre ont été décrites comme protéines de surface. Il s'agit des « Outer Surface Proteins » (Osp), présentes dans le fluide de la membrane externe. Ce sont toutes des lipoprotéines (Brandt 90) attachées à la membrane plasmique au moyen de leur région lipidique (Rosa 93). Ce sont de bons marqueurs pour la borréliose de Lyme (Ma 92) même si des variations ont été largement observées entre isolats américains et européens (Barbour 85, Wilske 86, Wilske 88). Tandis que l'OspA et l'OspB des espèces américaines présentent en effet une relative constance dans leur PM (OspA 31 kDa et OspB 34 kDa) (Barbour 85) avec absence d'OspC (Bissett 87), les isolats européens, quant à eux, se distinguent par leur hétérogénéité dans l'expression de ces protéines (Hu 94, Wilske 86, Wilske 88). Ainsi l'OspA varie entre 30 kDa et 33.5 kDa, l'OspB entre 34 kDa et 35 kDa, l'OspC entre 20 kDa et 23 kDa (Wilske 88). Alors que les anticorps dirigés contre l'OspA et l'OspB apparaissent dans les stades tardifs de la maladie (Craft 86, Schutzer 94), les anticorps dirigés contre l'OspC sont exprimés chez la moitié des isolats européens, principalement lors des infections précoces. Cependant, l'OspC présente parfois des réactions avec les anticorps spécifiques d'autres agents viraux (Ryffel 98, Wilske 86,

Wilske 88). L'OspD, l'OspE et l'OspF, quant à elles, sont stables et se situent respectivement à 28 kDa, 19 kDa et 26 kDa (Lam 94, Norris 92).

Parmi les protéines dont le PM est stable au sein des isolats, on peut citer la flagelline (41 kDa), qui constitue les flagelles de *B. burgdorferi* sl. (Barbour 86). C'est la protéine la plus immunogène dans la maladie de Lyme (Ma 92); elle est utilisée dans la plupart des ELISA pour détecter les infections débutantes. Cependant, ayant une certaine homologie avec les flagelles d'autres bactéries, elle présente de nombreuses réactivités croisées lors des tests sérologiques. Elle doit donc être combinée à d'autres protéines spécifiques de *Borrelia* (Ma 92), telles que la 93 kDa, la 39 kDa et la 18 kDa qui sont d'excellents marqueurs de la maladie. Très immunogènes, ces trois protéines présentent peu de réactions croisées avec les anticorps des sera de patients atteints de syphilis ou autre contrôle (Simpson 90). Les anticorps de la 93 kDa et la 18 kDa apparaissent dans des stades tardifs de la maladie (Dressler 93, Ma 92, Ryffel 98, Zoller 91), tandis que ceux de la 39 kDa apparaissent dans les stades précoces (Ma 92). La 66 kDa appartient à la membrane externe de la bactérie (integral membrane protein) (Probert 95). Comme la 30 kDa, la 34 kDa et la 45 kDa dont la présence des anticorps caractérisent des infections tardives (Dressler 93), elle est aussi communément reconnue par les anticorps de patients atteints par la borréliose de Lyme (Bunikis 96).

La 83 kDa est une protéine extracellulaire (Dorward 91) fortement immunogène et très spécifique à *B. burgdorferi* sl. (Luft 92).

Parmi les protéines présentant une réactivité de faible spécificité pour *Borrelia burgdorferi* ss., on trouve la 60 kDa, protéine cytoplasmique commune à une grande majorité de bactéries (Hansen 88) ainsi que les « heat shock » protéines situées entre 58 kDa et 73 kDa (Carreiro 90) qui présentent des homologies avec la 60 kDa et la 70 kDa d'*Escherichia coli* (Hansen 88, Luft 91).

1.2.3 Caractères génotypiques

Contrairement à la plupart des bactéries qui possèdent un chromosome circulaire de grande taille accompagné de petits plasmides, le génome de *B. burgdorferi* sl. présente la particularité d'avoir un chromosome linéaire de petite taille accompagné d'une multitude de plasmides contenant une grande partie du matériel génétique de la bactérie. Le génome de *B. burgdorferi* sl. est, en effet, constitué d'un seul chromosome linéaire de 950 à 1000 kb (Baril 89, Davidson 92, Ferdows 89) et de différents plasmides linéaires (3 à 12) et circulaires (1 à 9) (Saint Girons 94, Sherwood 99) de taille variable (Barbour 87). La séquence génomique de *B. burgdorferi* B31 a été décrite par Fraser et se trouve à disposition sur le site de recherche TIGR (Fraser 97).

Plusieurs gènes ont déjà été décrits, comme ceux codant pour la flagelline, les Osp-protéines, la 60 kDa, la 93 kDa, ainsi que ceux codant pour les sous-unités ribosomiques 5S, 23S et 16S. Les gènes codant pour les protéines de surface (Osp) sont situés sur des plasmides (Barbour 87, Howe 86), ce qui explique la variabilité d'expression de ces protéines d'un isolat à l'autre. Ainsi le gène codant pour l'OspD se situe sur un plasmide linéaire de 38 kb (Norris 92), tandis que ceux codant pour l'OspE et l'OspF sont situés sur un même plasmide circulaire de 27 kb (Marconi 93, Sadziene 93). Même s'il n'est pas systématiquement exprimé, ce plasmide semble présent chez toutes les *Borrelia* (Marconi 93, Wilske^a 93). Les gènes codant pour l'OspA et l'OspB semblent quant à eux situés sur un même plasmide de 49 kb (Howe 86, Sadziene 92). La régulation de leur expression paraît par ailleurs étroitement liée de façon inversement proportionnelle à celle de l'OspC et vice versa (Wilske 88, Wilske^a 93). En effet, une étude récente a démontré que l'expression de l'OspA était plus forte que celle de l'OspC chez les spirochètes se trouvant dans les glandes salivaires des tiques non nourries, alors que ces proportions s'inversaient lors du repas sanguin de la tique. A la fin du repas, cependant, l'OspC était à nouveau moins exprimée que l'OspA chez les borrélioses se trouvant dans les tiques (Schwan 00). Par contre, il a été démontré que chez l'homme la réponse immunologique est plus forte contre l'OspC que contre l'OspA (Montgomery 96).

1.2.4 Typisation et distribution géographique de *Borrelia*

Au vu de la variabilité phénotypique et génotypique de *Borrelia*, les auteurs ont classifié *B. burgdorferi* sl. en différentes espèces. Barbour (Barbour 85) a été le premier à observer, sur la base du profil protéique et de la réaction des isolats avec certains anticorps monoclonaux, une différence entre les isolats européens hétérogènes et les isolats américains. Ce n'est qu'en 1992 que Baranton caractérise une nouvelle espèce, *B. garinii* (Baranton^b 92). Ces résultats sont suivis de près par ceux de Canica définissant le groupe VS461 comme *B. afzelii* nov. sp. (Canica 93). Par la suite, l'hybridation génomique et le RFLP « restriction fragment length polymorphism » ont démontré l'existence d'autres groupes génétiquement différents, tels que *B. japonica* (Kawabata 93), *B. andersonii* (Marconi 95) et, plus récemment encore, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* et *B. bissetii* (Le Flèche 97, Postic 98, Wang 97) ainsi que *B. tanuki* et *B. turdi* (Fukunaga^b 96).

Les souches isolées en Europe semblent démontrer une prédominance de l'espèce *B. garinii* suivie par *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss., *B. valaisiana* (St-Girons 98) et *B. lusitaniae* (Lefleche 97). En Scandinavie et aux Pays-Bas, *B. afzelii* est probablement la borrelie la plus courante (Rijpkema 96) suivie, aux Pays-Bas, par *B. valaisiana*. En Irlande, *B. valaisiana* a été décrite comme l'espèce prédominante suivie par *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss. et *B. afzelii* (Kirstein 97). *B. lusitaniae* a été isolée au Portugal (Postic^a 94) en république tchèque et en Biélorussie (Hubalek 97). En Valais (Suisse), une étude réalisée par Péter décrit une prédominance de tiques infectées par *B. burgdorferi* ss., suivie de près par *B. garinii* puis *B. afzelii* et *B. valaisiana* (Péter 95).

Aux Etats-Unis, *B. burgdorferi* ss. est l'espèce dominante accompagnée de deux espèces mineures non pathogènes pour l'homme *B. bissetii* (Postic 98) et *B. andersonii* qui est limité aux tiques de lapin (*I. dentatus*) et à quelques rares isolats californiens (Marconi 95)). Par contre, en Asie, *B. afzelii* et *B. garinii* sont fréquentes. *B. japonica* (Kawabata 93), *B. tanuki* et *B. turdi* (Fukunaga^b 96) sont des souches isolées au Japon. Seul le potentiel pathogène de *B. burgdorferi* ss., *B. garinii*, et *B. afzelii* a pour l'instant été démontré (Baranton^a 92, Wilske 86, Wilske 88).

1.3 Manifestations cliniques

1.3.1 Historique de la borréliose de Lyme

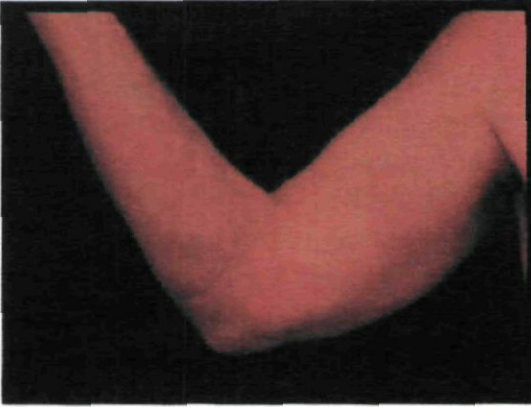
La première description de l'érythème migrant (EM) par le Suédois Afzelius date de 1909. Il s'agissait d'une patiente ayant développé une lésion cutanée annulaire migrante, à la suite d'une morsure de tique (Afzelius 1910). Cette manifestation sera désignée quelques années plus tard comme erythema chronicum migrans par un Autrichien du nom du Lipschütz (Lipschütz 1913). Il faut attendre 1922 pour que les atteintes neurologiques, telles que la paralysie faciale, soient associées pour la première fois aux piqûres de tiques (Garin 1922).

Dès 1972, des arthrites inflammatoires juvéniles parfois précédées d'EM font leur apparition dans trois agglomérations du Connecticut (Etats-Unis), Lyme, Old Lyme et East Haddam. Cette arthrite considérée comme nouvelle entité clinique fut appelée arthrite de Lyme et associée rapidement aux piqûres de tiques (Steere 1978). Bien que dès 1955 l'origine infectieuse de la maladie soit établie, ce n'est qu'en 1982 que l'agent responsable est isolé d'une tique américaine (Burgdorfer 82). Par la suite, des spirochètes seront simultanément isolés à partir de tiques capturées en Suisse (Barbour 83) et à partir du sang de deux patients atteints d'EM et de myalgies (Benach 83). Dès lors, la bactérie est baptisée du nom de son découvreur *Borrelia burgdorferi* (Johnson 84).

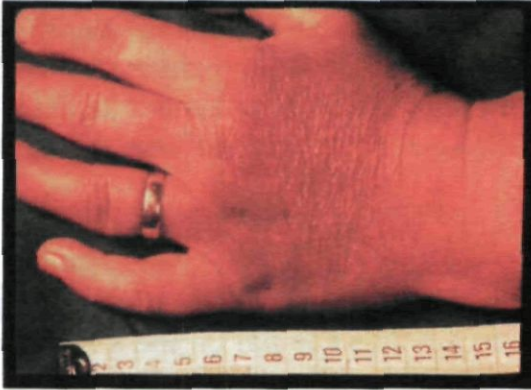
1.3.2 Symptômes cliniques d'une infection à *Borrelia burgdorferi* sl.

La période d'incubation de la maladie est très variable, de quelques jours à plusieurs semaines après la piqûre. La première manifestation se traduit dans 30% des cas par un EM qui apparaît en quelques jours à quelques semaines à l'endroit de la piqûre (Steere 89). Des cas d'EM multiples ont aussi été décrits (Asbrink 91, Nadelman 95). Cet EM est parfois accompagné de symptômes généraux d'allure grippale et disparaît spontanément sans traitement. Quelques semaines à quelques mois après la piqûre, on observe une dissémination des spirochètes dans la plupart des organes du patient. Des complications systémiques peuvent alors apparaître, comprenant principalement des atteintes neurologiques, telles que méningite, méningo-encéphalite, neurite crânienne, paralysie faciale etc. (Pachner 89). On observe aussi à ce stade des troubles cardiaques (syncope extra-systolie, myopéricardite), hépatiques, spléniques et musculaires (Duray 88). Le dernier stade de la maladie se caractérise, quant à lui, par des manifestations dites tardives, telles que des problèmes articulaires (arthrites) ou cutanés (acrodermatites chroniques atrophiantes (ACA) (Steere 89)). Certains troubles neurologiques complexes chroniques font aussi partie du stade tardif de la maladie (troubles neuropsychiatriques ou lésions démyélinisantes focales) (Altpeter 92).

L'Office Fédéral de la Santé Publique annonce en moyenne entre 1600 et 2000 cas de borréliose de Lyme en Suisse par année, toutes symptomatologies confondues.



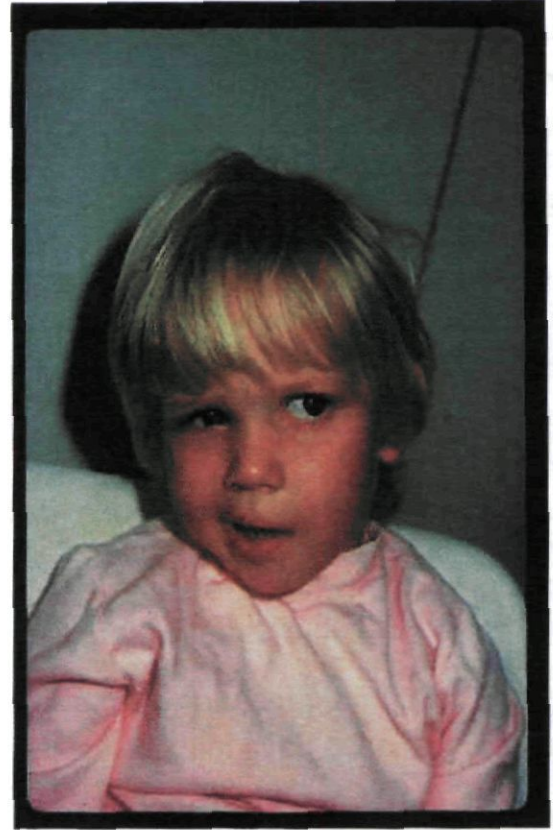
A



C



D



B

Figure 4 : Différents symptômes cliniques de la borrélioses de Lyme
 A : érythème migrant,
 B : neuroborréliose (paralysie faciale chez l'enfant),
 C : acrodermatite chronique atrophiante,
 D : arthrite de Lyme.

1.3.3 Diagnostic de la borréliose de Lyme chez l'homme

Culture

Des borrelies ont été isolées chez l'homme à partir de la peau, du sang, des liquides synoviaux, céphalo-rachidiens et autres (Berger 94, Jurca 98, Péter 93, Picken 98, Stobierski 94). La culture de *Borrelia*, à partir d'un prélèvement humain, est relativement délicate et peu efficace comme moyen de diagnostic. La sensibilité est de 30% à 70% sur les biopsies de peau (Asbrink 93) mais reste inférieure à 5% sur les liquides céphalo-rachidiens (Karlsson 90). C'est cependant la seule méthode qui permette de confirmer avec certitude la présence d'une infection active.

Sérologie

Parmi les méthodes indirectes couramment employées en laboratoire dans le diagnostic d'une infection due à *B. burgdorferi* sl., on peut citer les méthodes sérologiques telles que l'IF et l'ELISA. Ce sont, en effet, les deux techniques les plus couramment employées. Elles permettent de mettre en évidence les anticorps de types IgG, IgM et parfois même IgA. L'ELISA utilise comme antigène soit un extrait de bactéries lysées, soit une partie purifiée de cet extrait, tandis que l'IF emploie un frottis bactérien à l'état brut. Le test ELISA se révèle moins subjectif (Magnarelli 84) et présente une sensibilité plus grande que l'IF dans le cas des infections précoces (Wilske^b 93). Dans les infections plus tardives, la détection des immunoglobulines G par ELISA donne cependant des résultats comparables aux résultats de l'IF. Malheureusement, la spécificité des tests sérologiques n'est pas suffisante. On compte généralement 16% de faux positifs parmi les résultats d'ELISA dus à des infections bactériennes, telles que les spirochètes de la syphilis (Magnarelli 88) ou des agents viraux tels que EBV, Papovirus (Mayo 91). Pour ces raisons, le centre de contrôle des maladies infectieuses (CDC) préconise généralement d'effectuer en premier lieu un test ELISA et de confirmer par la suite les résultats positifs obtenus par immunoblot (Anonyme 95).

Le principe de la détection par immunoblot est le même que celui de l'ELISA. Les anticorps présents dans le sérum du patient se lient à un extrait bactérien et sont visualisés après une incubation avec une solution chromogénique. Cependant, l'immunoblot permet, à l'instar de l'ELISA, d'observer séparément la réponse immunogène dirigée contre chaque protéine, séparée par électrophorèse. L'interprétation des résultats d'un immunoblot est néanmoins un processus en partie subjectif même si le calcul du score des bandes visibles facilite la lecture des blots commerciaux (Ryffel 98).

Amplification génique

La dernière méthode à disposition, encore peu utilisée en laboratoire de routine, est la PCR. En effet, bien que plus d'une centaine de tests aient déjà été proposés pour détecter une infection à *B. burgdorferi* sl., la plupart ne présentent qu'un faible taux d'amplification. La sensibilité dépend du matériel clinique employé ainsi que du choix du gène cible. La PCR effectuée sur des biopsies d'EM s'avère de bonne sensibilité (70-80%), mais son utilité dans le diagnostic est très relatif, étant donné que cette lésion cutanée est pathognomique de la borréliose de Lyme (Moter 94, Schwartz 92, von Stedingk 95). Seuls les érythèmes atypiques nécessiteraient un tel examen. Les anticorps ne pouvant être détectés que quelques semaines après la piqûre (Malane 91), dans ce laps de temps, l'immunoblot et l'ELISA sont moins sensibles que la PCR. 89% des EM peuvent être diagnostiqués par PCR alors que 35-40% des EM sont diagnostiqués positifs avec un ELISA IgM et 15% avec un ELISA IgG (Moter 94, Mourtisen 96, Schwartz 92). Parmi les PCR les plus couramment employées, on compte celles permettant d'amplifier une partie des gènes codant pour les protéines de surface dont principalement l'OspA et l'OspB. Ces gènes situés sur un plasmide linéaire sont malheureusement très variables, en Europe en particulier, ce qui rend les PCR souvent peu sensibles face aux différentes espèces (Debue 91, Keller 92, Nielsen 90, Schmidt 95). Des fragments du gène codant pour la flagelline sont aussi fréquemment utilisés avec la PCR. Cependant, même si la partie terminale de ce gène présente l'avantage d'être

fortement conservée au sein des borrelies, de nombreuses réactions croisées avec d'autres bactéries, telles que *Bacillus subtilis*, apparaissent (Wallich 90). Ainsi, seule la partie médiane du gène se révèle spécifique à *Borrelia burgdorferi* sl.. Des fragments de gènes chromosomaux ont aussi été proposés comme support à l'amplification par PCR (Melchers 91, Rosa 89, von Stedingk 95). Le gène chromosomal *ly1* a été séquencé et un fragment du gène codant pour la polymérase C a été amplifié par PCR (Goodman 91, Goodman 95). Des fragments des gènes codants pour les sous-unités ribosomiques 16S et 23S ont aussi été proposés comme support à l'amplification par PCR (Marconi^a 92, Marconi^b *92, Schwartz 92). Cependant, les amorces spécifiques à ces sous-unités ribosomiques s'avèrent moins sensibles que celles spécifiques du gène *ospA* (Nocton 94, Persing 94). La méthode « nested-PCR », permettant d'amplifier successivement les fragments d'un même gène, semble améliorer la sensibilité de la réaction (Goodman 95, Picken 96, Schmidt 95), mais présente un risque accru de contamination. Cette méthode augmente aussi la durée et le coût du test.

En conclusion, le diagnostic d'une infection active est en premier lieu basé sur les manifestations cliniques et sur l'anamnèse. Il nécessite souvent des tests de laboratoires, dont les plus courants sont les test sérologiques et en particulier, l'ELISA et l'immunoblot.

1.3.4 Association de l'espèce infectante avec les manifestations cliniques

En Europe, Baranton fut un des premiers à décrire une possible association entre des manifestations cliniques et les différentes espèces de *Borrelia* (Baranton^a 92, Baranton 98). Ces études étaient basées sur la réactivité préférentielle observée sur des immunoblots à partir des sera de patients avec différentes manifestations cliniques de borréliose de Lyme.

Approximativement 60% des sera de patients atteints de neuroborréliose ont été décrits comme ayant une réactivité plus forte face à *B. garinii* (Anthonissen 94, Assous 93, Péter 97). Les infections dues à *B. afzelii* seraient, quant à elles, souvent associées aux ACA, tandis que les arthrites seraient dues à une infection par *B. burgdorferi* ss. (Assous 93, Dunand 98, Péter 97, van Dam 93). Il faut cependant noter que certains auteurs s'opposent à cette théorie (Eiffert 95), suggérant que la prédominance de *B. garinii* dans les neuroborrélioses ne relève pas d'une association entre la clinique et l'espèce infectante mais dépend de la prévalence de cette espèce dans les tiques de la région. Cet argument ne tient pas face aux études réalisées chez l'homme sur la nature des piqûres de tique. Il s'avère, en effet, que la majorité des infections soit dues à des piqûres de nymphes principalement contaminées par *B. afzelii* (Gern communication personnelle).

Par ailleurs, deux études ont démontré que le pouvoir d'invasion chez l'homme des spirochètes n'était pas le même en fonction des différentes souches. En effet, tandis que Wormser décrit un génotype particulier, au sein des spirochètes, responsable des affections cutanées de type EM (Wormser 99), Seinost suggère que la variabilité du gène *ospC* serait responsable de la pathogénicité des différentes souches (Seinost 99).

1.3.5 Traitements et prévention

Le traitement de la borréliose de Lyme se fait au moyen d'antibiotiques. *B. burgdorferi* sl. montre une sensibilité élevée envers les pénicillines, tétracyclines et les céphalosporines de troisième génération. On observe cependant une résistance face à la rifampicine, cotrimoxazole, les quinolones ainsi qu'in vivo contre l'érythromycine. De nombreux traitements ont été proposés dans le but de soigner la borréliose de Lyme (Steere 96, Steere 97, Weber 94). Généralement, la doxycycline, l'amoxicilline et la pénicilline sont utilisées pour le traitement lors d'apparition d'EM. Dans les cas de manifestations chroniques, il est vivement conseillé d'administrer de la ceftriaxone par voie veineuse. La durée du traitement s'étend généralement de 14 à 21 jours en fonction du stade de la maladie. Le fait d'avoir été en contact avec le spirochète ne semble pas

protéger d'une nouvelle infection, quoique tous les auteurs ne s'accordent pas sur ce point (Eiffert 96, Gustafson 92, Piesman 97).

Un vaccin est disponible aux Etats-Unis. En Europe, l'hétérogénéité retrouvée entre les différentes espèces, engendre quelques difficultés quant à sa réalisation. Sa commercialisation en Europe est cependant estimée à 2004-2005.

1.4 *Borrelia valaisiana*

En 1992, suite à l'évaluation du monoclonal D6, Péter propose de classifier *Borrelia* sur la base du profil de migration de l'OspA et de l'OspB des différentes souches (Péter 92). Il regroupe ainsi 23 isolats en quatre catégories. Le groupe 1 est décrit sur la base de souches présentant une OspA de 31 kDa et une OspB de 34 kDa. Il comprend, en outre, la souche de référence B31. Le groupe 2 est composé d'un seul isolat, VS461, présentant une OspA de 32 kDa et une OspB de 35 kDa. Le troisième groupe comprend une souche VSBP, isolée à partir d'un patient et qui présente une OspA à 33 kDa sans OspB. La majorité des isolats, obtenus lors de son étude, appartient à ce groupe et présente une réactivité spécifique avec l'anticorps monoclonal D6. Le quatrième groupe se compose d'un seul isolat, VS116, isolé à partir d'une tique *I. ricinus* et présente une OspA de 33.5 kDa sans OspB. Consécutivement, alors que Baranton décrit la caractérisation d'une nouvelle espèce, *B. garinii*, correspondant au troisième groupe défini par Péter (Baranton^b 92, Péter 92), Canica caractérise, quant à elle, l'isolat VS461, représentant le groupe 2 et lui attribue le nom de *B. afzelii* nouvelle espèce. Le quatrième groupe ne sera redéfini que quelques années plus tard. En 1995, lors d'une étude sur la répartition des différentes espèces en Valais, Péter isole un nouveau représentant du groupe VS116. Il confirme alors que ces souches font partie d'un groupe distinct, ne se rattachant pas aux trois espèces, *B. burgdorferi* ss., *B. garinii* et *B. afzelii* (Péter 95). Présentant un profil de migration particulier au niveau de l'OspA, elles ne montrent aucune réaction avec les anticorps monoclonaux habituels, employés lors de la caractérisation des différentes espèces, H3TS, D6 et I17.3 (Péter 95). Par ailleurs, elle présente un profil de restriction particulier suite à la digestion par Mse I des amplicons de l'intergène *rrf-rrf* (Postic^a 94). VS116 fait alors référence jusqu'en 1997, pour caractériser le groupe du même nom. Parallèlement, la souche M19, isolée aux Pays-Bas, est décrite comme souche de référence caractérisant le groupe M19 (Nohlmans 95). En effet, Nohlmans décrit 12 isolats dont le profil de restriction de l'ARN ressemble, mais n'est pas identique, à celui de *B. garinii*. Ces résultats sont aussi confirmés par une hybridation de l'ADN digéré avec des sondes moléculaires dirigées contre la flagelline. En 1995, Rijpkema démontre que la souche M19 appartient au groupe VS116 (Rijpkema 95). Ses résultats se basent sur une hybridation avec des sondes moléculaires spécifiques aux différentes espèces après amplification de l'espace intergénique *rrf-rrf*. Ce n'est qu'en 1997 que Wang réunit officiellement ces deux groupes sous la dénomination unique de *B. valaisiana* nouvelle espèce (Wang 97). Suite à la digestion de l'amplicon de l'espace intergénique *rrf-rrf* par l'enzyme de restriction Mse I, ces deux groupes présentent le même profil de restriction avec trois bandes de 175, 50 et 23 pdb (Postic^a 94). Par ailleurs, la séquence des amplicons 5S-23S, est identique entre les souches M19 et VS116; elle présente un pourcentage d'homologie situé entre 86.9% et 87.8% avec la séquence des gènes de *B. burgdorferi* ss., *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. japonica*. Le profil de restriction des gènes rARN de *B. valaisiana* présente trois fragments de 6.9, 3.2 et 1.4 kb après digestion avec Eco RV et hybridation avec les sondes moléculaires 16S-23S et quatre fragments de 2.1, 1.2, 0.8 et 0.6 kb après digestion avec HindIII (Wang 97). Une analyse du gène codant pour la sous-unité ribosomique 16S de plusieurs souches de *B. valaisiana* a permis de déterminer une délétion de nucléotides par rapport aux souches B31 de *B. burgdorferi* ss., 20047 de *B. garinii* et VS461 de *B. afzelii* (Wang 97).

A ce jour, le profil protéinique de toutes les souches *B. valaisiana* présente une protéine dominante située entre 32 et 34 kDa qui ne réagit cependant avec aucun des anticorps

monoclonaux spécifiques à l'OspA de *B. burgdorferi* sl. employés habituellement (Péter 92, Wang 97). L'OspB et l'OspC des souches *B. valaisiana* semblent hétérogènes. En effet, non seulement le poids moléculaire de ces deux protéines varie au sein de l'espèce, mais celles-ci présentent aussi des réactions avec les anticorps monoclonaux différentes d'une souche à l'autre (Wang 97). Par ailleurs, une étude menée à Neuchâtel (CH) par Pierre-François Humair a permis de démontrer une association entre les réservoirs naturels que sont les petits mammifères et les différentes souches de *B. burgdorferi* sl.. Ainsi, on retrouve conjointement chez les écureuils (*Sciurus vulgaris*) *B. burgdorferi* ss. et *B. afzelii* tandis que seule *B. afzelii* se retrouve chez les petits rongeurs tels que les mulots et les campagnols. *B. valaisiana*, comme *B. garinii*, sont, quant à elles, principalement observées chez les oiseaux (Humair^a 98, Kurtenbach^a 98).

L'association entre *B. valaisiana* et une espèce spécifique de vecteur ne semble pas se confirmer. En effet, bien que la majorité des souches aient été isolées à partir d'*Ixodes ricinus*, deux isolats proviennent d'*I. persulcatus* et *I. columnae* (Fukunaga^b 96, Fukunaga^c 96, Postic^b 94). Le nombre de nouveaux isolats *B. valaisiana* demeure cependant restreint. On dénombre actuellement une trentaine d'isolats dont 15 en Suisse (Humair^a 98, Péter 92, Péter 95, Postic^a 94), dix aux Pays-Bas (Wang 97), trois en Allemagne, un en Biélorussie (Postic 97) et un en Angleterre (Postic^a 94). Récemment, des isolats de *B. valaisiana* ont été décrits en Corée à partir d'*I. nipponensis* ainsi qu'au Japon et en Chine du Sud à partir, respectivement d'*I. columnae* et *I. granulatus* (Masuzawa 99). De même, deux isolats ont été décrits en Espagne (Escudero 99). En revanche, de nombreux articles décrivent la détection de *B. valaisiana* à travers l'Europe dont la Suisse (Hubalek 97, Humair^a 98, Péter 95, Saint-Girons 98), l'Italie (Cinco 98), la Croatie (Golubic 98, Hubalek 97, Rijpkema 96), la Russie (Postic 97), l'Allemagne (Hubalek 97, Saint-Girons 98), l'Angleterre (Hubalek 97, Kurtenbach^a 98, St-Girons 98), l'Irlande (Hubalek 97, Kirstein 97, Saint-Girons 98) et les Pays-Bas (Hovius 98, Hubalek 97, Nohlmans 95, Rijpkema 96, St-Girons 98).

1.5 Buts de l'étude

Cette thèse se partage en quatre parties.

La première consiste à regrouper et à isoler de nouvelles souches de *B. valaisiana*.

Cette étude comporte, en plus de la récolte des tiques, une évaluation du taux de tiques infectées dans la région de Rarogne et une comparaison de la sensibilité des méthodes de détection.

La deuxième partie de cet ouvrage est consacrée à la description phénotypique et génotypique de *B. valaisiana*. Ce qui comprend une description du profil protéinique de *B. valaisiana* sur électrophorèse bidimensionnelle et la production d'anticorps monoclonaux spécifiques à cette espèce.

Finalement, pour compléter la description de cette bactérie, un système de détection génétique a été développé pour la typisation génétique de *B. valaisiana*.

Le dernier point de cette thèse est l'évaluation du potentiel pathogène de *B. valaisiana* et l'implication clinique de cette espèce dans les stades chroniques de la maladie. Ce qui inclut une étude sérologique de patients présentant une borréliose de Lyme, ainsi que la mise au point, sur des échantillons cliniques, d'une PCR spécifique à *B. valaisiana*.

2. Matériel et méthodes

2.1 Isolements de *Borrelia*

2.1.1 Récolte et dissection des tiques *I. ricinus*

Les tiques ont été récoltées par la méthode du drapeau dans deux biotopes de la région de Rarogne. Avant la dissection, elles ont été trempées dans une solution d'alcool iodé et rincées à l'eau. Les pattes et le rostre ont ensuite été fixés dans la paraffine. La dissection s'est faite dans une goutte de milieu de culture BSK (Sigma, St-Louis MI, USA) sous une loupe binoculaire. Le tube digestif des tiques adultes a été déposé dans une boîte de Pétri contenant 250 μ l de milieu de culture et a été broyé au moyen d'une pince stérile. Une partie de ce broyat a été utilisée pour le frottis nécessaire à l'IF, 50 μ l ont été conservés à -80°C pour une analyse ultérieure par PCR, tandis que le reste a été mis en culture. La dissection des nymphes s'est, quant à elle, limitée au broyage de l'abdomen de la tique dans 250 μ l de milieu de culture.

2.1.2 Culture de *Borrelia* et détection par microscopie à fond noir (MFN)

Le reste du broyat (200 μ l) a été réparti en deux tubes contenant chacun 3 ml de milieu avec antibiotiques (Rifampicin 50 mg/l et Fosfocin 135 mg/l) et fongicide (Fungizone 5 mg/l) avant d'être mis à incuber respectivement à 32°C et à 36°C. Après 10 jours de culture, 2 ml de chaque milieu ont été transférés dans un tube stérile et centrifugés à température ambiante (TA.) pendant 10 min.. à 14'500 g. Le culot a été resuspendu et 10 μ l ont été déposés sur une lame pour contrôle au MFN (400x). Le tube a ensuite été complété avec 1.5 ml de milieu frais sans antibiotique ni fongicide et incubé à nouveau à 32°C ou 36°C. Après 12 jours supplémentaires de culture, les tubes dont l'analyse IF des intestins de tiques a révélé la présence de spirochètes, ainsi que les tubes dont le pH du milieu de culture a viré, ont été contrôlés au MFN. Le milieu a été changé.

2.1.3 Lavage des souches

Pour chaque culture positive, les souches ont été lavées trois fois par centrifugation successive (14'000 g, pendant 15 min.) dans du tampon phosphate (PBS) (0.1 M pH 7.45 + 5 mM $MgCl_2$) et resuspendues dans de l'eau distillée à une concentration protéinique de 1 mg/ml selon la méthode de Biuret. Les spirochètes ainsi lavés ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.1.4 Détection de *Borrelia* à partir de l'intestin des tiques

Détection par Immunofluorescence :

Une partie de l'intestin a été frottée sur une lame de verre et fixée 15 min. à l'acétone. Un sérum humain, servant de contrôle positif et dilué 1/100 dans du PBS contenant 0.05% de sac vitellin, a été déposé sur la lame et incubé 30 min. à TA. dans une chambre humide. Après lavage au PBS (0.1 M pH 7.2), les lames ont été rincées à l'eau et séchées. Le conjugué, un anticorps de chèvre anti-IgG humain marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine et dilué à 0.5% dans du PBS avec 0.05% de bleu d'Evans, a été déposé sur la lame et incubé 30 min. à TA. dans une chambre humide. Après un deuxième lavage de 15 min. avec du PBS, les lames ont été séchées et montées sur lamelles avec du liquide de montage tamponné à pH 7.2. La visualisation des spirochètes a été réalisée au microscope à épifluorescence, avec un grossissement de 400 fois.

Détection par PCR :

La partie de l'intestin des tiques préparée et congelée pour la PCR lors de la dissection a été incubée 60 h à 37°C avant d'être lavée trois fois par centrifugation successive dans du PBS (0.1

M, pH 7.45 + 5 mM MgCl₂) et resuspendue dans 30 µl d'eau distillée. Les échantillons ont ensuite été lysés 10 min. à 95°C avant d'être amplifiés. A 20 µl d'échantillon ont été ajoutés 30 µl de mélange réactionnel constitué de tampon Taq 10x (Eurobio), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 200 µM (Boehringer), amorces I et II (amorce I 5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3', amorce II 5'-TCCTAGGCATTACCATA-3') 64.7 et 77.5 pmoles respectivement et Taq polymérase 1.5 Unités (Eurobio). Les amorces I et II sont spécifiques à l'espace intergénique *rrf-rrl*. Le programme d'amplification décrit par Postic (Postic^a 94) est le suivant : 3 min., 94°C ; suivie de 40 cycles (1 min., 94°C ; 1 min., 55°C ; 1 min., 72°C) ; puis 9 min., 72°C puis 4°C. Le résultat de l'amplification a été visualisé sur gel d'agarose 2% au moyen de bromure d'éthidium.

2.2 Caractérisation phénotypique de *Borrelia burgdorferi* sl.

2.2.1 SDS-Page et Westernblot

Le profil protéinique de tous les isolats a été étudié par mini-électrophorèse (6 cm de long) sur gel d'acrylamide 12.5%. Le chargement des gels d'acrylamide a ensuite été effectué avec 15 µl de souche 1 mg/ml diluée ½ dans du tampon échantillon et lysée 5 min. à 95°C. Les conditions d'électrophorèse ont été fixées à 170 V, limite 42 mA durant 60 min.. Le poids moléculaire des protéines a été défini au moyen de standards traditionnels « low range » (BioRad, Glattbrugg, CH). Les protéines de *Borrelia* ont été transférées à partir des gels d'acrylamide 12.5% sur membrane PVDF (polyvinylidene difluoride membrane, Immobilon, Milipore) pendant 54 min. à 120 V, limite 300 mA.

2.2.2 Caractérisation des bandes protéiniques avec des anticorps monoclonaux

Les membranes contenant les protéines de *Borrelia* ont été colorées au Bleu de Coomassie R-250. La caractérisation des bandes protéiniques s'est faite au moyen des anticorps monoclonaux listés dans la table 2. Les membranes ont été décolorées quelques secondes au méthanol, puis saturées une heure à 37°C dans du tampon tris (TBS) contenant 5% de gélatine. Après trois lavages à TA. Avec du TBS additionné de 0.05% de Tween 20 et de 0.1% de gélatine, les membranes sont incubées avec les anticorps monoclonaux dilués dans du TBS-Tween avec 1% de gélatine pendant deux heures à TA.. Après trois nouveaux lavages, du conjugué de chèvre anti-souris polyvalent, couplé à la phosphatase alcaline, dilué 1/1000 a été ajouté et incubé deux heures à TA.. La réaction est visualisée, après deux lavages au TBS-Tween avec 0.1% de gélatine et un lavage au TBS, au moyen d'un substrat chromogène BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indoyl p toluidine phosphate/p nitro blue tetrazolium chloride).

Table 2

Dilution des anticorps monoclonaux

Monoclonal	Spécificité	Dilution	Reçu de
LA 114 Zs7	93 kDa (Bb sl)	1/1500	Wallich
LA 18	66 kDa (Bb sl)	1/50	Wallich
149	62 kDa (Bb sl)	1/25	Golde
H9724	Flagelline (Bb sl)	1/1000	Barbour
LA 112 Zs7	39 kDa (Bb sl)	1/1000	Wallich
I17.3	OspB (Ba)	1/500000	Canica
H5332	OspA (Bb ss, Bg, Ba)	1/800	Barbour
H3TS	OspA (Bb ss)	1/500	Barbour
A116k	OspA (Bv)	1/500	Ryffel
L22 2B8	OspC (Bb sl)	1/1000	Wilske
LA 82 Zs7	17 kDa (Bg)	1/1500	Wallich
LA 88 Zs7	15 kDa (Bg)	1/1000	Wallich
LA31	Polyclonal (Bb ss)	1/1000	Wallich
D6	12 kDa (Bg)	1/50	Péter

2.2.3 Typisation des isolats par PCR et au moyen d'anticorps monoclonaux

Les souches nouvellement isolées ont été typisées par PCR-RFLP selon la méthode Postic (Postic^a 94) et confirmées par immunoblot au moyen des anticorps monoclonaux H3TS (1/500) (Barbour 88), D6 (1/50) (Péter 92) et I17.3 (1:500000) (Canica 93).

2.2.4 Electrophorèses bidimensionnelles

2.2.4.1 Réhydratation des strips :

Les strips de gradient non linéaire, pH 3.5-10 (Pharmacia, Uppsala-Sweden), ont été fixées dans la chambre de réhydratation avec quelques gouttes d'eau distillée et incubées pendant la nuit à TA. dans une solution composée d'Urée 6 M, Thiourée 2 M, CHAPS 2% p/v, DTE 10 mM, résolytes 2% v/v, pH 3.5-10 et Bleu de bromophénol (traces). A la fin de la réhydratation, les strips ont été nettoyées au moyen d'un papier buvard humidifié avec de l'eau distillée et congelées à -80°C avant leur utilisation pour la 1D.

2.2.4.2 Electrophorèse 1D:

Après l'installation des strips dans la chambre d'électrophorèse, 60 à 100 µl de souches (135 µg) dilués dans du tampon échantillon (Urée 6 M, Thiourée 2 M, CHAPS 4%, Tris 40 mM, DTE 65 mM et Bleu de bromophénol (traces)) ont été chargés du côté cathode. Pour une comparaison optimale des profils de migration, les souches de référence des quatre espèces ont été chargées simultanément lors d'une même électrophorèse. La migration s'effectue à 15°C selon le programme suivant : 0-500 V, 1 min. ; 500 V const., 5 heures ; 500-3500 V, 5 heures ; 3500 V const., 9.5 heures (au total: 19.5 heures à 15°C, 453000 Vxh). A la fin de l'électrophorèse 1D, les strips ont été congelées individuellement dans des boîtes de Pétri.

2.2.4.3 Electrophorèse 2D:

Des gels de 20 cm de longueur ont été coulés avec un gradient de 9 à 16% d'acrylamide-PDA et conservés une nuit à 4°C avant d'y être chargés par les strips. Le jour de l'utilisation, les strips ont été équilibrées 12 min. dans une solution d'équilibration (Urée 6 M, Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, Glycérol 30 % v/v, SDS 2% p/v) additionnée de DTE 2% p/v puis 5 min. dans une solution d'équilibration additionnée d'Iodoacétamide 2.5% p/v et de Bleu de bromophénol (traces). Les

strips ont ensuite été fixées au sommet du gel de polyacrylamide au moyen d'agarose 0.5%. Les conditions de migration ont été fixées à 450 V, 80 mA constant, 50 W durant 4h10.

2.2.4.4 Westernblot :

Les protéines ont été transférées des gels sur membrane PVDF Immobilon (millipore IPVH 00010) par westernblot en courant constant à 90 V à 15°C pendant 3 heures. Les membranes ont ensuite été colorées au Bleu de Coomassie R-250 avant d'être analysées.

2.2.4.5 Détermination des poids moléculaires et des points isoélectriques des protéines :

Afin de déterminer avec précision le poids moléculaire (PM) et le point isoélectrique (PI) des protéines de *Borrelia*, les protéines du plasma humain (12.5 µg) ont été séparées simultanément dans une même électrophorèse avec 90 µg de protéines de *B. valaisiana* (VS116). Les PM et PI des protéines humaines ont servi de référence (Golaz 93). Ainsi une analyse détaillée a permis en premier lieu de déterminer la cartographie du Westernblot *B. valaisiana*-Plasma puis, par analogie, celle de *B. valaisiana* seule. L'identification des protéines a ensuite été confirmée avec les anticorps monoclonaux. La cartographie de *B. valaisiana* a été réalisée au moyen du programme informatique Mélanie (BioRad, Glattbrugg-CH) (Apple 97).

2.2.5 Préparation d'un anticorps monoclonal

2.2.5.1 Préparation de l'antigène :

La souche VS116 a été utilisée pour la production d'un anticorps monoclonal spécifique à *B. valaisiana*. 200 µg de protéines ont été séparés sur gel d'acrylamide 12.5%. Le gel a ensuite été coupé en trois parties égales selon le sens de la migration. Les extrémités ont été colorées au Bleu de Coomassie et employées comme référence pour couper la bande protéinique correspondant à l'OspA de la partie intermédiaire. Cette fraction de gel contenant l'OspA a servi d'antigène lors de l'immunisation in vitro; le reste du gel a été coloré au Bleu de Coomassie afin de confirmer l'extraction de la protéine sélectionnée.

2.2.5.2 Immunisation in vitro :

Le kit ISL (Ready system, Zurzach, AG-CH) a été employé lors de l'immunisation. Une fraction de gel acrylamide estimée à 20 µg d'antigène a été incubée 48 heures avec des cellules de support, fournies par le kit. Une souris a ensuite été sacrifiée et disséquée de façon à préparer la rate. Les splénocytes ont été incubés quatre jours dans le milieu d'immunisation avec les cellules de support pré-immunisées et une nouvelle fraction de gel contenant 20 µg d'antigène a été ajoutée.

2.2.5.3 Fusion :

Une suspension des splénocytes résultant de l'immunisation a été mélangée dans un rapport 1:10, à des cellules myélomateuses fournies dans le kit. Les cellules ont ensuite été fusionnées au moyen de polyéthylène glycol dans un milieu sélectif HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine). Ce milieu permet d'inhiber la croissance des cellules myélomateuses qui n'ont pas été fusionnées. Les hybridomes ont été distribués et cultivés sur des plaques multi-puits (96 puits).

2.2.5.4 Analyse systématique des sumageants :

Quatre jours après la fusion, les sumageants des plaques multi-puits ont été évalués par ELISA. La spécificité des anticorps dirigés contre *Borrelia* a été confirmée par un immunoblot dirigé contre quatre espèces. Les hybridomes produisant des anticorps spécifiques de *B. valaisiana* ont alors été clonés en répartissant les cellules par dilutions sérielles.

2.2.5.5 Détermination des isotypes :

Les anticorps monoclonaux ont été typisés par immunoblot au moyen d'anticorps de lapin spécifiques contre différents isotypes d'immunoglobulines de souris couplés à la peroxydase.

2.2.6 ELISA

La concentration des isolats VS215 (*B. burgdorferi* ss.), VS102 (*B. garinii*), VS461 (*B. afzelii*) et VS116 (*B. valaisiana*) a été ajustée à 10 µg/ml. Chaque souche a été lysée avec 0.5% SDS puis chauffée 5 min. à 37°C et 15 min. à 95°C. Les quatre souches, diluées dans du tampon carbonate (Na₂CO₃, 0.1 M, pH 9.6), ont été ensuite fixées sur les plaques ELISA à 4°C pendant la nuit. Les plaques ont été lavées quatre fois dans du PBS-T (PBS + 0.01% Tween 20) et saturées une heure avec de l'albumine sérique bovine 1% dans du PBS avant d'être lavées à nouveau quatre fois. Les surnageants des hybridomes ont alors été dilués 1/3 dans du PBS-T filtré à 0.2 µm et distribués dans les plaques. Après une heure d'incubation, les plaques ont été lavées. Les anticorps ont été détectés au moyen d'un conjugué de chèvre polyvalent anti-souris lié à la phosphatase alcaline et dilué 1/1000 dans du PBS-T filtré. L'incubation de ce conjugué a duré deux heures à 37°C. Après quatre lavages, le substrat (para-nitrophenylphosphate, Virion) a été ajouté aux plaques qui ont été incubées 15 min. à TA. Les densités optiques ont été mesurées à 405 nm avec une référence à 620 nm.

2.3 Caractérisation génétique de *Borrelia valaisiana*

2.3.1 Purification de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir d'1.5 ml de culture. Les spirochètes ont été lavés deux fois dans du PBS pH 7.2 avec MgCl₂ (0.005 M) par centrifugations successives. L'ADN a ensuite été extrait en suivant le protocole de Dynal (Etten-Leur, Pays-Bas) par séparation bio magnétique et élué dans 30 µl de tampon (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, 1 mM EDTA) avant d'être conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.3.2 Caractérisation des souches

La caractérisation génétique des souches s'est faite principalement par PCR-RFLP selon la méthode décrite par Postic (Postic^a 94). Après amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl*, une digestion enzymatique à 37°C par les enzymes de restriction *Mse* I et *Dra* I a permis de caractériser les différentes souches de *Borrelia*. La caractérisation s'est faite en fonction du profil de migration des fragments de DNA sur gel d'acrylamide 16%, 3 heures à 100 V.

La PCR décrite par Demaerschalk (Demaerschalk 95) a aussi été utilisée pour la typisation génétique des différentes espèces. Elle permet au moyen de trois amorces spécifiques d'amplifier le gène *ospA* des souches *B. burgdorferi* ss., *B. garinii* et *B. afzelii* et *B. valaisiana*. La détection se fait alors sur gel agarose 2% au moyen de bromure d'éthidium.

La séquence des différentes amorces se trouve dans la table 5, point 2.4.3.3.

2.3.3 Liste des isolats *Borrelia valaisiana* et de leurs provenances

La liste des isolats *B. valaisiana* à disposition pour cette étude est regroupée dans la table 3.

Table 3

Liste des souches *B. valaisiana*

Isolat	Origine géographique de l'isolat	Origine biologique de l'isolat	Reçu de
VS116	Suisse - VS	tique <i>I. ricinus</i>	Isolée à Sion
VS732	Suisse - VS	tique <i>I. ricinus</i>	Isolée à Sion
AG1	Suisse - AG	tique <i>I. ricinus</i>	I. Heinzer
NE168	Suisse - NE	nymphé <i>I. ricinus</i>	P.F. Humair
NE218	Suisse - NE	biopsie de peau <i>Turdus merula</i>	P.F. Humair
NE223	Suisse - NE	aspiration de peau <i>Turdus merula</i>	P.F. Humair
NE224	Suisse - NE	biopsie de peau <i>Turdus merula</i>	P.F. Humair
NE225	Suisse - NE	biopsie de peau <i>Turdus merula</i>	P.F. Humair
NE226	Suisse - NE	larve <i>I. ricinus</i> *	P.F. Humair
NE229	Suisse - NE	larve <i>I. ricinus</i> *	P.F. Humair
NE230	Suisse - NE	larve <i>I. ricinus</i> *	P.F. Humair
NE231	Suisse - NE	larve <i>I. ricinus</i> *	P.F. Humair
NE248	Suisse - NE	nymphé <i>I. ricinus</i> *	P.F. Humair
NE253	Suisse - NE	larve <i>I. ricinus</i> *	P.F. Humair
Frank	Allemagne	tique <i>I. ricinus</i>	M.M.Wittenbrink
F.10.8.94	Allemagne	tique <i>I. ricinus</i>	M.M.Wittenbrink
Z.6.11.93	Allemagne	tique <i>I. ricinus</i>	M.M.Wittenbrink
M7	Pays-Bas	tique <i>I. ricinus</i>	A.P. van Dam
M19	Pays-Bas	tique <i>I. ricinus</i>	A.P. van Dam
M52	Pays-Bas	tique <i>I. ricinus</i>	A.P. van Dam
M53	Pays-Bas	tique <i>I. ricinus</i>	A.P. van Dam
M57	Pays-Bas	tique <i>I. ricinus</i>	A.P. van Dam
AR-2	Pays-Bas	tique <i>I. ricinus</i>	S.G. Rijpkema
UK	Angleterre	tique <i>I. ricinus</i>	S.J. Cutler

* de xénodiagnose, gorgée sur *Turdus merula*

2.3.4 Séquençage des produits d'amplification

Durant l'amplification, de la biotine a été introduite sur un des brins au moyen d'une amorce biotinilée en 5'. Les amorces fD3 et UniB dirigées contre le gène *rrs* ont été employées pour la PCR. Le volume final du mélange réactionnel était de 50 µl et comprenait 5 µl d'ADN, 10 mM de Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01 % de gélatine, 200 mM de dNTP, 1.25 U de Taq DNA polymérase (Amersham), 0.5 µM d'amorce biotinilée et 1 µM de seconde amorce. Le mélange a été recouvert d'huile et l'amplification a été réalisée aux conditions suivantes : 35 cycles (1 min., 93°C ; 1 min., 50°C ; 1 min., 72°C) puis 9 min., 72°C.

La présence de l'ADN de *B. burgdorferi* sl. a été observée sur gel d'agarose 0.8% dans du TBE 1x coloré au bromure d'éthidium.

Le produit d'amplification a ensuite été immobilisé grâce à la biotine et à la streptavidine selon le protocole du kit Dynal. Les fragments d'ADN ont ensuite été séparés dans une solution de NaOH 0.1 M puis élués dans 12 µl d'eau.

Le gène *rrs* a ensuite été séquençé aux conditions suivantes : 10 min. à 65°C, 20 à 37°C puis refroidi 10 min. à TA. Dans une seconde étape, de la T7 ADN polymérase (3U) a été ajoutée à la

réaction. La séquence des fragments amplifiés a ensuite été déterminée sur gel polyacrylamide au moyen du kit « Cy5-Autoread sequencing » (Pharmacia, Uppsala-Sweden). Chaque brin de chaque échantillon a été séquencé au minimum deux fois.

2.3.5 Alignement des séquences et analyse phylogénétique

Les séquences ont été alignées selon la méthode manuelle au moyen du programme VSM V.2.0 de B. Lafay et R. Christen (Ruimy 94) ainsi qu'en utilisant le programme d'alignement des séquences Clustal V (Higgins 89).

Les rapports phylogénétiques ont été établis sur la base de trois méthodes dont les résultats ont ensuite été comparés (Saitou 87, Swofford 92, Felsenstein 89, Kumar 93). Les arbres phylogénétiques ont alors été construits selon la méthode « neighbor joining » (Saitou 87). Les séquences obtenues de *B. valaisiana* et *B. lusitaniae* ont ensuite été comparées aux autres séquences de *B. burgdorferi* sl..

2.3.6 Séquence nucléotidique

Table 4

Les séquences ADN 16S ont été déposées sur la banque de données Genbank sous les numéros suivants :

<i>B. valaisiana</i>	VS116	X98232
	UK	X98233
<i>B. lusitaniae</i>	PotiB1	X98226
	PotiB2	X98228
	PotiB3	X98229
	IR345	X98230
	BR45	X98231

2.3.7 Analyse RFLP

Les amorces fD3 et T50 ont été utilisées pour amplifier le gène *rrs* des spirochètes (Marti 96). Les PCR ont été réalisées selon les conditions suivantes : Le volume final du mélange réactionnel était de 50 µl contenant 5 µl d'ADN, 10 mM de Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂ , 50 mM KCl, 0.01 % de gélatine, 200 mM de dNTP. 1.25 U de Taq DNA polymérase (Amersham), 1 µM d'amorces. Le mélange a été recouvert d'huile et l'amplification a été réalisée aux conditions suivantes : 30 cycles (1 min., 93°C ; 1 min., 54°C ; 1 min., 72°C) puis 9 min., 72°C. Le produit résultant de l'amplification (10µl) a été digéré avec l'enzyme de restriction *Bfa* I (Biolabs, New England), puis migré sur gel d'agarose 1.8% pendant 2 h à 120 V, dans du TBE 1x.

2.4 Diagnostic et évaluation des échantillons cliniques

2.4.1 Analyse sérologique des échantillons cliniques

Les sera des patients avec une suspicion de borréliose de Lyme ont été testés par un ELISA (IgG+IgM) commercial (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Les résultats positifs ont été confirmés par immunoblot selon la méthode décrite aux points 2.2.1 et 2.2.2. Les sera dilués 1/200 ont été incubés deux heures à TA. Après trois lavages, du conjugué anti-IgG ou anti-IgM humain dilué 1/1000 et couplé à la phosphatase alcaline a été ajouté et incubé. La réaction a été visualisée au moyen du substrat BCIP/NBT, selon la méthode décrite au point 2.2.2. Les critères de positivité de l'immunoblot IgG sont les suivants : 5 bandes visibles dont 3 appartenant aux bandes spécifiques suivantes (93 kDa, Flagelline, 39 kDa, OspA et OspC). Les critères de positivité de l'immunoblot

IgM sont les suivants : 4 bandes visibles dont 2 appartenant aux bandes spécifiques suivantes (93 kDa, Flagelline, 39 kDa, OspA et OspC). Il s'agit généralement de la Flagelline et de l'OspC.

2.4.2 Immunoblot quatre espèces (*B. burgdorferi* ss., *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. valaisiana*) avec des sera de patients atteints de borréliose de Lyme

Des sera de patients présentant un diagnostic clinique de borréliose de Lyme et un test de screening positif confirmé par immunoblot ont été collectés. Les sera de patients présentant plusieurs symptômes ont été exclus de l'étude. La synthèse intrathécale de tous les sera de patients avec une neuroborréliose a été positive. Le calcul de l'index intrathécal a été calculé de la façon suivante : IgG du LCR/sérum sur albumine du LCR/sérum (valeur du cut off 2.0).

Des membranes contenant chacune une des quatre espèces ont été réalisées selon la méthode décrite au point 2.2.1. puis coupées en bandelettes de 3 mm d'épaisseur. Les sera de patients avec une borréliose de Lyme ont alors été incubés selon la méthode décrite au point 2.2.2. Les sera ont été dilués 1/500 dans du TBS-Tween avec 1% de gélatine ont été incubés deux heures à TA. Après trois lavages, du conjugué anti-IgG humain dilué 1/1000 a été ajouté et incubé pendant deux heures. La réaction a été visualisée au moyen du substrat BCIP/NBT, selon la méthode décrite au point 2.2.2.

2.4.3 Typisation génétique des *Borrelia* présentes dans les échantillons cliniques

2.4.3.1 Préparation des liquides articulaires

Les liquides articulaires ont été centrifugés 20 min. à 10'000 g. Après trois lavages dans une solution de PBS stérile (0.1 M, pH 7.2), le culot a été resuspendu dans de l'eau bidistillée (environ 80 µl). Au moment de l'amplification, les échantillons ont été lysés 20 min. à 95°C, puis conservés sur glace.

2.4.3.2 Préparation des biopsies

Les biopsies ont été digérées pendant la nuit à 55°C, sous agitation périodique, avec la protéinase K (1.5 mg de protéinase, diluée dans du tampon ATL, pour 100 mg de biopsie). L'extraction de l'ADN s'est faite selon le protocole « QIA amp tissue kit » (QIAGEN, Bâle, CH).

2.4.3.3 PCR sur des échantillons cliniques

Des amorces reconnaissant les séquences du gène *ospA* de la plupart des souches *B. burgdorferi* sl. (Demaerschalk 95) ont été employées pour tester 19 biopsies et 46 ponctions de patients avec une suspicion clinique de borréliose de Lyme. Pour optimiser la détection de *B. valaisiana*, les amorces spécifiques à cette espèce ont été employées conjointement lors de la même réaction. Chaque amorce, resuspendue dans 1 ml de tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7.5, filtré), a été utilisée à une concentration finale de 20 pmoles par réaction d'amplification (50 µl). L'amplification de chaque échantillon (10 µl) s'est faite dans le tampon Taq PCR Master Mix (Taq DNA polymérase 2.5 U, tampon 1x, dNTP 200 µM), (Qiagen, Bâle, CH) aux conditions suivantes : 3 min., 94°C suivi de 40 cycles (1 min., 60°C ; 1 min., 72°C ; 1 min., 94°C) puis 1 min., 60°C ; 7 min., 72°C.

La présence de l'ADN de *B. burgdorferi* sl. a été observée sur gel d'agarose 2%. La spécificité de la réaction a été confirmée par hybridation selon la méthode décrite par Mansy (Mansy 96). Chaque échantillon positif a ensuite été testé indépendamment avec les amorces *B. valaisiana*.

Table 5

Séquence des amorces et des sondes nécessaires à la réalisation des tests PCR.

	Séquence 5'----3'
Amorces <i>B. burgdorferi</i> sl. (<i>B. burgdorferi</i> ss., <i>B. garinii</i> et <i>B. afzelii</i>)	<u>21-47</u> AATAGGTCTAATAATAGCCTTAATAGC <u>328-302</u> CTAGTGTTTTGCCATCTTCTTTGAAAA
Amorces GI (<i>B. burgdorferi</i> ss.)	<u>139-165</u> AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT <u>682-655</u> TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC
Amorces GII (<i>B. garinii</i>)	<u>201-224</u> TGATAAAAAC AACGGTTCTTG GAAC <u>545-522</u> GTAACTTTCAATGTTGTTTTGCCG
Amorces GIII (<i>B. afzelii</i>)	<u>347-374</u> TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATG <u>536-508</u> TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTACTT
Amorces <i>B. valaisiana</i>	<u>453-476</u> TGCTGAAAATGCTACAAAAGCAGT <u>721-696</u> CAAGACAAAACCTGTATTTACAAAAC
Amorces I et II (<i>B. burgdorferi</i> sl.) (Postic ^a 94)	CTGCGAGTTCGCGGGGAGA TCCTAGGCATTCACCATA
Oligonucléotide de capture	GCATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGA
Sonde biotinilée (Wang 97)	GGGAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTC

2.4.3.4 Hybridation des amplicons

La spécificité de l'amplification a été confirmée par hybridation selon la méthode décrite par Mansy (Mansy 96).

Cette hybridation a été réalisée au moyen d'un oligonucléotide de capture fixé de façon covalente à la surface d'une microplaque. L'ADN hybridé est alors reconnu par une sonde biotinilée. Les séquences des oligonucléotides et des sondes sont décrites dans la table 5.

Brièvement, 12.5 µl d'échantillon ont été dénaturés 10 min avec 50 µl de NaOH 0.25 M. Le produit dénaturé a ensuite été dilué dans du tampon-Tris (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 1M, MgCl₂ 2 mM, triton X-100 0.05%, pH 7.5) contenant 5% de lait écrémé, 0.2 M d'acide acétique et 4 pmoles de sondes et incubé, 90 min à 37°C, dans des microplaques tempérées et préalablement lavées au tampon-Tris contenant 5% de lait écrémé. A la fin de la période d'incubation, les plaques ont été lavées cinq fois au tampon-Tris avec 5% de lait écrémé. 100 µl de conjugué couplé à la peroxidase (Dako, Copenhague, Danemark) et dilué 1/1000 dans du tampon-Tris contenant 3% d'albumine sérique bovine a été ensuite ajouté à chaque puits. Après 30 min d'incubation à TA., cinq nouveaux lavages ont été réalisés avec du tampon-Tris. 200 µl de substrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) a été ajouté dans chaque puits et incubé 15 min dans l'obscurité. La lecture de la densité optique a été mesurée à 450 nm, après que la réaction ait été stoppée avec 100 µl d'acide sulfurique 5%. Chaque échantillon positif a ensuite été testé indépendamment avec les amorces *B. valaisiana*.

3. Résultats

3.1 Comparaison de trois méthodes de détection de *Borrelia* chez les tiques

Introduction

Les tiques du complexe *Ixodes ricinus* sont les principaux vecteurs des spirochètes *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl.), responsables de la Borréliose de Lyme. En Suisse, quatre espèces sont actuellement connues : *B. burgdorferi* sensu stricto (ss.), *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. valaisiana*. Isolée pour la première fois à partir d'une tique *I. ricinus*, dans un biotope de la région de Rarogne, en Valais (CH), la souche VS116 est considérée comme la souche de référence de l'espèce *B. valaisiana* (Péter 92, Péter 95, Wang 97). Contrairement aux premières apparences, l'association entre *B. valaisiana* et une espèce spécifique de vecteur ne semble pas se confirmer. En effet, bien que la majorité des souches ait été isolée à partir d'*I. ricinus*, deux isolats proviennent d'*I. persulcatus* et *I. columnae* (Postic^b 94, Fukunaga 96). Le nombre de nouveaux isolats *B. valaisiana* demeure cependant restreint. On en dénombre actuellement une trentaine, dont 15 en Suisse (Péter 92, Humair 98, Postic^a 94), dix aux Pays-Bas (Wang 97), trois en Allemagne, un en Biélorussie (Postic 97), une en Angleterre (Postic^a 94) et deux en Espagne (Escudero 99). Récemment, des isolats de *B. valaisiana* ont aussi été décrits en Corée à partir d'*I. nipponensis* ainsi qu'au Japon et en Chine du Sud à partir, respectivement d'*I. columnae* et *I. granulatus* (Masuzawa 99).

Alors que la caractérisation des souches se base généralement sur l'isolation des spirochètes, l'infection d'une tique par *Borrelia* peut être mise en évidence par différentes méthodes. En effet, d'autres techniques permettent d'obtenir une meilleure sensibilité. La détection de *B. burgdorferi* sl. peut ainsi se faire par observation au microscope sur fond noir (MFN) ou par immunofluorescence directe et indirecte (IF), qui consiste à visualiser les spirochètes dans un frottis fixé sur une lame à l'aide d'anticorps spécifiques fluorescents. Ces méthodes sont peu coûteuses et permettent de détecter les spirochètes avec une bonne sensibilité (Péter 95, Gilot 96, Kahl 98, Hubalek 98, Zeman 98). Parallèlement à l'IF, la PCR est une méthode couramment employée. Après extraction de l'ADN, des fragments sont amplifiés et visualisés sur gel d'agarose avec du bromure d'éthidium (Persing 90).

Dans le but d'obtenir d'autres isolats *B. valaisiana*, nous avons effectué une nouvelle collecte de tiques dans la région de Rarogne. Le pourcentage de tiques infectées dans cette région a été évalué selon trois méthodes de détection (Immunofluorescence (IF), culture et PCR). Une comparaison de la sensibilité de ces trois méthodes est décrite dans ce chapitre.

Matériel et Méthodes

Récolte et dissection des tiques *I. ricinus*

Les tiques ont été récoltées par la méthode du drapeau dans deux biotopes de la région de Rarogne. Avant la dissection, elles ont été trempées dans une solution d'alcool iodé et rincées à l'eau. Les pattes et le rostre ont ensuite été fixés dans la paraffine. La dissection s'est faite dans une goutte de milieu de culture BSK (Barbour-Stoener-Kelly) (Sigma, St-Louis Mi, USA) sous une loupe binoculaire. Le tube digestif des tiques adultes a été déposé dans une boîte de Pétri contenant 250 µl de milieu de culture et a été broyé au moyen d'une pince stérile. Une partie de ce broyat a été utilisée pour le frottis nécessaire à l'IF, 50 µl ont été conservés à -80°C pour une analyse ultérieure par PCR, tandis que le reste a été mis en culture. La dissection des nymphes s'est, quant à elle, limitée au broyage de l'abdomen de la tique dans 250 µl de milieu de culture.

Culture de *Borrelia* et détection par microscopie à fond noir (MFN)

Le reste du broyat (200 µl) a été réparti en deux tubes contenant chacun 3 ml de milieu avec antibiotiques (Rifampicin 50 mg/l et Fosfocin 135 mg/l) et fongicide (Fungizone 5 mg/l) avant d'être mis à incuber respectivement à 32°C et à 36°C. Après 10 jours de culture, 2 ml de chaque milieu ont été transférés dans un eppendorf stérile et centrifugés à température ambiante (TA.) pendant 10 min. à 14'500 g. Le culot a été resuspendu et 10 µl ont été déposés sur une lame pour contrôle au MFN (400x). Le tube eppendorf a ensuite été complété avec 1.5 ml de milieu frais sans antibiotique ni fongicide et incubé à nouveau à 32°C ou 36°C. Après 12 jours supplémentaires de culture, les tubes dont l'analyse IF des intestins de tiques a révélé la présence de spirochètes, ainsi que les tubes dont le pH du milieu de culture a viré, ont été contrôlés au MFN. Le milieu a été changé.

Détection par Immunofluorescence :

Une partie de l'intestin a été frottée sur une lame de verre et fixée 15 min. à l'acétone. Un sérum humain, servant de contrôle positif et dilué 1/100 dans du PBS contenant 0.05% de sac vitellin, a été déposé sur la lame et incubé 30 min. à TA. dans une chambre humide. Après lavage au PBS (0.1 M pH 7.2), les lames ont été rincées à l'eau et séchées. Le conjugué, un anticorps de chèvre anti-IgG humain, marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine et dilué à 0.5% dans du PBS avec 0.05% de bleu d'Evans, a été déposé sur la lame et incubé 30 min. à TA. dans une chambre humide. Après un deuxième lavage de 15 min. avec du PBS, les lames ont été séchées et montées sur lamelles avec du liquide de montage tamponné à pH 7.2. La visualisation des spirochètes a été réalisée au microscope à épifluorescence, avec un grossissement de 400 fois.

Détection par PCR :

La partie de l'intestin des tiques préparée dans du milieu de culture et congelée pour la PCR lors de la dissection a été incubée 60 h à 37°C avant d'être lavée trois fois par centrifugation successive dans du PBS (0.1 M, pH 7.45 + 5 mM MgCl₂) et resuspendue dans 30 µl d'eau distillée. Les échantillons ont ensuite été lysés 10 min. à 95°C avant d'être amplifiés. A 20 µl d'échantillon ont été ajoutés 30 µl de mélange réactionnel constitué de tampon Taq 10x (Eurobio), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 200 µM (Boehringer), amorces I et II (amorce I 5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3', amorce II 5'-TCCTAGGCATTACCATTA-3') 64.7 et 77.5 pmoles respectivement et Taq polymérase 1.5 Unités (Eurobio). Les amorces I et II sont spécifiques aux gènes ribosomiques *rrl* et *rrf* codant respectivement les sous-unités 5S et 23S de *B. burgdorferi* sl.. Le programme d'amplification décrit par Postic (Postic^a 94) est le suivant : 3 min., 94°C ; suivie de 40 cycles (1 min., 94°C ; 1 min., 55°C ; 1 min., 72°C) ; puis 9 min., 72°C puis 4°C. Le résultat de l'amplification a été visualisé sur gel d'agarose 2% au moyen de bromure d'éthidium.

Préparation des souches

Pour chaque culture positive, les souches ont été lavées trois fois par centrifugation successive (14'000 g, pendant 15 min.) dans du tampon phosphate (PBS) (0.1 M pH 7.45 + 5 mM MgCl₂) et resuspendues dans de l'eau distillée à une concentration protéinique de 1 mg/ml selon la méthode de Biuret. Les spirochètes ainsi lavés ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Typisation des isolats par PCR et au moyen d'anticorps monoclonaux

Les souches nouvellement isolées ont été typisées par PCR-RFLP selon la méthode Postic (Postic^a 94) et confirmées par immunoblot au moyen des anticorps monoclonaux H3TS (1/500) (Barbour 88), D6 (1/50) (Péter 92) et I17.3 (1:500000) (Canica 93).

Résultats

La récolte au drapeau dans la région de Rarogne-VS a permis de recueillir 89 tiques (32 femelles, 46 mâles et 11 nymphes). La recherche d'une infection à *Borrelia* dans l'intestin des tiques a été réalisée par trois méthodes de détection en parallèle: l'IF, la culture et la PCR. Afin d'augmenter la sensibilité de la PCR, une courte incubation des échantillons dans du milieu de culture a été réalisée avant d'effectuer l'amplification. Les résultats sont décrits dans la table 1. Le pourcentage de tiques infectées par *Borrelia* est de 42% en cumulant les résultats positifs des trois méthodes. Respectivement, les pourcentages de femelles, mâles et nymphes infectées sont de 50% (16/32), 35% (16/46) et 45% (5/11). Les pourcentages de détection sont respectivement de 24% (21/89) pour la PCR, 20% (18/89) pour l'IF et de 15% (13/89) pour la culture. La sensibilité de l'IF, la culture et la PCR est décrite dans la table 2. Elle est définie en regroupant les résultats positifs (37 tiques) des trois méthodes. La PCR présente la plus grande sensibilité (57%), suivie par l'IF (49%) et la culture (35%). Il est cependant à noter que la sensibilité de la PCR varie en fonction de la taille de la tique. En effet, 81% des échantillons de femelles positifs et 50% de ceux des mâles positifs ont été détectés par PCR, tandis qu'aucune préparation de nymphe n'était positive. L'analyse RFLP du produit d'amplification de deux échantillons positifs a été possible et a permis de caractériser, dans le premier cas, une infection par *B. garinii*, et dans le second, une infection mixte par *B. garinii* et *B. afzelii*. Un trop fort bruit de fond et une mauvaise manipulation des échantillons ont rendu impossible la lecture de la digestion enzymatique par *Mse* I des autres amplicons (Postic^a 94). Parmi les 37 tiques infectées par *Borrelia*, seules cinq souches ont été isolées, bien que 13 cultures aient présenté des résultats positifs au MFN. La caractérisation de ces souches s'est faite par digestion enzymatique d'amplicons (Postic^a 94) et au moyen d'anticorps monoclonaux (H3TS, D6, A116k et I17.3). Parmi ces cinq isolats, deux ont été caractérisés comme appartenant à l'espèce *B. garinii* (VS704 et VS711), un comme *B. valaisiana* (VS732), un comme *B. burgdorferi* ss. (VS753) et un comme *B. afzelii* (VS780). La faible quantité d'isolats obtenus ne nous permet pas de tirer de conclusions sur la température idéale de croissance des différentes espèces de *Borrelia*. Elle semble cependant se situer préférentiellement à 32°C pour *B. garinii* et *B. valaisiana*.

Table 1

Résultats de l'analyse des tiques récoltées à Rarogne par IF, culture et PCR

Sexe	IF	Culture		Isolat	PCR	Caractérisation
		32°C	36°C			
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	-	-	-	Positif	-
femelle	-	Positif *	-	-	-	-
femelle	Positif	-	-	-	Positif	-
femelle	Positif	-	-	-	-	-
femelle	Positif	Positif *	-	B. garinii (VS704)	Positif	B. garinii
femelle	Positif	Positif **	-	-	Positif	-
femelle	Positif	Positif **	-	-	-	-
femelle	Positif	Positif °	Positif °	B. burgdorferi ss. (VS753)	Positif	-
femelle	Positif	Positif °	-	-	Positif	-
mâle	-	-	-	-	Positif	B. afzelii/ B. garinii
mâle	-	-	-	-	Positif	-
mâle	-	-	-	-	Positif	-
mâle	-	-	-	-	Positif	-
mâle	-	-	-	-	Positif	-
mâle	-	Positif *	-	B. garinii (VS711)	-	-
mâle	-	Positif *	-	B. valaisiana (VS732)	-	-
mâle	Positif	-	-	-	-	-
mâle	Positif	-	-	-	-	-
mâle	Positif	-	Positif **	-	-	-
mâle	Positif	-	-	-	-	-
mâle	Positif	-	-	-	-	-
mâle	Positif	-	Positif °	-	Positif	-
mâle	Positif	Positif **	-	-	-	-
nymph	-	Positif **	-	-	-	-
nymph	Positif	-	-	-	-	-
nymph	Positif	-	-	-	-	-
nymph	Positif	-	-	-	-	-
nymph	Positif	Positif **	-	B. afzelii (VS780)	-	-

° Spirochètes visibles au MFN après 10 jours de culture

* Spirochètes visibles au MFN après 3 semaines de culture

** Spirochètes visibles au MFN après 6 semaines de culture

Table 2
Sensibilité (%) des trois méthodes de détection

Tiques positives	IF		Culture		PCR	
	Nbre positif	(%)	Nbre positif	(%)	Nbre positif	(%)
Femelles (n=16)	7	(44)	6	(38)	13	(81)
Mâles (n=16)	7	(44)	5	(31)	8	(50)
Nymphes (n=5)	4	(80)	2	(40)	0	(0)

Discussion

La mise en culture des échantillons de tiques, récoltées dans la région de Rarogne, a présenté un taux d'isolement de 15% (13/89). Ce pourcentage d'isolement est comparable à celui obtenu par Péter (Péter 95). En effet, lors d'une étude similaire, réalisée à partir de tiques récoltées dans la même région, le pourcentage d'isollements décrit était de 5%. Ces résultats pourraient cependant être améliorés par modification du milieu de culture en remplaçant le sérum de lapin par celui de cheval (Wittenbrink 96) ou encore avec adjonction de suppléments (Wittenbrink 94). Alors que cette étude a permis d'obtenir un isolat *B. valaisiana* (VS732), ainsi que deux isolats *B. garinii* (VS704 et VS711), un *B. burgdorferi* ss. (VS753) et un *B. afzelii* (VS780), le taux de répartition des espèces ne correspond pas aux résultats publiés par Péter, à partir de tiques récoltées dans le même biotope et cultivées dans le même milieu (Péter 95). En effet, en 1995, Péter décrit *B. burgdorferi* ss. comme étant la souche prédominante (26/50), suivie par *B. garinii* (19/50), *B. afzelii* (3/50) et le groupe VS116, correspondant à *B. valaisiana* (2/50). Il se peut que cette différence, bien que basée sur peu d'isolats, soit représentative de l'influence des conditions de culture sur le développement des différentes espèces. Dans cette étude, la mise en culture s'est faite à deux températures distinctes dans le but de déterminer la température préférentielle de croissance de chaque espèce. Cette hypothèse pourrait en partie expliquer l'association de chaque espèce avec des hôtes particuliers. Humair a, en effet, démontré une prédominance de *B. afzelii* chez les rongeurs et de *B. garinii* et *B. valaisiana* chez les oiseaux (Humair 98). Malheureusement la faible quantité d'isolats nous impose une réserve pour toute conclusion quant au rôle joué par la température dans cette association. D'autre part, quelques auteurs ont décrit une activité bactéricide du complément de certains hôtes sur différentes espèces de *Borrelia*. Il a en effet été démontré que le complément du sérum de certains rongeurs présentait un effet bactéricide sur *B. garinii* qui n'influence cependant pas le développement de *B. afzelii* (Sewell 99). Ainsi, la sensibilité des différentes espèces face à l'hôte serait aussi responsable d'une partie des associations observées entre les différentes espèces de *Borrelia* et les hôtes.

La recherche d'une infection de *Borrelia* dans l'intestin des tiques, réalisée par PCR, IF et culture, confirme la sensibilité plus élevée de la méthode génique. Les pourcentages de détection sont respectivement de 24% (21/89) pour la PCR, 20% (18/89) pour l'IF et de 15% (13/89) pour la culture. Ces valeurs sont comparables à celles décrites précédemment (Péter 95, Hubalek 98). Les résultats de la PCR auraient cependant pu être améliorés en évitant la congélation des échantillons avant leur lyse et leur amplification. D'autre part, il est à noter que la sensibilité de la méthode PCR varie considérablement en fonction de la taille de la tique. La sensibilité sur les intestins de tiques est de 81% chez les femelles et 50% chez les mâles, tandis qu'aucune amplification n'a été observée sur les préparations de nymphes. Il se peut qu'une partie du contenu de l'abdomen, inclu dans les échantillons des nymphes, soit inhibiteur de la PCR. En effet, contrairement à la tique adulte où seul l'intestin était prélevé, lors de la dissection l'ensemble des organes de la nymphe a été prélevé pour la préparation d'un broyât homogène.

Quoiqu'il en soit, ces résultats confirment ceux de Kahl (Kahl 98) sur la plus haute sensibilité de l'IF dans la détection des spirochètes chez les nymphes. L'analyse des résultats d'IF et de la culture sont, en effet, constants entre les adultes et les nymphes. Il est toutefois à relever que le pourcentage de détection par IF des nymphes positives (4/11) est peut-être surfait dans cette étude et cache de faux positifs. Une partie du contenu de l'abdomen, inclus dans les échantillons, fluoresce et rend par ce fait la lecture de l'IF plus délicate.

Bibliographie

1. Escudero R., M. Barral, A. Hernandez, I. Rodriguez, A. Garcia-Pérez, S. Jimenez, R. Sellek, P. Anda. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated in Spain. 1999. VIII ICLB, Munich, Germany, Oral presentation O9.
2. Fukunaga M., A. Hamase, K. Okada, H. Inoue, Y. Tsuruta, K. Miyamoto, and M. Nakao. Characterization of spirochetes isolated from ticks (*Ixodes tanuki*, *Ixodes turdus*, and *Ixodes columnae*) and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2338-2344.
3. Gilot B., B. Degeilh, J. Pichot, B. Doche, and C. Guiguen. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) in *Ixodes ricinus* (L.) populations in France, according to a phytoecological zoning of the territory. 1996. Eur. J. Epidemiol. 12 : 395-401.
4. Hubalek Z., and J. Halouzka. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. 1998. Parasitol. Res. 84 : 167-172.
5. Humair, P.F., D. Postic, R. Wallich, and L. Gern. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. 1998. Zentralbl. Bakteriол. 287: 521-538.
6. Kahl O., L. Gern, J.S. Gray, E.C. Guy, F. Jongejan, F. Kirstein, K. Kurtenbach, S.G. Rijpkema, and G. Stanek. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks immunofluorescence assay versus polymerase chain reaction. 1998. Zentralbl. Bakteriол. 287 : 205-210.
7. Masuzawa T., N. Takada, Y. Imai, and Y. Yanagihara. Molecular epidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the East Asia. 1999. VIII ICLB, Munich, Germany, Oral presentation O5.
8. Persing D.H., S.R. Telford, A. Spielman, and S.W. Barthold. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. 1990. J. Clin. Microbiol. 28 : 566-572.
9. Péter O. and A.G. Bretz. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. 1992. Zentralbl. Bakteriол. 277: p. 28-33.
10. Péter, O., A.G. Bretz, and D. Bee. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. 1995. Eur. J. Epidemiol. 11: p. 463-7.
11. Postic^a, D., M.V. Assous, P.A. Grimont, and G. Baranton. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. 1994. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: p. 743-752.
12. Postic^b D., and G. Baranton. Molecular fingerprinting and phylogeny of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 1994. In Yanagihara Y. and Masuzawa T. (ed), Proceedings of the international symposium on Lyme disease in Japan, Shizuoka, Japan. p. 133-147.
13. Postic D., E. Korenberg, N. Gorelova, Y.V. Kovalevski, E Bellebger, and G. Baranton. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighboring countries : high incidence of mixed isolates. 1997. Res. Microbiol. 148 : 691-702.
14. Wang, G., A.P. van Dam, A. Le Flèche, D. Postic, O. Péter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). 1997. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: p. 926-932.
15. Wittenbrink M.M., D. Thiele, and H. Krauss. Comparison of dark-field microscopy, culture, and polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks. 1994. Int. J. Med. Microbiol. Parasitol. Infect. Dis. 281 : 183-191.
16. Wittenbrink M.M., C. Reuter, M.L. Manz, and H. Krauss. Primary culture of *Borrelia burgdorferi* from *Ixodes ricinus* ticks. 1996. Zentralbl. Bakteriол. 285 : 20-28.

17. **Zeman P.** *Borrelia*-infection rates in tick and insect vectors accompanying human risk of acquiring Lyme borreliosis in a highly endemic region in Central Europe. 1998. *Folia Parasitol.* 45 : 319-325.

3.2 Caractérisation phénotypique et génotypique de *Borrelia valaisiana*

3.2.1 Characterization of *Borrelia valaisiana* sp. nov. and *Borrelia lusitaniae* sp. nov., two members of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, by 16S ribosomal DNA

sequence analysis.

ANNE LE FLECHE¹, DANIELE POSTIC¹, KARINE GIRARDET²,
OLIVIER PETER², GUY BARANTON¹

Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, Institut Pasteur,
75724 Paris Cedex 15, France¹, Clinical Microbiology, Institut Central des Hôpitaux Valaisans, 1950 Sion,
Switzerland²

* Corresponding author: D. Postic

Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale
Institut Pasteur
28 rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15
Tel: + 33 1 45 68 83 37
E-mail: dpostic@pasteur.fr

Fax: + 33 1 40 6130 01

SUMMARY

We determined the complete sequence of *rrs* gene from two strains of genomospecies VS116 and from five strains of the genomospecies PotiB2. Both distance and parsimony methods were used to infer the evolutionary relationships of the *rrs* gene of these two genomospecies in comparison with the *rrs* gene sequences of *B. burgdorferi* sensu lato species obtained from ribosomal sequence databases. The phylogenetic analysis revealed that these two genomospecies clustered in two separated lineages, consistently with data from previous DNA/DNA hybridization experiments [22]. A PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was used to simply identify each genomospecies VS116 and PotiB2 and to differentiate them from *B. burgdorferi* sensu lato species. Moreover signature nucleotide positions were identified for each genomospecies VS116 and PotiB2. In accordance with DNA relatedness values, our findings suggest that the genomospecies VS116 and PotiB2 need to be more clearly defined and identified, and we proposed that they should be placed in the new species *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* respectively.

INTRODUCTION

Borrelia burgdorferi sensu lato (*B. burgdorferi* sl), the causative agent of Lyme borreliosis has been divided into five well-defined species, *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* ss), *B. garinii*, *B. afzelli* [2; 4], *B. japonica* [2; 4; 14; 23] and *B. andersonii* [19]. The pathogenicity for man of the three former species was well established, whereas the latter seem not to be pathogenic for man. These different species are not equally distributed all over the world, since the three main species, *B. garinii*, *B. afzelli*, *B. burgdorferi* ss occur in Europe whereas *B. burgdorferi* ss is absent from Asia and is the main species encountered in the United States. In the United States, the more recently described species *B. andersonii* is also present although restricted to a limited geographical area. More recently, other strains genetically and phenotypically divergent from these five species were reported [1; 21; 22] but remained as genomospecies without being named. Among these genomospecies, one was identified in the United States, the genomospecies DN127, and two genomospecies were identified in Europe, the genomospecies VS116 and PotiB2 [22]. These two new European genomospecies have previously been evidenced by DNA-DNA hybridization and characterized by the sequence of the *rrf-rl* ribosomal spacer [22]. Although strains belonging to the genomospecies PotiB2 are yet scarcely isolated, the importance of the genomospecies VS116 seems to be emerging in Europe, as indicated by PCR assays [26].

The aim of this study was to further characterize the two genomospecies VS116 and PotiB2. First, the characterization was completed at a genomic level by sequencing the *rrs* gene yielding to an alternative mean for a specifically identification. Secondly the strains were studied at a phenotypic level with the analysis of protein patterns. On the basis of this present work and previous results, we proposed that the genomospecies VS116 and PotiB2 should be named *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* respectively.

MATERIELS AND METHODS

Bacterial strains. Designation and origin of *Borrelia* strains used in this study are given in Table 1. Five strains PotiB1, PotiB2, PotiB3, IR345 and BR41 belong to the genomospecies PotiB2, and two strains, VS116 and UK belong to the genomospecies VS116. For the phenotypic analysis the following strains were used: B31, VS461, 20047, VS116. All strains were isolated from *Ixodes ricinus* ticks. The isolates were grown in BSK II medium at 30°C [3] for four to 10 days until growth reached about 10⁸ bacteria/ml.

B.valaisiana : VS 116, VS 732, UK (S.Cutler, United Kingdom), F.10.8.94, Z.6.11.93, (W.Oswald, Germany), M52, M57 (A.VanDam, The Netherlands), *B.lusitaniae* : PotiB1, PotiB3 (Nuncio, Portugal) BR41, IR345

DNA preparation. The DNA extraction needed 1.5 ml of culture. Cells were harvested by centrifugation (12,000 g, 15 min) and washed in phosphate buffered saline (PBS). DNA was extracted using the Dynabeads DNA direct kit (Dynal), a method based on a DNA separation by biomagnetic beads. Finally, DNA was eluted in 30 µl of TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA). This suspension was stored at -20°C until use for PCR experiments.

Electrophoresis

The SDS-page was performed as previously described (21). In short the suspension of washed borrelia (protein concentration of 1mg/ml) was electrophoresed (constant voltage 170V) on a 12.5% polyacrylamide gel. The standard molecular weights (MW) of BioRad (low range protein molecular weight standards) were used as reference for the calculation of relative molecular weights. The gels were stained with Coomassie blue.

Solid-phase DNA sequencing of PCR products. We used a solid-phase approach to sequence DNA from PCR products. During the PCR, biotin is introduced into one of the strands using one of the primers biotinylated at the 5' end. We used the primer set fD3 and UniB (Table 2) to amplify about 1500 bp of the *rrs* gene. The PCR mixture (50 µl) contained 5 µl of DNA, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 200 mM each of four dNTP, 1.25 U of Taq polymerase (Amersham), 0.5 µM of the biotinylated primer, and 1 µM of the second primer. The reactions were overlaid with mineral oil (50 µl). The amplification reaction was carried out for 35 cycles (denaturation at 93°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min), and finally, extension at 72°C for nine min. Negative controls were included in all experiments. The PCR products were detected by electrophoresis in a 0.8 % agarose gel in TBE 1X and then stained with ethidium bromide.

The PCR product was then immobilized through the interaction between biotin and streptavidin using the Dynabeads M-280 Streptavidin kit (Dynal) according to the manufacturer' instructions. The DNA strands are separated in a 0.1 M NaOH solution, the biotinylated strand is immobilized using the Dynal MPC (Dynal) and finally eluted in 12 µl water.

The *rrs* gene was sequenced using the Cy5-AutoRead sequencing kit (Pharmacia) according to the manufacturer' instructions. Briefly, the sequencing primer (10 pmol) was annealed to the biotinylated single-stranded template in the appropriate buffer at 65°C for 10 min, then at 37°C for 10 min and finally cooled at room temperature for 10 min. In a second step Cy5-dATP Labeling Mix (Pharmacia) was incorporated and the labeling reaction starts by adding T7 DNA polymerase (3 U). Termination reactions were performed as usual. Six % polyacrylamide gels in an ALF

express automatic sequencer (Pharmacia) were used for sequencing reactions. *rrs* genes of all strains were sequenced at least two times on the two strands.

Sequence alignments and phylogenetic analysis. Sequences were aligned both manually on VSM software V.2.0 written by B. Lafay and R. Christen as described in [27] and by using the multisequence alignment program Clustal V software [11].

Phylogenetic relationships were analyzed using three methods and the results compared. The most parsimonious tree was constructed by using the PAUP program (Phylogeny Analysis Using Parsimony) [29]. Evolutionary distances were computed with the Jukes-Cantor option [28] in both the PHYLIP program package written by Felsenstein [5] and MEGA software [16]. Phylogenetic trees were constructed using the Kitsch+ genetic distance algorithm from distance matrix data and using the Neighbor-Joining method [28] in MEGA. The *rrs* sequences of *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* were compared to the sequences of other *B. burgdorferi* sensu lato species, accession numbers of which are reported in Table 1.

Nucleotide sequence accession numbers. The 16S rDNA sequences have been deposited in the GenBank data base with the following accession numbers: *B. valaisiana* isolates VS116 and UK has accession numbers X98232 and X98233 respectively. *B. lusitaniae* isolates PotiB1, PotiB2, PotiB3, IR345, and BR41 have accession numbers X98226, X98228, X98229, X98230, and X98231 respectively.

RFLP analysis of PCR products. The primer set fD3 and T50 (Table 2) was used to specifically amplify *rrs* gene from spirochetes [20]. The PCR was performed as described above, excepted that the two primers were used at the same concentration (1 μ M). The amplification reaction was carried out for 30 cycles with an annealing temperature of 54°C.

The PCR products (10 μ l), were digested by the enzyme *Bfa*I (Biolabs New England, USA). The restriction products were separated by electrophoresis on a 1.8 % agarose gel in TBE buffer for 2 h at 120 V. PBR322 digested by *Hin* fl was used as a molecular weight marker.

RESULTS AND DISCUSSION

Sequence comparisons and phylogenetic analysis. The two new European species, *B. valaisiana* (formerly group VS116) and *B. lusitaniae* (formerly group PotiB2), have been previously individualized on the basis of DNA relatedness in DNA/DNA hybridization experiments. These two species were easily identifiable by analysis of the restriction pattern of the *rrf-rrl* ribosomal spacer after amplification by PCR [22]. In this study, the nearly complete *rrs* sequences (1509 to 1526 nucleotides) were determined from five *B. lusitaniae* strains and two *B. valaisiana* strains, spanning about 96 % of the *rrs* gene. In order to evaluate the phylogenetic position of *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*, we have compared the *rrs* sequences with those of other species constituting the complex *B. burgdorferi* *sl* available in data banks (Table 1). The levels of similarity between *rrs* sequences are shown in Table 3. The number of mutations in the 16S ribosomal sequences is very low within *B. burgdorferi* *sl* strains and the percent sequence similarity values span from 98.6 to 99.7 % between species. These results confirm that the divergence of *B. burgdorferi* *sl* leading to the speciation is a recent event. As it was previously shown for *B. burgdorferi* *ss* and *B. garinii* [18], the five *B. lusitaniae* strains exhibit a very high level of relatedness (99.9 %) (Table 3) and differ by only two nucleotides.

The two European strains VS116 and UK from *B. valaisiana* differ by five nucleotides and exhibit a level of similarity of 99.7 %. These two sequences are very similar (99.8 and 99.7 % respectively) to the *rrs* sequence of the Japanese strain Am501 isolated from *I. columnae* (Table 4). This latter strain was previously found in the same cluster than the strain VS116 in a phylogenetic tree deduced from the flagellin gene sequence [8] and clustered with strains isolated from *I. tanuki* in a tree constructed by using 16S rRNA gene sequences [6]. Between *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*, the *rrs* sequence similarity was 99 to 99.1 %.

Despite the level of interspecific sequence variability approaches the level of intraspecific variability within each species, the analysis of phylogenetic relationships between these closely related species are consistent with the taxonomic position inferred from DNA/DNA hybridization studies. *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* are clearly branched in two separated clusters (Fig). The phylogenetic position of *B. lusitaniae* associated with the branching pattern is closed to *B. garinii*. In contrast *B. valaisiana* is branching closer to *B. afzelii*. This topology is strongly supported by parsimony analysis results (data not shown).

Determination of signature nucleotides. Due to the high level of *rrs* sequence conservation, the mismatches in the nucleotide sequence between *Borrelia* strains might be of interest in their identification at a species level or at an epidemiological level. The recognition of signature positions in each of the three main species has already been utilized to design primers and probes for the identification of *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* and *B. afzelii* [17; 18]. Some variable and signature positions could be used to differentiate *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* from other *B. burgdorferi* sl strains (Table 4). However we have to keep in mind that due to the intraspecific variability, these signatures might be evaluated on a very large number of strains and re-evaluated when a new species is described. For example, the signature positions, which were chosen to design primers specific for *B. garinii* [17], are also available for *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*. And we failed to design primers strictly specific for *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*.

RFLP analysis. To overcome this problem, we investigated in the analysis of restriction site polymorphism of PCR products from *rrs* gene. We have previously shown that the *Bfa*I polymorphism provided a simple mean to identify *Borrelia* species [20; 25]. The PCR primers fD3 and T50 generated 1,488-bp DNA fragments. Their restriction by *Bfa* I allowed to individualize six patterns (Table 1). All but two species can be identified by this mean. As we had previously underlined [25], the strains belonging to the genomospecies DN127 exhibit the same pattern as *B. burgdorferi* ss and *B. japonica* strains exhibit the same pattern as *B. afzelii*. However, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* were easily identified by specific patterns (Fig 2).

Protein pattern

The Coomassie blue staining of the SDS-page showed typical Osp profiles for the various species of *Borrelia* (Fig 1). The OspA ranged from 30.5 kDa for *B. japonica* to 34 kDa for *B. lusitaniae*. The OspB showed less electrophoretic variability from 34 kDa for *B. burgdorferi* sensu stricto to 35 kDa for *B. afzelii* and *B. andersoni* and was apparently absent in *B. garinii*, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* (21, 22). In fact *B. andersoni* and *B. afzelii* presented similar OspA (32 kDa) and OspB (35 kDa) profiles, but could be differentiated by specific monoclonal antibodies. All six *B. valaisiana* isolates showed an identical OspA of 33.5 kDa. Although very close from that of *B. valaisiana*, the OspA from *B. lusitaniae* appeared with a slightly higher molecular weight (34 kDa) for PotiB1, PotiB2 (not shown), PotiB3, BR41. The isolate Ir345 (*B. lusitaniae*) presented a variant OspA around 32.5 kDa. Specific monoclonal antibodies would be helpful to differentiating these species at the phenotypic level.

Habitat. *B. valaisiana* has been isolated from *I. ricinus* in different European countries from the United Kingdom to Moldavia. This species has also been isolated from *I. columnae* in Japan. Although there is no strict association with a tick vector, it is noteworthy that from a large number of strains isolated from *I. persulcatus* in Russia and in the New Independent States [24] as in Japan [7; 9], no *B. valaisiana* has ever been isolated from this tick species. A recent study has shown that passerine birds could be used as a reservoir for this species, since several strains have been isolated from birds, which were able to transmit infection to ticks, by xenodiagnosis [12]. To our knowledge no *B. valaisiana* strain has been yet isolated from humans. However, Rijpkema et al. detected by PCR DNA from *B. valaisiana* in patients with erythema migrans or acrodermatitis [26]. In this latter study, *B. valaisiana* was found alone or associated with *B. garinii* or *B. afzelli*. Thus the pathogenic potentiality of *B. valaisiana* warrants consideration.

In contrast, rare strains of *B. lusitaniae* have been isolated, only from *I. ricinus* ticks in Portugal, Czech Republic and in Bielorrussia.

Description of *Borrelia valaisiana* sp. nov. *Borrelia valaisiana* (va.lai.si'a.na. L. fem. adj. *valaisiana*, of the Swiss region Valais, where the organism was first isolated [21]). Morphology as described previously for the genus [15]. Cultural properties as described previously for *B. burgdorferi* sensu lato [13]. Does not react with monoclonal antibodies H3TS, D6, and I 17.3 specific for *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* and *B. afzelli* respectively (unpublished data). Can be easily differentiated from other *B. burgdorferi* sl species by the analysis of *MseI* restriction polymorphism of the *rrf-rrl* spacer [22]. Patterns after restriction of the *rrs* gene by *Bfal*, contain five fragments (689, 504, 159, 78, and 58 bp).

The type strain, VS116^T was isolated from *I. ricinus* in Switzerland.

Description of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. *Borrelia lusitaniae* (lu.si.tan'i.iae. L. fem. adj. *lusitaniae*, of Portugal where the organism was first isolated [22]). Morphology as described previously for the genus [15]. Cultural properties as described previously for *B. burgdorferi* sensu lato [13]. Does not react with monoclonal antibodies H3TS, D6, and I 17.3 specific for *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* and *B. afzelli* respectively (unpublished data). Can be easily differentiated from other *B. burgdorferi* sl species by the analysis of *MseI* restriction polymorphism of the *rrf-rrl* spacer [22]. Patterns after restriction of the *rrs* gene by *Bfal*, contain six fragments (689, 404, 159, 100, 78, and 58 bp).

The type strain, PotiB2T was isolated from *I. ricinus* in Portugal.

Aknowledgments

Nuncio M.S. for isolates Poti-B 1-3 of *B. burgdorferi* sl.

Part of this study was supported by a grant from the "Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique" Nr 32-40605.94.

REFERENCES

1. **Assous, M. V., D. Postic, G. Paul, P. Nénot and G. Baranton.** 1994. Individualization of two genomic groups among American *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 93-98.
2. **Baranton, G., D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J. C. Piffaretti, M. Assous and P. A. D. Grimont.** 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 378-383.
3. **Barbour, A. G.** 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57: 521-525.
4. **Canica, M. M., F. Nato, L. du Merle, J. C. Mazie, G. Baranton and D. Postic.** 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25: 441-448.
5. **Felsenstein, J.** 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics.* 164- 166.
6. **Fukunaga, M., A. Hamase, K. Okada, H. Inoue, Y. Tsuruta, K. Miyamoto and M. Nakao.** 1996. Characterization of spirochetes isolated from ticks (*Ixodes tanuki*, *Ixodes turdus*, and *Ixodes columnae*) and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2338-2344.
7. **Fukunaga, M. and Y. Koreki.** 1996. A phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates associated with Lyme disease in Japan by flagellin gene sequence determination. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 416-421.
8. **Fukunaga, M., K. Okada, M. Nakao, T. Konishi and Y. Sato.** 1996. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease Borreliae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 898-905.
9. **Fukunaga, M., M. Sohnaka and Y. Yanagihara.** 1993. Analysis of *Borrelia* species associated with Lyme disease by rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1141-1146.
10. **Gazumyan, A., J. J. Schwartz, D. Liveris and I. Schwartz.** 1994. Sequence analysis of the ribosomal RNA operon of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Gene.* 146: 57-65.
11. **Higgins, D. G. and R. Sharp.** 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS.* 5: 151-153.
12. **Humalr, P. -F., D. Postic, R. Wallich and L. Gern. .** An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. 1998. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 521-538.
13. **Jolinson, R. C., G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt and D. J. Brenner.** 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 496-497.
14. **Kawabata, H., T. Masuzawa and Y. Yanagihara.** 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* 37: 843-848.
15. **Kelly, R. T.** 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* The Williams & Wilkins Co., Baltimore.,
16. **Kumar, S., K. Tamura and N. Masatoshi.** 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
17. **Marconi, R. T. and C. F. Garon.** 1992. Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2830-2834.
18. **Marconi, R. T. and C. F. Garon.** 1992. Phylogenetic analysis of the genus *Borrelia*: a comparison of North American and European isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.* 174: 241-244.

19. Marconi, R. T., D. Liveris and I. Schwartz. 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J. Clin. Microbiol. 33: 2427-2434.
20. Marti Ras, N., B. Lascola, D. Postic, S. J. Cutler, F. Rodhain, G. Baranton and D. Raoult. 1996. Phylogenesis of Relapsing fever *Borrelia* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 859-865.
21. Péter, O. and A. G. Bretz. 1992. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. Zbl. Bakt. 277: 28-33.
22. Postic, D., M. V. Assous, P. A. D. Grimont and G. Baranton. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S) *rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 743-752.
23. Postic, D., J. Belfaiza, E. Isogai, I. Saint Girons, P. A. D. Grimont and G. Baranton. 1993. A new genomic species in *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from Japanese ticks. Res. Microbiol. 144: 467-473.
24. Postic, D., E. Korenberg, N. Gorelova, Y. V. Kovalevski, E. Bellenger and G. Baranton. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighboring countries: High incidence of mixed isolates. 1997. Res. Microbiol. 148: 691-702.
25. Ralph, D., D. Postic, G. Baranton, C. Pretzman and M. McClelland. 1993. Species of *Borrelia* distinguished by restriction site polymorphisms in 16S rRNA genes. FEMS Microbiol. Lett. 111: 239-243.
26. Rijpkema, S. G. T., D. J. Tazelaar, M. J. C. H. Molkenboer, G. T. Noordhoek, G. Plantinga, L. M. Schouls and J. F. P. Schellekens. 1996. Detection of *Borrelia afzelli*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin. Microbiol. Infect. 3: 109-116.
27. Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier and R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 416-426.
28. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
29. Swofford, D. L. 1992. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0. Illinois Natural History Survey, Champaign.
30. Theisen, M., M. Borre, M. J. Mathiesen, B. Mikkelsen, A. M. Lebech and K. Hansen. 1995. Evolution of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein OspC. J. Bacteriol. 177: 3036-3044.

Table 1 Strains used in this study

Strains	Geographical origin	Reference source	or GenBank accession no. of <i>rrs</i> gene	Size fragments amplified (bp)	of <i>rrs</i>	<i>Bfa</i> I of gene
<i>B. lusitanae</i>				689, 404, 159, 100, 78, 58		
PotiB1	Portugal	22	X98226			
PotiB2	Portugal	22	X98228			
PotiB3	Portugal	22	X98229			
IR345	Bielorussia	24	X98230			
BR41	Czech Republic	This study	X98231			
<i>B. valaisiana</i>				689, 504, 159, 78, 58		
VS116	Switzerland	21 + 22	X98232			
UK	England	2 2	X98233			
AmSO1	Japan	6	D67021			
<i>B. burgdorferi</i> ss				689, 404, 236, 159		
DK7		30	X85195			
Lipitz		30	X85203			
<i>B. garinii</i>				889, 404, 159, 158, 78		
PBi	Germany	30	X85199			
DK27		30	X85193			
<i>B. afzelii</i>				689, 504, 159, 136		
DK1			X85190			
DK21			X85191			
<i>B. japonica</i>				889, 504, 159, 136		
HO14	Japan	14	L40597			
<i>B. andersonii</i>				689, 404, 159, 136, 100		
21308	United States	19	L46701			
Geno DN127				689, 404, 236, 159		
DN127	United States	22	L40596			

TABLE2. Primers used for amplification and sequencing of the rrs gene of *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*

Primers	Sequences (5' to 3')	Position in <i>B. burgdorferi</i> ss
PCR primers		
fD3	AGAGTITGATCCTGGCITAG	8-27
T50	GTTACGACTTCACCCCTCCT	1497-1479
UniB	T(AC)AAGGAGGTGATCCAGC	1539-1522
Sequencing primers		
fD3	AGAGTITGATCCTGGCTTAG	8-27
S1	AACGCGTGGATGATCTACCT	105-124
RS3	TTACCCCTACCAACTAGCTAAT	259-239
S5	GAGGAATAAGCTTITGTAGGA	442-462
RS6	CTTAGCGCCCAATAATCCCGA	571-551
S9	ATTAGATACCCCTOGTAGTCT	784-803
RS9	TAACACCAAGTGTGCATCGT	832-813
RSII	CTTAACCCCAACACCTCACAGC	1086-1066
S13	AGGAAGGTGAGGATGACGTC	1169-1188
RS15	TAATAGCTTGGG5TATCCTC	1435-1416
RS16	TGATCCAGCCGCACTTTCC	1531-1512

66 TABLE 3. *B. burgdorferi* sensu lato signature and variable nucleotide positions of the 18S rDNA

Position ^b	Nucleotide ^a					
	<i>B. lusitanae</i>	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. japonica</i>
	<i>DN127</i>	<i>DN127</i>	<i>DN127</i>	<i>DN127</i>	<i>DN127</i>	<i>DN127</i>
77	C	T/C	C	C	C	C
143	C	C	T	C	C	T
170	A	G	G	G	G	G
253	A	G	A	G	A	A
586	T	C/T	T	T	T	T
627	A	A	C	G	G	G
647	T	C/T	T	T	T	T
676	T	C	T	C	T	T
708	A	G	A	G	A	G
836	A	G	A	A	A	A
838	C	A	A	A	A	A
1133	A/G	A	G	A	G	A
1256	G	A	A	A	A	A

^aNucleotides of different *B. burgdorferi* sensu lato are included for comparison.

^b*B. burgdorferi* B31 numbering (9).

Table 4. Percent sequence similarity values

Borrelia species	% sequence similarity																	
	(strain)	DK7	Lipitz	PBi	DK27	DK1	DK21	HO14	DN127	21038	PotiB1	PotiB2	PotiB3	IR345	BR41	VS116	UK	Am501
B. burgdorferi ss																		
(DK7)	100	99.8	99	99.2	98.6	98.7	98.7	95.8	96.8	97.7	99	99.1	99	99.2	99.2	98.8	98.7	98.9
(Lipitz)		100	99.2	99.4	98.8	98.9	98.9	96	97	98	99.2	99.3	99.2	99.4	99.4	99	98.9	99
B. garinii																		
(PBi)			100	99.6	98.7	98.8	98.8	95.7	96.6	97.4	99.2	99.3	99.2	99.4	99.4	99	98.9	99.1
(DK27)				100	98.8	98.9	98.9	95.9	96.9	97.7	99.5	99.6	99.5	99.7	99.7	99.1	99	99.2
B. afzelii																		
(DK1)					100	99.8	99.8	95.7	96.1	97.8	98.9	98.8	98.9	98.9	98.9	99.2	99.1	99.3
(DK21)						100	100	95.7	96.2	97.8	99	98.9	99	99	99	99.2	99.2	99.4
B. japonica																		
(HO14)									97.6	95.3	95.8	95.9	95.8	96	96	95.5	95.4	95.7
Geno.DN 127																		
(DN127)									100	95.4	96.6	96.7	96.6	96.8	96.8	96.2	96.1	96.4
B. andersonii																		
(21308)										100	97.8	97.7	97.8	97.8	97.8	97.6	97.5	97.8
B. lusitaniae																		
(PotiB1)											100	99.9	100	99.9	99.9	99.1	99	99.3
(PotiB2)												100	99.9	99.9	99.9	99	99	99.2
(PotiB3)													100	99.9	99.9	99.1	99	99.3
(IR345)														100	100	99.1	99	99.3
(BR41)															100	99.1	99	99.3
B. valaisiana																		
(VS116)																100	99.7	99.8
(UK)																	100	99.7
(Am501)																		100

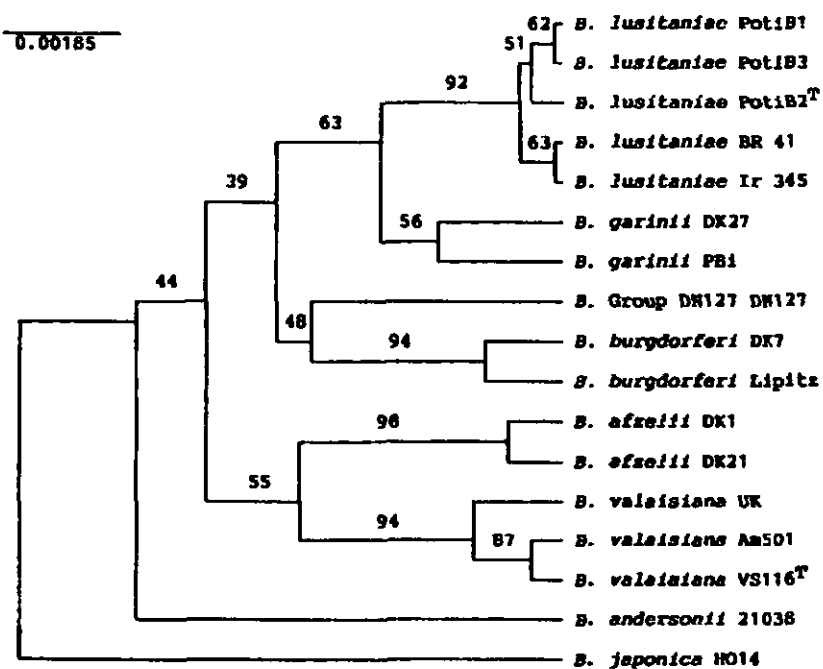


Fig. 1

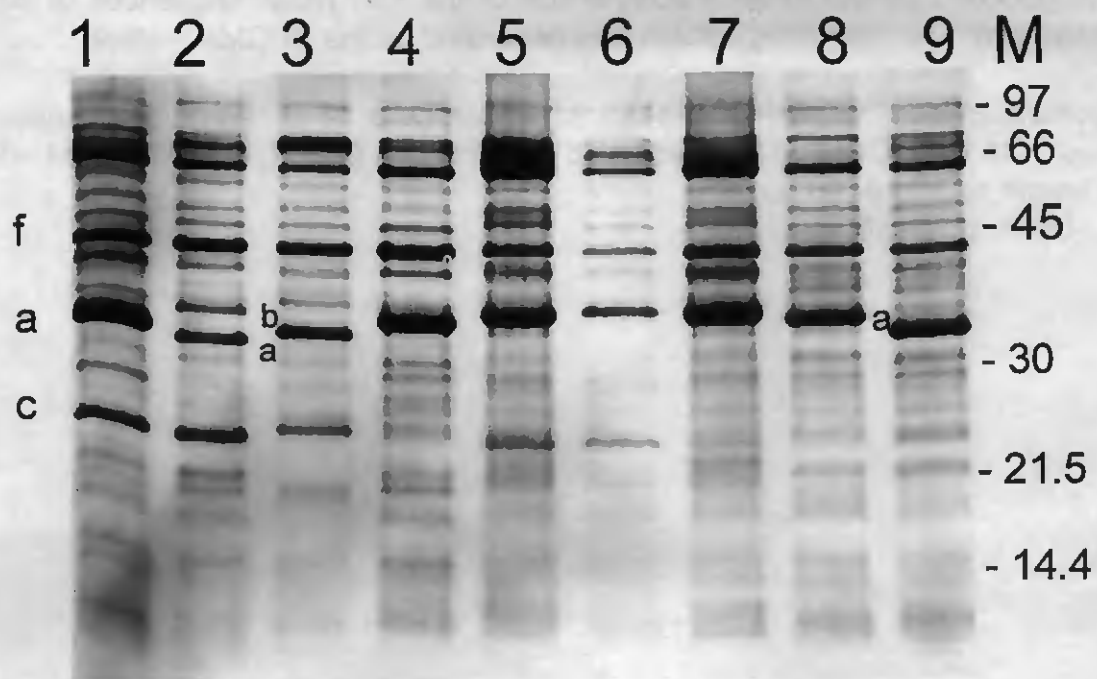


Fig2

Figure 1. Phylogenetic tree based on a comparison of the 16S rRNA sequences of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The branching pattern was generated by the UPGMA method.

Figure 2. Coomassie blue stained SDS-page of whole cells of *B. burgdorferi* sensu lato isolates. Lanes 1 to 9, 20047, B31, VS461, VS116, PotiB1, PotiB2, PotiB3, BR41, IR345. M :Molecular weight standards (kDa).
f : flagellin, a : OspA, b : OspB, c : OspC.

3.2.2 Description du profil protéinique de *B. valaisiana* par électrophorèse bidimensionnelle

Introduction

Les spirochètes *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl.), sont les agents infectieux responsables de la borréliose de Lyme. En Suisse, quatre espèces sont actuellement connues, *B. burgdorferi* sensu stricto (ss.), *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. valaisiana*. La classification des espèces se basant en premier lieu sur le profil protéinique, une trentaine de protéines, dont le poids moléculaire (PM) se situe entre 7 kDa et 30 kDa, ont ainsi été caractérisées. Il s'est alors avéré que les protéines de poids moléculaire (PM) inférieur à 40 kDa variaient d'une espèce à l'autre, tandis que celles dont le PM était supérieur à 40 kDa présentaient plus d'homogénéité (Wilske 86, Wilske 88). Parmi les protéines comportant un PM variant d'une souche à l'autre, un certain nombre ont été décrites comme protéines de surface. Ce sont de bons marqueurs pour la borréliose de Lyme (Ma 92) même si des variations ont été largement observées entre isolats américains et européens (Barbour 85, Wilske 86, Wilske 88). Tandis que l'OspA et l'OspB des espèces américaines présentent en effet une relative constance dans leur PM (OspA 31 kDa et OspB 34 kDa) (Barbour 85) avec absence d'OspC (Bissett 87), les isolats européens, quant à eux, se distinguent par leur hétérogénéité dans l'expression de ces protéines (Hu 94, Wilske 86, Wilske 88). Ainsi l'OspA varie entre 30 kDa et 33.5 kDa, l'OspB entre 34 kDa et 35 kDa, l'OspC entre 20 kDa et 23 kDa (Wilske 88).

Isolée pour la première fois à partir d'une tique *I. ricinus*, dans un biotope de la région de Rarogne, en Valais (CH), la souche VS116 est considérée comme la souche de référence de l'espèce *B. valaisiana* (Péter 92, Wang 97). Péter observe, en effet, que la souche VS116 présente un profil de migration particulier au niveau de l'OspA et que cette souche ne présente aucune réaction avec les anticorps monoclonaux, H3TS, D6 et I17.3, employés lors de la caractérisation des différentes espèces (Péter 92). A ce jour, le profil protéinique de toutes les souches *B. valaisiana* présente une protéine dominante située entre 32 et 34 kDa qui ne réagit cependant avec aucun des anticorps monoclonaux spécifiques à l'OspA de *B. burgdorferi* sl. (Péter 92, Wang 97). L'OspB et l'OspC des souches *B. valaisiana* semblent hétérogènes. En effet, non seulement le poids moléculaire de ces deux protéines diffère au sein de l'espèce, mais l'OspB et l'OspC présentent des réactions avec les anticorps monoclonaux variant d'une souche à l'autre (Wang 97).

Afin de déterminer avec plus de précision le profil protéinique de la souche de référence (VS116) de *B. valaisiana*, une analyse a été réalisée par électrophorèse.

Depuis leur apparition au début des années 70, les électrophorèses bidimensionnelles sur gel d'acrylamide ont été employées pour caractériser de nombreuses protéines, notamment les protéines membranaires. Cependant, la focalisation du PI n'a été possible qu'avec l'élaboration d'un gradient de pH demeurant stable tout au long de la première électrophorèse. En effet, auparavant, le gradient de pH n'était pas assuré compte tenu du caractère des ampholytes et des nombreuses heures de migration nécessaires à la focalisation des protéines. Par la suite, l'amélioration de la solubilité des protéines a permis d'affiner encore les résultats (Rabilloud 97). La technique employée dans cette étude se base principalement sur les recherches des Dr. Hochstrasser et Sanchez de l'Hôpital Cantonal Universitaire de Genève (Sanchez 99, Yan 99).

Matériel et Méthodes

Préparation des souches

Pour chaque culture positive, les souches ont été lavées trois fois par centrifugation successive (14'000 g, pendant 15 min.) dans du tampon phosphate (PBS) (0.1 M pH 7.45 + 5 mM MgCl₂) et resuspendues dans de l'eau distillée à une concentration protéinique de 1 mg/ml

selon la méthode de Biuret. Les spirochètes ainsi lavés ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Réhydratation des strips

Les strips de gradient non linéaire, pH 3.5-10 (Pharmacia, Uppsala-Sweden), ont été fixées dans la chambre de réhydratation avec quelques gouttes d'eau distillée et incubées pendant la nuit à température ambiante (TA). dans une solution composée d'Urée 6 M, Thiourée 2 M, CHAPS 2% p/v, DTE 10 mM, résolytes 2% v/v, pH 3.5-10 et Bleu de bromophénol (traces). A la fin de la réhydratation, les strips ont été nettoyées au moyen d'un papier buvard humidifié avec de l'eau distillée et congelées à -80°C avant leur utilisation pour la 1D.

Electrophorèse 1D

Après l'installation des strips dans la chambre d'électrophorèse, 60 à 100 µl de souches (135 µg) dilués dans du tampon échantillon (Urée 6 M, Thiourée 2 M, CHAPS 4%, Tris 40 mM, DTE 65 mM et Bleu de bromophénol (traces)) ont été chargés du côté cathode. Pour une comparaison optimale des profils de migration, les souches de référence des quatre espèces ont été chargées simultanément lors d'une même électrophorèse. La migration s'effectue à 15°C selon le programme suivant : 0-500 V, 1 min. ; 500 V const., 5 heures ; 500-3500 V, 5 heures ; 3500 V const., 9.5 heures (au total: 19.5 heures à 15°C, 453000 Vxh). A la fin de l'électrophorèse 1D, les strips ont été congelées individuellement dans des boîtes de Pétri.

Electrophorèse 2D

Des gels de 20 cm de longueur ont été coulés avec un gradient de 9 à 16% d'acrylamide-PDA et conservés une nuit à 4°C avant d'y être chargés par les strips. Le jour de l'utilisation, les strips ont été équilibrées 12 min dans une solution d'équilibration (Urée 6 M, Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, Glycérol 30 % v/v, SDS 2% p/v) additionnée de DTE 2% p/v puis 5 min dans une solution d'équilibration additionnée d'Iodoacétamide 2.5% p/v et de Bleu de bromophénol (traces). Les strips ont ensuite été fixées au sommet du gel de polyacrylamide au moyen d'agarose 0.5%. Les conditions de migration ont été fixées à 450 V, 80 mA constant, 50 W durant 4h10.

Westernblot

Les protéines ont été transférées des gels sur membrane PVDF Immobilon (millipore IPVH 00010) par westernblot en courant constant à 90 V à 15°C pendant 3 heures. Les membranes ont ensuite été colorées au Bleu de Coomassie R-250 avant d'être analysées.

Détermination des poids moléculaires et des points isoélectriques des protéines

Afin de déterminer avec précision le poids moléculaire (PM) et le point isoélectrique (PI) des protéines de *Borrelia*, les protéines du plasma humain (12.5 µg) ont été séparées simultanément dans une même électrophorèse avec 90 µg de protéines de *B. valaisiana* (VS116). Les PM et PI des protéines humaines ont servi de référence (Golaz 93). Ainsi une analyse détaillée a permis en premier lieu de déterminer la cartographie du Westernblot *B. valaisiana*-Plasma puis, par analogie, celle de *B. valaisiana* seule. L'identification des protéines a ensuite été confirmée avec les anticorps monoclonaux. La cartographie de *B. valaisiana* a été réalisée au moyen du programme informatique Mélanie (BioRad, Glattbrugg-CH) (Appel 97).

Caractérisation des bandes protéiniques avec les anticorps monoclonaux

Les membranes, contenant les protéines de *Borrelia*, ont été colorées au Bleu de Coomassie R-250. La caractérisation des bandes protéiniques s'est faite au moyen des anticorps monoclonaux listés dans la table 1. Les membranes ont été décolorées quelques secondes au méthanol, puis saturées une heure à 37°C dans du tampon tris (TBS) contenant 5% de gélatine. Après trois lavages à TA. au TBS additionné de 0.05% de Tween 20 et de 0.1% de gélatine, les membranes sont incubées avec les anticorps monoclonaux dilués dans du TBS-Tween avec 1% de gélatine pendant deux heures à TA.. Après trois nouveaux lavages, du conjugué de chèvre anti-souris polyvalent, couplé à la phosphatase alcaline, dilué 1/1000 a été ajouté et incubé deux heures à TA.. La réaction est visualisée, après deux lavages au TBS-

Tween avec 0.1% de gélatine et un lavage au TBS, au moyen d'un substrat chromogène BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indoyl p toluidine phosphate/p nitro blue tetrazolium chloride).

Table 1
Dilution des anticorps monoclonaux

Monoclonal	Spécificité	Dilution	Reçu de
LA 114 Zs7	93 kDa (Bb sl)	1/1500	Wallich
LA 18	66 kDa (Bb sl)	1/50	Wallich
149	62 kDa (Bb sl)	1/25	Golde
H9724	Flagelline (Bb sl)	1/1000	Barbour
LA 112 Zs7	39 kDa (Bb sl)	1/1000	Wallich
L22 2B8	OspC (Bb sl)	1/1000	Wilske
H5332	OspA (Bb ss, Bg, Bø)	1/800	Barbour
LA31	Polyclonal (Bb ss)	1/1000	Wallich
A116k	OspA (Bv)	1/500	Ryffel

Résultats

Afin de déterminer avec précision le poids moléculaire (PM) et le point isoélectrique (PI) des protéines de *Borrelia*, les protéines du plasma humain, à titre de référence, ont été séparées simultanément avec les protéines de *B. valaisiana* (VS116). L'identification des protéines a ensuite été confirmée avec les anticorps monoclonaux de la table 1. La cartographie de *B. valaisiana* (Figure 1) a été réalisée au moyen du programme informatique Mélanie (BioRad, Zuzach-CH). Les résultats sont présentés dans la table 2.

Les PI des protéines de *B. valaisiana* se situent entre 5.0 et 8.0. Tandis qu'on peut observer une excellente focalisation des protéines dont les PM se situent en-dessous de l'OspA (PI entre 6.5 et 7), les heat-shock protéines présentent pour la plupart un groupe de spots dont le PI se situe entre 5.0 et 6.7. Les PI des différentes isoformes de l'OspA se répartissent entre 5.0 et 6.4. Les conditions d'électrophorèse employées dans cette étude permettent de dénombrer pour cette protéine six spots distincts. L'anticorps monoclonal spécifique à *B. valaisiana* A116k ne présente pas de réaction plus spécifique contre l'un de ces six spots.

Une première comparaison des cartographies des souches *B. burgdorferi* ss. (VS215), *B. garinii* (VS102) et *B. afzelii* (VS461) a été réalisée par rapport à *B. valaisiana* (VS116). Pour cela, les extraits bactériens de chaque souche ont été séparés par électrophorèse suivant les conditions précitées. On peut noter quelques différences dans la focalisation des protéines de chaque espèce. Par exemple, la 93 kDa de la souche VS102 présente un PI de 5.3, celui de la souche VS215 est aux environs de 6.6, tandis que les souches VS461 et VS116 présentent très nettement un PI pour cette protéine de 5.0. La 61 kDa présente aussi des divergences au niveau des PI de ses spots en fonction des différentes souches. Ainsi, tandis que les PI des spots de la VS461 sont inférieurs à 6.1, ceux de VS215 et VS116 sont situés entre 6.1 et 6.5 et ceux de VS102 sont au-delà de 6.5. La 47 kDa des souches VS102 et VS461, quant à elle présente des spots dont le PI est supérieur à ceux de VS116 et VS215. Deux protéines semblent encore présenter des profils de migration différents en fonction des souches. Ainsi, la 37 kDa et l'OspC de la souche VS116 ont une meilleure focalisation que celle des autres espèces. On peut encore observer chez VS461 un spot spécifique dont le PM se situe entre l'OspC et l'OspD dont le PI varie de 6.6 à 6.7.

Table 2

Points isoélectriques des différentes protéines de *B. valaisiana* en fonction de leur poids moléculaire

Protéines	Point Isoélectrique des différents spots
93 kDa	5.0
78-80 kDa	6.3-6.5
73 kDa	5.1-5.4
66 kDa	6.1-6.5
61 kDa	5.7 / 6.1 / 6.5
60 kDa	5.1-5.4 / 6.2 / 6.5
59 kDa	5.2-5.5 / 6.5-6.6
57 kDa	5.0 / 6.3
54-55 kDa	5.0 / 6.2-6.4 / 6.6-6.7
47 kDa	5.0-5.5 / 6.6
45 kDa	5.9-6.5
41 kDa	5.1 / 5.3 / 5.5 / 6.3 / 6.7-6.8
40 kDa	5.1 / 5.5
39 kDa	5.2-5.3
37 kDa	6.5 / 6.8 / 7.1 / 7.7 / 8.0
34 kDa	6.8
OspA	5.0 / 5.1 / 5.2 / 5.5 / 5.9 / 6.4
OspD	6.5 / 6.6 / 6.7 / 6.8
OspC	5.0 / 5.8 / 6.9
20 kDa	6.7

Discussion

Au moyen d'électrophorèse bidimensionnelle, le PI des principales protéines de *B. valaisiana* (VS116) a pu être déterminé. La cartographie a été réalisée grâce au programme Mélanie (BioRad, Glattbrugg-CH) et à l'emploi des protéines du plasma humain qui ont servi de référence. Jusqu'à présent, aucune cartographie complète de *Borrelia* n'a été présentée. Seuls les PI de certaines protéines ont été caractérisés. Dans la majeure partie des cas, les résultats obtenus dans cette étude concordent avec ceux décrits précédemment. Ainsi, alors que Luft (Luft 91) a situé les PI des spots de la 66 kDa entre 6.0 et 7.0, ceux-ci se définissent ici comme une tétrade entre 6.1 et 6.5. Les PI de la flagelline de *B. burgdorferi* ont été situés par Coleman (Coleman 89) entre 6.5 et 6.6, ceux de *B. valaisiana* obtenus dans cette étude entre 6.3 et 6.8. L'OspA présente quant à elle des divergences au niveau des PI de ses spots. En effet, alors que Benach (Benach 88) définit les PI de l'OpsA entre 8.5 et 9 sur la base d'une réaction avec un anticorps monoclonal spécifique de *B. burgdorferi*, ceux de l'OspA de *B. valaisiana* se répartissent en six spots distincts dont les PI se situent entre 5.0 et 6.4.

La présence de plusieurs spots de PI distincts pour un même PM laisse suggérer que différentes protéines possèdent le même PM. Contrairement aux électrophorèses bidimensionnelles, les électrophorèses unidimensionnelles ne permettent pas une telle différenciation. Dans cette étude, l'emploi des monoclonaux pour la caractérisation des spots n'a pas toujours permis de définir la présence de plusieurs protéines avec des PM similaires. En effet, les réactions avec les anticorps monoclonaux n'étaient généralement pas limitées à un seul spot. Même après dilution des anticorps monoclonaux, de grandes traînées sont apparues lors de la coloration suggérant une mauvaise focalisation des protéines. Certains auteurs ont employé, lors de la première dimension, la technique de migration électrophorétique de courte durée (3-4 heures), de façon à obtenir une meilleure focalisation des protéines. Cette méthode ne permet cependant pas de déterminer le PI des protéines, ni d'exclure la présence d'autres protéines présentant la même migration (Norris 92, Norris 95). La majorité des protéines de surface de *B. burgdorferi* sl. sont des lipoprotéines dont les chaînes lipidiques empêchent une bonne focalisation au PI. Pour une recherche ultérieure de la présence de différentes protéines de même PM, les conditions de préparation des lysats devraient être modifiées, en particulier une délipidation des protéines pourrait améliorer leur focalisation. Il serait par ailleurs intéressant d'effectuer des électrophorèses séparées avec les différentes fractions obtenues après une séparation des phases (phase aqueuse, phase contenant le détergent et phase contenant les micelles).

Les protéines, dont le PM est inférieur à 20 kDa, n'ont pas été prises en considération compte tenu de leur migration asymétrique sur les gels. Par ailleurs, la probabilité d'une contamination par un produit de dégradation augmente avec la diminution du PM des protéines. La garantie de l'appartenance des PI à chaque protéine devient insuffisante. Dans le même ordre d'idée, les PM des protéines entre 53 kDa et 59 kDa nécessiteraient d'être redéfinis avec précision. Il apparaît, en effet, une lacune dans la caractérisation des protéines de *Borrelia* entre 54 kDa et 59 kDa. Cette cartographie rend visible au moins une protéine qui n'a pour l'heure pas été décrite. Cependant, les conditions d'électrophorèses employées dans cette étude n'ont pas permis d'obtenir une séparation suffisante de ces protéines pour garantir la détermination exacte du PM.

Une première approche dans la comparaison de la cartographie de *B. valaisiana* avec celles de *B. burgdorferi* ss., *B. garinii* et *B. afzelii* a été présentée. Il apparaît que certaines protéines présentent des divergences au niveau du PI de leur spot en fonction des différentes souches. En effet, des protéines, telles que la 93 kDa, la 61 kDa et la 47 kDa, montrent des spots dont le PI est hétérogène d'une espèce à l'autre. Il est aussi fort probable que l'on retrouve des divergences au sein d'une même espèce. Là encore, ces résultats nécessitent d'être confirmés par une étude plus détaillée.

Bibliographie

1. Appel R.D. P.M. Palagi, D. Walther, J.R. Vargas, J.C. Sanchez, F. Ravier, C. Pasquali, and D.F. Hochstrasser. Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. 1997. *Electrophoresis*. 18 : 2724-2734.
2. Barbour A.G., R.A. Heiland, and T.R. Howe. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. 1985. *J. Infect. Dis.* 152: 478-484.
3. Benach J.L., J.L. Coleman, and M.G. Golightly. A murine IgM monoclonal antibody binds an antigenic determinant in outer surface protein A, an immunodominant basic protein of the Lyme disease spirochete. 1988. *J. Immunol.* 140 : 265-272.
4. Bissett M.L., and W. Hill. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California. 1987. *J. Clin. Microbiol.* 25 : 2296-2301.
5. Coleman J.L., and J.L. Benach. Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. 1989. *J. Clin. Invest.* 84 : 322-330.
6. Golaz O., G.J. Hughes, S. Frutiger, N. Paquet, A. Bairoch, C. Pasquali, J.C. Santchez, J.D. Tissot, R.D. Appel, C. Walzer, L. Balant, D.F. Hochstrasser. Plasma and red blood cell protein maps : Update 1993. 1993. *Electrophoresis*. 14 : 1223-1231.
7. Hu, C.M., S. Leuba-Garcia, M.D. Kramer, A. Aeschlimann, and L. Gern. Comparison in the immunological properties of *Borrelia burgdorferi* isolates from *Ixodes ricinus* derived from three endemic areas in Switzerland. 1994. *Epidemiol. Infect.* 112: p. 533-42.
8. Luft, B.J., P.D. Gorevic, W. Jiang, P. Munoz, and R.J. Dattwyler. Immunologic and structural characterization of the dominant 66- to 73- kDa antigens of *Borrelia burgdorferi*. 1991. *J. Immunol.* 146: p. 2776-2782.
9. Ma, B., B. Christen, D. Leung, and C. Vigo-Pelfrey. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. 1992. *J. Clin. Microbiol.* 30: p. 370-376.
10. Norris S.J., C.J. Carter, J.K. Howell, and A.G. Barbour. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. 1992. *Infect. Immun.* 60: 4662-4672.
11. Norris S.J., J.K. Howell, S.A. Garza, M.S. Ferdows, and A.G. Barbour. High- and Low-Infectivity Phenotypes of Clonal Populations of In Vitro-Cultured *Borrelia burgdorferi*. 1995. *Infect. Immun.* 63 : 2206-2212.
12. Péter O. and A.G. Bretz. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. 1992. *Zentralbl. Bakteriол.* 277: p. 28-33.
13. Rabilloud T., C. Adessi, A. Giraudel, and J. Lunardi. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradient. 1997. *Electrophoresis*. 18 : 307-316.
14. Sanchez J.C., D. Hochstrasser, T. Rabilloud. In-gel sample rehydration of immobilized pH gradient. 1999. *Methods Mol. Biol.* 112 : 221-225.
15. Wang, G., A.P. van Dam, A. Le Flèche, D. Postic, O. Péter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: p. 926-932.
16. Wilske, B., V. Preac-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. 1986. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A]*. 263: p. 92-102.
17. Wilske B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, R. Kühlbeck, A.G. Barbour, and M. Kramer. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. 1988. *Ann. NY. Acad. Sci.* 539. 126-143.

18. **Yan J.X., J.C. Sanchez, V. Rouge, K.L. Williams, D.F. Hochstrasser.** Modified immobilized pH gradient gel strip equilibration procedure in SWISS-2DPAGE protocols. 1999. *Electrophoresis*. 20 : 723-726.

Séparation selon le point isoélectrique

5.0

9.0

Séparation selon le poids moléculaire

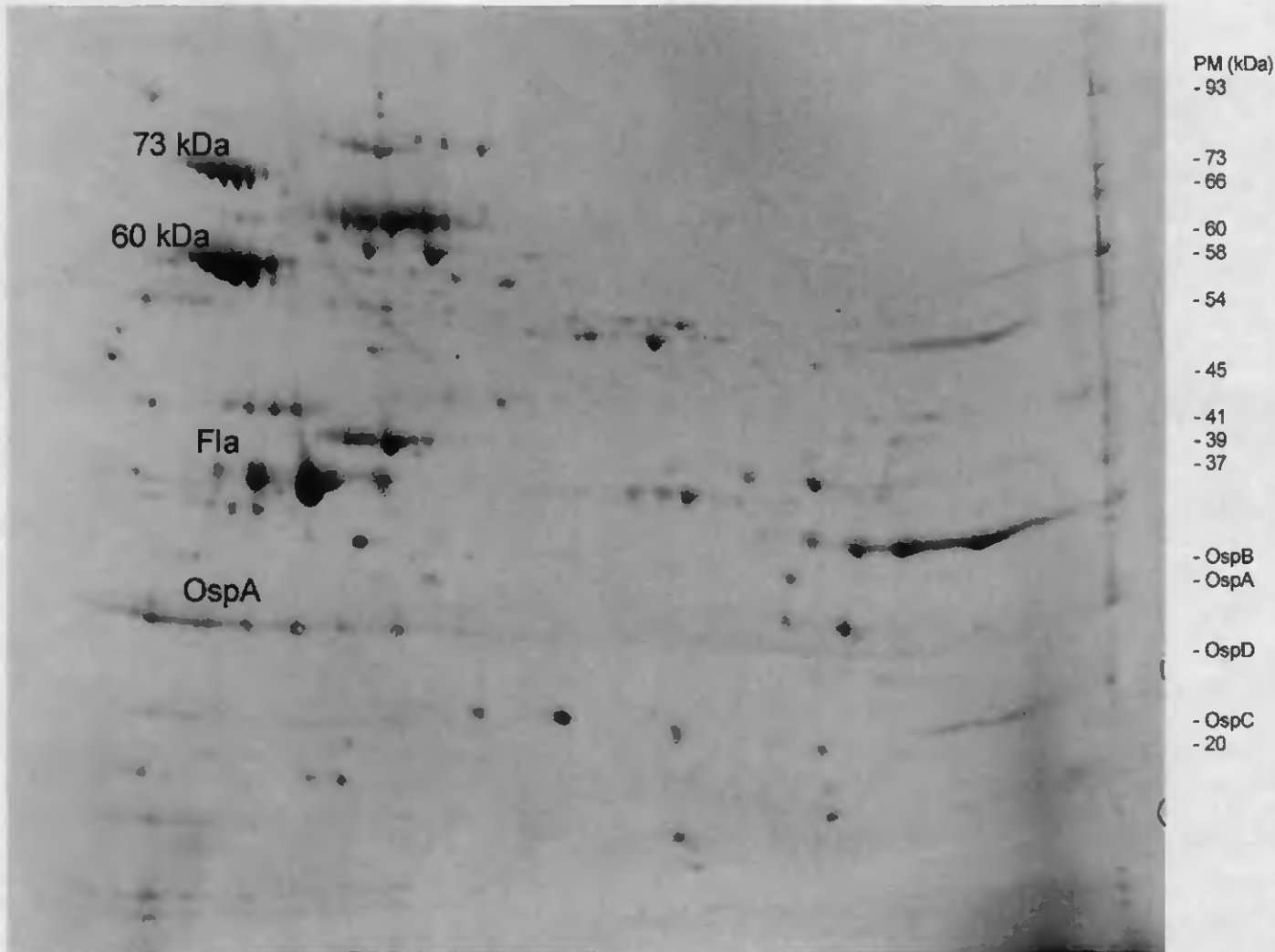


Figure 1

Electrophorèse bidimensionnelle de la souche VS116 (*B. Valaisiana*).
Gel coloré au Coomassie.

3.2.3 Identification of *Borrelia valaisiana* novel species with a monoclonal antibody

Karine Ryffel^{*1}, Bretz A.G.¹, Dayer E.¹ and Péter O.¹

¹ Institut Central des Hôpitaux Valaisans, 1950 Sion-CH

Abstract

Although European *Borrelia* isolates associated with LB were divided into five genospecies, tools for serotypic characterization of only three genospecies were available. *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* could be identified by mAbs H3TS, D6 and I17.3 respectively, but no mAbs were available to identify neither *B. valaisiana* nor *B. lusitanae*.

Introduction

Lyme borreliosis (LB) caused by a spirochetal species *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl.) is a multisystemic illness distributed worldwide [1]. In North America and Eurasia, LB is the most common tick-borne disease [2]. On the basis of protein profiles, DNA-DNA relatedness and rRNA gene restriction pattern, *B. burgdorferi* sl. strains have been previously divided into three species: *B. burgdorferi* sensu stricto (ss.), *B. garinii* and *B. afzelii* [3, 4]. *B. burgdorferi* ss. was found in ticks and patients infected in Europe as well as in North America, whereas *B. garinii* and *B. afzelii* were only found in ticks and patients infected in Eurasia [3, 5]. Afterwards *B. japonica* has been isolated in Japan [6,7]. Recently, *B. turdi*, *B. tanukii*, *B. valaisiana* and *B. lusitanae* have also been described as four novel species [8-10]. *B. turdi* and *B. tanukii* have been isolated from ticks in Japan [10]. *B. valaisiana* and *B. lusitanae* comprised European tick isolates [11]. First isolated in Valais-CH, from an *I. ricinus* tick, VS116 was characterized as *B. valaisiana* novel species by Wang [8]. As other species, it appeared that its geographical distribution was not uniform. In Switzerland, Scandinavia and Netherlands, *B. valaisiana* was less frequently isolated than *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss. In Ireland however, *B. valaisiana* was described as the most prevalent genospecies [12-15].

Although controversial authors are opposed to it, an association between clinical outcome and infection by strains of different genospecies has been suggested. Therefore, genospecies classification may increase the sensitivity of serologic and genetic analysis by appropriate choice of target antigens. Electrophoretic mobility of the major proteins allowed us to distinguish between *Borrelia* genospecies, but monoclonal antibodies (mAb) are used to formally identify species on immunoblots. Up to now, only *B. burgdorferi* ss., *B. garinii* and *B. afzelii* among European isolates could be characterized by mAbs and specific primers (among mAbs, H3TS was directed against OspA of *B. burgdorferi* ss. [16], D6 directed against the 12 kDa protein of *B. garinii* [17] and I17.3 reacted with OspB of *B. afzelii* [4]. Therefore the aim of this study was to obtain a mAb specific to *B. valaisiana*. The major outer surface protein OspA was selected as antigen for the mAbs production, because of its particular proteinic profile and its discriminative potential [18]. In a second time, the successful outcome of this choice led us to propose a primer pair specific to *ospA* gene of *B. valaisiana*.

Material and Method

Bacterial strains

The 105 *Borrelia burgdorferi* sl. strains used in this study are listed in Table 1. Other bacteria with cross-reactivity to *B. burgdorferi* sl. are listed in Table 2.

All strains were grown in MKP medium [19] at 33°C. Extraction of DNA was performed as described previously [20]. *B. burgdorferi* sl. isolates were all characterized by RFLP of amplicons digested by Mse I (Boehringer, Mannheim, Germany) and Dra I (Life technology, CH) as described by Postic [11]. Restriction fragments were subsequently electrophoresed on a 2% agarose gel. *B. turicata*, *B. parkeri*, *B. coriaceae*, *B. anserina*, *B. andersonii* and *B.*

bissettii were kindly provided by T. Schwan (RML, Hamilton-USA). Other bacteria isolates listed on Table 2 were characterized by usual laboratory techniques.

ELISA for screening of hybridomas supernatants

Low-passages, whole-cell of VS215 isolate of *B. burgdorferi* ss., VS102 of *B. garinii*, VS461 of *B. afzelii* and VS116 of *B. valaisiana* were harvested in the log-phase growth, centrifuged and the resulting cell pellet was rinsed twice with PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.2, 0.1M) with $MgCl_2$ 5mM. The cells were suspended in distilled water. Concentrations were equally adjusted to 10 μ g/ml and the four antigens were heated 5 min with 5% SDS at 37°C then 15 min at 95°C. The microwells of the ELISA plates were coated with the four strains in Na_2CO_3 , 0.1 M, and pH 9.6 at 4°C overnight. The wells were washed four times in PBS-T (PBS with 0.01% Tween) and blocked for 1hour with BSA 1% in PBS and again washed four times. Supernatants of hybridomas were diluted 1/3 in PBS-T. Plates were incubated at 37°C for 1 hour and then washed four times with PBS-T. Bound antibody was detected with goat anti-mouse polyvalent conjugated to alkaline phosphatase (Sigma). The conjugate (diluted 1/1000 in PBS-T) was added and incubated at 37°C for 2 hours. After four washing steps, substrate (para-Nitrophenylphosphate, Virion) was added and plate incubated at room temperature for 15 min. ODs were read by a micro plate reader at 405 nm (with reference OD at 620 nm).

Production and characterization of mAb

Antigen preparation:

The strain VS116 was used to produce mAbs specific to *B. valaisiana*. 200 μ g of proteins were separated on a 12% Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page). Gel was cut into three parts. Both external parts were stained with Coomassie blue and used as marks to cut out the OspA band from the medium part of the gel. The OspA portion was thereafter used for immunization and the rest of the gel stained to confirm the extraction of the selected protein.

Immunization:

The immunization kit of ISL (Readysysteme, Zursach, AG-CH) was used. An estimated fraction of 20 μ g proteins of a 12% gel containing the OspA band was incubated 48h with monolayer of support cells provided with the kit. One mouse was sacrificed to harvest the spleen. The splenocytes were incubated four days in immunization medium with 20 μ g of fresh antigen and pre-primed support cells.

Fusion:

Immunized splenocyte suspension was then prepared and mixed with myeloma cells provided with the kit (1 :10 ration with the splenocytes). The cells were fused with polyethylen glycol in HAT (Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine) medium and the resultant hybridomas were seeded into multi-well plates.

Screening:

Four days later, supernatants were screened for antibody production by ELISA and specificity of positive supernatants was then confirmed by using an immunoblot assay with VS215 (*B. burgdorferi* ss.), VS102 (*B. garinii*), VS 461 (*B. afzelii*) and VS116 (*B. valaisiana*) as antigens [18]. The hybridomas which produced specific mAbs reactive to *B. valaisiana* were cloned by the limiting dilution technique.

Isotyping:

Subtyping of mAbs was performed by immunoblot with peroxidase-conjugated rabbit antibodies specific for different isotypes of mouse immunoglobulins.

Results

Five supernatants screened for antibody production by ELISA presented a preferential reactivity to VS116 of *B. valaisiana*. The specificity was nevertheless confirmed on immunoblot by using total protein extracts from VS215 of *B. burgdorferi* ss., VS102 of *B. garinii*, VS461 of *B. afzelii* and VS116 of *B. valaisiana*. All the five mAbs produced were IgA specific to *B. valaisiana*

and reacted with OspA of this species. Because of its strongest reaction with VS116 strain of *B. valaisiana*, A116k mAb was selected for further characterization.

Sensitivity and specificity of A116k mAb was evaluated on immunoblot by testing following controls. A116k mAb did not bind to any protein of the 85 other *B. burgdorferi* sl. isolates belonging to *B. burgdorferi* ss. (n=25), *B. garinii* (n=25), *B. afzelii* (n=25), *B. lusitaniae* (n=5) and *B. japonica* (n=5), showing 100% of specificity. Furthermore an immunoblot was performed with *B. turicata*, *B. parkeri*, *B. coriaceae*, *B. anserina*, *B. andersonii*, *B. bissettii* and 12 bacteria species (Table 2). A116k mAb did not bind to any of them excepted with two proteins (70kDa and 75.3kDa) of *Staphylococcus aureus*. The reactions were nevertheless much weaker than with the OspA of *B. valaisiana* isolates.

Twenty among 24 *B. valaisiana* isolates defined with similar RFLP and protein profiles with VS116 had been easily identified with A116k mAb. However, four isolates (Frank, M7, M53 and NE231) of *B. valaisiana* presented no reactivity with A116k mAb. Therefore, the sensitivity reached 83%.

Discussion

The characterization of *B. valaisiana* was usually proceeded by rRNA gene restriction pattern after digestion by EcoRI and HindIII which contain three and four fragments respectively [8] or by RFLP of amplicons resulting from intergene spacer which contains four fragments [11, 21]. Recently a primer set specific to *ospA* gene of *B. valaisiana* was described to characterize the species [22]. However, no reactivity by immunoblot with specific mAb directed against *B. valaisiana* was proposed.

Phenotypic [17, 18, 23] and genotypic [24] analysis from European strains has demonstrated antigenic and structural heterogeneities of the OspA protein. *B. burgdorferi* ss. as exemplified by VS215 produced an OspA of 31 kDa; *B. garinii* as our isolate VS102 produced a 33 kDa OspA and *B. afzelii* as the reference strain VS461 exhibited a 32 kDa OspA.

However, the molecular weight of OspA proteins of *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* were heterogeneous among species and prevent a phenotypic characterization of this two species without appropriate markers as mAbs. *B. lusitaniae* isolates produced one major protein with variable molecular weight between 32.5 kDa and 34 kDa [9, 25] and the OspA of *B. valaisiana* isolates were in the range of 30 to 36 kDa [8]. Although all *B. valaisiana* strains presented a dominant protein band of 32 to 34 kDa, none of them showed a reaction with OspA specific mAbs : H3TS, LA26 and LA31 (Barbour, Wallich). The OspA protein of 20/24 strains of *B. valaisiana* was recognized by A116k mAb, which however, did not react with any protein bands of Frank, M7 M53 and NE231 isolates (sensitivity 83%). The OspA of these four strains presented a molecular weight lower than that of the reference strain VS116. A lack of amplification of NE231 with the primer set specific to *ospA* gene of *B. valaisiana* was described and a sequence analysis of this gene suggested the presence of a sub-group among *B. valaisiana* strains. M7, M53 and Frank, presenting the same protein profiles than that of NE231 (Figure 1), should be part of this sub-group.

As no reactivity was observed with any other *B. burgdorferi* sl. (specificity 100%) nor with any other species or bacteria, except a weak reactivity with two proteins of *Staphylococcus aureus* (70kDa and 75.3kDa), A116k mAb is a highly specific mAb to characterize *B. valaisiana* isolates. The sensitivity could however be increased by testing the four other mAbs obtained with this immunization. Although the reactivity with *B. valaisiana* isolates was weaker, one of these mAb may present a higher sensitivity to the species. Therefore, further analysis has to be done.

Such markers could present advantages in genospecies classification, which could increase the sensitivity of serologic analysis in clinical detection of Lyme Borreliosis.

Bibliography

1. Steere, A.C., Lyme disease. *N Engl J Med*, 1989. 321(9): p. 586-96.
2. Bennett, C.E., Ticks and Lyme disease. *Adv Parasitol*, 1995. 36: p. 343-405.
3. Baranton, G., D. Postic, I. Saint-Girons, P. Boerlin, J.C. Piffaretti, M. Assous, and P.A.D. Grimont. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. 1992. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 378-383.
4. Canica, M.M., F. Nato, L. du Merle, J.C. Mazie, G. Baranton, and D. Postic. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. 1993. *Scand. J. Infect. Dis.* 25 : 441-448.
5. van Dam A.P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widdjojokusumo, B. M. de Jongh, S. Spanjaard, A. C.T. Ramselaar, M.D. Kramer, and J. Dankert. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. 1993. *Clin. Infect. Dis.* 17 : 708-717.
6. Kawabata, H., T. Masuzawa, and Y. Yanagihara. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol*, 1993. 37(11): p. 843-8.
7. Marconi, R.T., D. Liveris, and I. Schwartz. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(9): p. 2427-34 (CFC)
8. Wang, G., A.P. van Dam, A. Le Flèche, D. Postic, O. Péter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 : 926-932.
9. Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Péter, and G. Baranton. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA. 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 921-925.
10. Fukunaga M., K. Okada, M. Nakao, T. Konishi, and Y. Sato. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. 1996. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 898-905.
11. Postic D., M.V. Assous, P.A. Grimont, and G. Baranton. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. 1994. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 : 743-752.
12. Gray J.S., O. Kahl, J.N. Robertson, M. Daniel, A. Estrada-Pena, G. Gettinby, T.G. Jaenson, P. Jensen, F. Jongejan, F. Korenberg, K. Kurtenbach, and P. Zeman. Lyme borreliosis habitat assessment. 1998. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 211-228.
13. Hubalek Z., and J. Halouzka. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. 1997. *Eur. J. Epidemiol.* 13 : 951-957.
14. Kirstein F., S. Rijpkema, M. Molkenboer, and J.S Gray. The distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. 1997. *Eur. J. Epidemiol.* 13 : 67-72.
15. Saint Girons, I., L. Gern, J.S. Gray, E.C. Guy, E. Korenberg, P.A. Nuttall, S.G.T. Rijpkema, A. Schönberg, G. Stanek, and D. Postic. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. 1998. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: p. 190-195.
16. Barbour, A.G. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol*, 1988. 26(3): p. 475-8.
17. Peter, O. and A.G. Bretz. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. *Zentralbl. Bakteriol*, 1992. 277(1): p. 28-33.
18. Ryffel, K., O. Péter, L. Binet, and E. Dayer. Interpretation of immunoblots for Lyme borreliosis using a semiquantitative approach. 1998. *Clin. Microbiol. and Infect.* 4 : 205-212.

19. **Preac-Mursic, V., B. Wilske, and G. Schierz.** European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A], 1986. 263(1-2): p. 112-8.
20. **Jonsson, M., L. Noppa, A.G. Barbour, and S. Bergstrom.** Heterogeneity of outer membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. comparison of osp operons of three isolates of different geographic origins. Infect Immun, 1992. 60(5): p. 1845-53.
21. **Rijpkema S.G., R.G. Herbes, N. Verbeek-De Kruif, and J.F. Schellekens.** Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. 1996. Epidemiol. Infect. 117 : 563-566.
22. **Ryffel K., F. Mansy, O. Péter, A. Bollen, and E. Godfroid.** Identification of *Borrelia valaisiana* novel species with primers specific to the ospA gene. Submitted for publication. FEMS Microbiol. Lett.
23. **Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, and K.V. Busch.** Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. 1986. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]. 263: 92-102.
24. **Wilske, B., V. Preac-Mursic, U.B. Gobel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, and G. Zumstein.** An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J Clin Microbiol, 1993. 31(2): p. 340-50.
25. **Godfroid E., A. Ben Messaoud, A. Poliszczak, Y. Lobet, and A. Bollen.** Assignment of *Borrelia burgdorferi* strains G25 and VS461 to the *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* genospecies, respectively a comparison of OspA protein sequences. 1995. DNA Seq. 5 : 251-254.

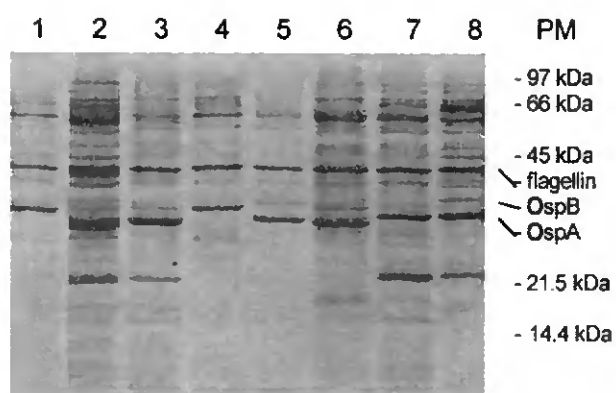


Figure 1 : Coomassie blue stained SDS-page of whole cells of *B. burgdorferi* isolates. Lanes 1 to 8: VS116, NE231, Frank, UK, M7, B31, 20047, VS461. M: Molecular weight standards.

Table 1:
List and reactivity of *B. burgdorferi*
strains tested with the monoclonal
antibody A116k.

<i>B. valaisiana</i>		Reaction with A116k
Valais	VS116	positive
	VS732	positive
Neuchâtel	NE168	positive
	NE218	positive
	NE223	positive
	NE224	positive
	NE225	positive
	NE226	positive
	NE229	positive
	NE230	positive
	NE231	negative
	NE248	positive
	NE253	positive
Argovie	AG1	positive
Allemagne	Frank	negative
	F10894	positive
	Z61193	positive
Pays-Bas	M7	negative
	M19	positive
	M52	positive
	M53	negative
	M57	positive
Angleterre	AR-2	positive
	UK	positive

<i>B. burgdorferi</i> ss.		Reaction with A116k
Allemagne	GeHo	negative
	PKA	negative
France	IPI	negative
	IP2	negative
	2006	negative
Pays-Bas	A44S	negative
Suisse	VS130	negative
	VS215	negative
	VS73	negative
	VS134	negative
	VS137	negative
	VS115	negative
	VS619	negative
	NE49	negative
	VS109	negative
	VS206	negative
	VS396	negative
	NE56	negative
	B31	negative
	HUM3336	negative
USA	CA-2-87	negative
	Charlie tick	negative
	CA55	negative
	297	negative
	CA-5	negative

<i>B. garinii</i>		Reaction with A116k
Angleterre	SO1	negative
Allemagne	PWUDII	negative
	T25	negative
	TN	negative

Chine	PD89	negative
France	20047	negative
Italie	BITS	negative
Japon	HP3	negative
	SIKA1	negative
	SIKA2	negative
Pays-Bas	A77C	negative
	ARI	negative
	A19S	negative
Suède	G25	negative
	NBS16	negative
Suisse	VS100	negative
	VS185	negative
	VS244	negative
	VS277	negative
	VS488	negative
	VS492	negative
	VS711	negative
	VS102	negative
	VS286	negative
	VS641	negative

<i>B. afzelii</i>		Reaction with A116k
Allemagne	PGAU	negative
	PSPE	negative
Chine	M7	negative
Corée	934U	negative
Danemark	DK8	negative
	DK3	negative
Japon	Ipersul	negative
Pays-Bas	A42S	negative
	M55	negative
	A38S	negative
	A26S	negative
	A51T	negative
	A58T	negative
	ACA1	negative
	FI	negative
	SMS1	negative
	VS461	negative
	NE44	negative
	VS018	negative
	VS42R	negative
	VS25R	negative
Suisse	NE36	negative
	NE42	negative
	NE43	negative
	NE39	negative

<i>B. lusitanae</i>		Reaction with A116k
Portugal	Poti B1	negative
	Poti B2	negative
	Poti B3	negative
	BR41	negative
	IR345	negative

<i>B. japonica</i>		Reaction with A116k
	IKA2	negative
	FIAE2	negative
	FIEE2	negative
	FSAE4	negative
	F1340	negative

Table 2 :

List of additional bacterial species tested with the monoclonal antibody A116k

Bacterial species	Reaction with mAb
<i>B. andersonii</i>	negative
<i>B. anserina</i>	negative
<i>B. bissetii</i>	negative
<i>B. coriaceae</i>	negative
<i>B. hermsii</i>	negative
<i>B. parkeri</i>	negative
<i>B. turicata</i>	negative
<i>Aeromonas hydrophila</i>	negative
<i>Candida albicans</i>	negative
<i>Candida krusei</i>	negative
<i>Echerichia coli</i>	negative
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative
<i>Salmonella</i> sp.	negative
<i>Staphylococcus aureus</i>	positive with 70kDa and 75.3kDa proteins
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

3.2.4 Identification of *Borrelia valaisiana* novel species with primers specific to the *ospA* gene.

Authors :

Godfroid Edmond¹, Ryffel Karine², Mansy Frédéric¹, Humair Pierre-François³ and Péter Olivier².

Addresses :

¹Applied Genetics, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, Rue des Professeurs Jeener et Brachet, 12, B-6041 Gosselies, Belgium

²Institut Central des Hôpitaux Valaisans, CH-1950 Sion, Switzerland

³Institut de Zoologie, Rue Emile Argand, 11, CH-2007 Neuchâtel, Switzerland

Keywords : *Borrelia valaisiana*, Lyme disease, species-specific PCR, phylogeny.

***Corresponding author :** Dr Godfroid Edmond, Applied Genetics, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, Rue des Professeurs Jeener et Brachet, 12, B-6041 Gosselies, Belgium

Phone : 32.2.650.99.34; Fax : 32.2.650.99.00 ; E-Mail address : godfroid@sqa.ulb.ac.be

Abstract

The *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex is divided into ten genospecies. *B. valaisiana* has been recently characterised by using phenotyping and genotyping methods. Presently, only *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* can be identified using specific PCR primers. In this study, new primers were designed from *ospA* gene sequences to allow the specific detection of *B. valaisiana* isolates in culture. The analysis of 113 isolates belonging to *B. burgdorferi* sensu lato species and 14 unrelated bacterial species indicated that the sensitivity and the specificity of these primers were 83 % and 94 %, respectively. Comparison of the deduced amino acid sequences of *B. valaisiana* *ospA* genes to those belonging to other *B. burgdorferi* sensu lato genospecies allowed us to identify two distinct genetic sub-groups within the *B. valaisiana* species. This phylogenetic analysis indicated that isolates belonging to subgroup I and II possibly evolved from two distinct ancestors.

Introduction.

Lyme disease is a tick-borne multisystemic illness mainly found in North America and Eurasia and is caused by a spirochetal species called *Borrelia burgdorferi* sensu lato [1]. On the basis of both protein and plasmid profiles, reactivity with monoclonal antibodies, DNA-DNA relatedness, 16S rRNA, flagellin and *ospA* gene sequence analyses, and multilocus enzyme electrophoresis, *B. burgdorferi* sensu lato had previously been divided into 3 species : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* [2 - 4]. These 3 species were detected in ticks and infected patients; however, their geographical distribution varies. *B. burgdorferi* sensu stricto is found throughout Europe and North America, whilst *B. garinii* and *B. afzelii* are located in Eurasia. Six other *B. burgdorferi* sensu lato species - *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. turdi*, *B. tanukii*, *B. bissettii*, and *B. lusitaniae* - have been since discovered [5 - 9]. *B. andersonii* was isolated from ticks in America. *B. japonica*, *B. turdi* and *B. tanukii* were isolated exclusively from ticks in Japan [10]. *B. lusitaniae* comprised tick isolates located in Portugal, Czech Republic, Slovakia, Bielorrussia, and North Africa [8, 11]. Finally, *B. bissettii* included North American isolates [9]. All these new species are considered non pathogenic for humans.

In 1997, a new *Borrelia* species, *B. valaisiana*, was described by Wang and co-workers using genetic and phenotypic methods [12]. Strain VS116, isolated from an *Ixodes ricinus* tick in the Swiss Valais region, is the reference strain of this new species [13]. *B. valaisiana* is found in Europe and Asia; like other species, its geographical distribution is not uniform. For example, it was found to be the most prevalent genospecies in Ireland, but was less frequently isolated than *B. garinii* and *B. afzelii* in Switzerland, Scandinavia and The Netherlands [14, 15]. In addition, *B. valaisiana* may be pathogenic for humans, since DNA specific for this species was detected by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans [16] or by serology in patients with chronic Lyme borreliosis [17]. Presently, *B. valaisiana* isolates have been characterised using either RFLP or RAPD methods [12, 18]. Only *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* can be identified using specific PCR primers [19]. Therefore, in this study, new primers were designed from *ospA* gene sequences to allow the specific detection of *B. valaisiana* isolates in culture and clinical specimens.

Materials and Methods.

Bacterial strains – Genetic and immunological classification of the strains.

One hundred and twenty four *B. burgdorferi* sensu lato strains (Table 1), 5 unrelated *Borrelia* species (*B. anserina*, *B. coriaceae*, *B. hermsii*, *B. parkeri*, *B. turicatae*), and 9 other bacterial species (*Aeromonas hydrophilia*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*) were used in this study. *Borrelia* cultures were maintained in MKP medium at 33°C [20]. During the late log phase of growth, the culture was centrifuged at 14'000 g for 15 minutes and washed twice in PBS pH 7.2 with addition of MgCl₂ (0.05M). Extraction of DNA was performed as described previously [21]. *B. burgdorferi* sensu lato isolates were characterised by RFLP as described by Postic [18]. Restriction fragments were subsequently electrophoresed on a 2.0 % agarose gel. The restriction profile of each isolate was compared to those obtained with reference strains belonging to each species (B31 for *B. burgdorferi* sensu stricto, strain 20047 for *B. garinii*, VS461 for *B. afzelii*, PotiB2 for *B. lusitaniae*, DN127 for *B. bissettii*, strain 21123 for *B. andersonii*, strain IKA2 for *B. japonica*, and finally VS116 for *B. valaisiana*). Moreover, some *B. burgdorferi* sensu lato strains were defined by reactivity with specific monoclonal antibodies (mAb) : *B. burgdorferi* sensu stricto isolates (n=25) with H3TS mAb, *B. garinii* isolates (n=25) with D6 mAb, and *B. afzelii* isolates (n=25) with I17.3 mAb. The RFLP pattern and reactivity with monoclonal antibody allowed us either to confirm the belonging of some isolates to a specific genospecies or to classify new isolates in their corresponding genospecies. *B. turicatae*, *B. parkeri*, *B. coriaceae*, *B. anserina* were kindly provided by T. Schwan (Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana USA). Other bacteria isolates were characterized by usual laboratory techniques.

PCR assay.

Based on the comparison of *ospA* sequences, the following oligonucleotide primers specific to *B. valaisiana* were used in this study :

5'-TGCTGAAAATGCTACAAAAGCAGT-3' (forward primer) and

5'-CAAGACAAAACCTTGTATTTACAAAAC-3' (reverse primer). PCR assays were performed with a Perkin Elmer 9600 thermocycler. Taq DNA polymerase, the four deoxynucleotide triphosphates and the reaction buffer were used as recommended by the supplier (Qiagen, Basel, Switzerland). Twenty pmol of each primer were used per 50 µl reaction mixture. About 100 ng of total genomic DNA was amplified for 40 cycles under the following conditions : 94°C, 3 min.; 40 cycles (60°C for 1 min, 72°C for 1 min, 94°C for 1 min) 60°C for 1 min, 72°C for 7 min, 4°C. PCR amplification products were resolved onto 1.0 % agarose electrophoresis gels and visualised under U.V. light using ethidium bromide. Physical containment measures warranted the absence of DNA contamination in the PCR procedure, yielding negative results.

Computer analysis, nucleotide sequence and accession numbers.

Sequence alignments and the construction of the phylogenetic tree were done with both Pileup and Growtree facilities of the Genetics Computer Group sequence analysis software package (version 10.0, January 1999; University Research Park, Madison, Wisconsin 53711, U.S.A.). The default parameter values were used. Neighbor-Joining method was used to construct the phylogenetic tree on the basis of amino acid sequence similarity matrix of the *OspA* proteins.

The *ospA* sequences have been assigned accession numbers Y10837, Y10838, AF095047, AF095943, Y10841, AF095942, Y10840, X68059, X85442, X14407, X16467, S88693, Y10897, Y10893, Y10892, X62387, Z29087, Y10896, X85441, Z29086, S48323, AB007101, U93707, U93705, AB007110, X80256, and X80254 for *Borrelia* strains PotiB1, PotiB2, M53, M7, UK, AR-2, VS116, 19857, 297, B31, ZS7, 25015, DN127, HO14, IKA2, Pgau, VS461, VS100, WABSOU, G25, Pbi, F518, JEM3, JEM1, U006, PBr, and T25, respectively. The *ospA* sequence of the *Borrelia* strain Ip90 has been published [21].

The nucleotide sequence of *ospA* gene from strain NE231 was determined by the dideoxy chain termination technique with the "Prism ready reaction dye deoxy-terminator cycle sequencing" kit (Applied Biosystem). The *ospA* sequence of NE231 has been entered in the EMBL/Genbank data bases with accession number AJ249467.

Results and discussion.

Comparison of *ospA* gene sequences from isolates belonging to all known *B. burgdorferi* sensu lato species led us to the identification of oligonucleotide primers that were able to amplify a 269 bp DNA fragment specific to *B. valaisiana*. Forward and reverse primers are located on the sequence of the *ospA* gene of *B. valaisiana* VS116 isolate at nucleotide position 453 to 476 and 696 to 721, respectively.

The detection threshold of this PCR assay was determined by performing amplification reactions on a controlled number of cells. A stock sample of *B. valaisiana* strain VS116 was serially diluted in phosphate saline buffer. The number of *Borrelia* cells ($\pm 2.0 \times 10^7$ cells/ml) in the stock sample was determined by dark-field microscopy, and aliquots of the dilution were tested for amplification using these primers. It was found that a template DNA input corresponding to about 5 spirochetes was sufficient to detect the expected amplified fragment in 10 % of the reaction volume (data not shown). No signal was observed when template DNA was omitted from the amplification reaction.

The specificity of the PCR assay was evaluated on 113 *B. burgdorferi* sensu lato strains and 14 unrelated bacterial species (Table 1). Three *B. garinii* (SO1, BITS, and VS711), one *B. lusitanae* (BR41) and one *B. afzelii* (DK3) strains were positive. The specificity was therefore 94 %. None of the 14 unrelated bacteria showed an amplified product with this primer pair. Twenty out of the 24 *B. valaisiana* strains had an amplified product at the expected size (Table 1). The strains NE231, Frank, M7 and M53 were not amplified with these primers. The estimated sensitivity was then 83 %.

To understand the fact that there was no amplification of the expected *ospA* DNA fragment with these four strains, the complete *ospA* gene of the NE231 strain was amplified, cloned and sequenced (accession number : AJ249467). Comparison and alignment of the NE231 *OspA* deduced amino acid sequence with those of 28 *B. burgdorferi* sensu lato strains yielded a phylogenetic tree. Based on these comparisons, the 6 analysed *B. valaisiana* strains (UK, AR-2, VS116, M53, M7 and NE231) were divided into 2 subgroups (Figure 1). Subgroup I appears to be phylogenetically related to the *B. andersonii* genospecies whilst subgroup II seems to be linked to *B. lusitanae*. The subgroup I consists of 3 *B. valaisiana* isolates (UK, AR-2 and VS116). The amino acid sequences of *OspA* from these isolates were 98.9 % to 99.6 % homologous (Table 2). Subgroup II contains 3 *B. valaisiana* isolates (M53, M7 and NE231). *OspA* sequences of M7 and M53 are identical. These two sequences have a homology of 98.5 % (4 amino acid substitutions) with the *OspA* sequence of strain NE231. The average identity of the deduced amino acid sequences of the *OspA* proteins between subgroup I and II is about 69.9 %, and between *B. valaisiana* and representative isolates from other *B. burgdorferi* sensu lato species varies from 62.1 % to 75 %. Although these data are based on the comparison of few *B. valaisiana* *OspA* sequences to those of representative isolates belonging to *B. burgdorferi* sensu lato, the results suggest that the two aforementioned subgroups have two distinct ancestors. This high heterogeneity within the *B. valaisiana* species was not revealed by using standard genotyping methods such as RAPD [12] and RFLP [18, 22] and therefore could be specific to the *ospA* gene. The heterogeneity of the *ospA* gene sequences was previously reported within the *B. garinii* species [23, 24, 25]. Our data indicated that such major *ospA* gene differences also occur within another *Borrelia* genospecies. The *ospA* gene encodes an outer membrane lipoprotein which is differentially expressed by *B. burgdorferi* sensu lato in ticks and in mammals [26]. Although the role of the *OspA* protein is not well understood, *OspA* may be important in the bacterium-host interaction. Studies have indicated

that OspA protein possesses B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. It seems also that OspA may play a role in the adherence of *B. burgdorferi* sensu lato to different eucaryotic cells. Taking into account all these features, the heterogeneity observed within the OspA protein sequences could be a key factor in the infection of specific hosts.

In conclusion, a new set of primers was designed to amplify specifically a DNA fragment from the *ospA* gene of *B. valaisiana* isolates. These primers were able to amplify all the *B. valaisiana* isolates analysed except for strain NE231. Comparison of the deduced amino acid sequences of the NE231 *ospA* gene to those belonging to *B. burgdorferi* sensu lato allowed us to identify two distinct genetic sub-groups within the *B. valaisiana* species. Phylogenetic analysis indicated that isolates belonging to subgroup I and II possibly evolved from two distinct ancestors. In the near future, these new primers will be evaluated on clinical specimens. These epidemiological and clinical studies could establish the human pathogenicity of the *B. valaisiana* species.

Acknowledgments

This research was supported by the Swiss National Science Foundation (No 32-52739.97) and the Foundation for research and development from the ICHV. This work is part of the PhD dissertation of K. Ryffel

References

1. Bennett, C.E. (1995) Ticks and Lyme disease. *Adv. Parasitol.* 36, 343-405.
2. Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M. and Grimont P.A.D. (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 378-383.
3. Boerlin, P., Péter, O., Bretz, A.G., Postic, D., Baranton, G., and Piffaretti, J.C. (1992) Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect. Immun.* 60, 1677-1683.
4. Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G. and Postic, D. (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25(4), 441-448.
5. Kawabata, H., Masuzawa, T. and Yanagihara, Y. (1993) Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* 37(11), 843-848.
6. Marconi, R.T., Liveris, D. and Schwartz, I. (1995) Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33(9), 2427-2434.
7. Barbour, A.G., Maupin, G.O., Teltow, G.J., Carter, C.J. and Piesman, J. (1996) Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. *J. Infect. Dis.* 173(2), 403-409
8. Le Fleche, A., Postic D., Girardet K., Péter O. and G. Baranton (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(4), 921-925.
9. Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Hendson, M. and Baranton, G. (1998) Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.* 36(12), 3497-3504.
10. Fukunaga, M., Okada, K., Nakao, M., Konishi, T. and Sato, Y. (1996) Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(4), 898-905.
11. Gern L., Hu, C.M., Kocianova, E., Vyrostekova, V. and Rehacek, J. (1999) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.*, *in press*.
12. Wang, G., van Dam, A.P., Le Flèche, A., Postic, D., Péter, O., Baranton G., de Boer, R., Spanjaard, L. and Dankert, J. (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(4), 926-932.
13. Péter, O. and Bretz, A.G. (1992) Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. *Zentralbl. Bakteriol.* 277(1), 28-33.
14. Saint-Girons, I., Gern, L., Gray, J.S., Guy, E.C., Korenberg, E., Nuttall, P.A., Rijpkema, S.G., Schonberg, A., Stanek, G. and Postic, D. (1998) Identification of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in Europe. *Zentralbl. Bakteriol.* 287(3), 190-195
15. Humair P.F., Postic D., Wallich R., and Gern L. (1998) An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochete. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg.* 287, 521-38.
16. Rijpkema, S.G., Tazelaar, D., Molkenboer, M., Noordhoek, G., Plantinga, G., Schouls, L. and Schellekens, J. (1997) Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin. Microbiol. Infect.* 3, 109-116.
17. Ryffel, K., Péter O., Rutti B., Suard A. and E. Dayer. (1999) Scored antibody reactivity by immunoblot suggests some organotropism of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. valaisiana* in human. *J. Clin. Microbiol.* 37, *in press*.

18. Postic, D., Assous, M.V., Grimont, P.A. and Baranton, G. (1994) Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4), 743-752.
19. Demaerschalck I., Messaoud, A.B., de Kesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoet, P., Bigaignon, P., Bollen, A., and Godfroid, E. (1995). Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 602-608.
20. Preac-Mursic, V., Wilske, B. and Schierz, G. (1986) European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 263(1-2), 112-118.
21. Jonsson, M., Noppa, L., Barbour, A.G. and Bergstrom, S. (1992) Heterogeneity of outer membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*: comparison of osp operons of three isolates of different geographic origins. *Infect. Immun.* 60(5), 1845-1853.
22. Rijpkema, S.G., Herbes, R.G., Verbeek-De Kruif, N., and Schellekens, J.F. (1996) Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 117(3), 563-566.
23. Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E. and Zumstein, G. (1993) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31(2), 340-350.
24. Godfroid, E., Messaoud A., Poliszczack A., Lobet Y., and Bollen A. (1995) Assignment of *Borrelia burgdorferi* strains G25 and VS461 to the *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* genospecies, respectively: a comparison of OspA protein sequences. *DNA Sequence* 5(4), 251-254.
25. Mathiesen, D.A., Oliver, J.H. Jr, Kolbert, C.P., Tullson, E.D., Johnson, B.J., Campbell, G.L., Mitchell, P.D., Reed, K.D., Telford, S.R., Anderson, J.F., Lane, R.S. and Persing, D.H. (1997) Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the United States. *J. Infect. Dis.* 175(1), 98-107.
26. De Silva, A.M. and Fikrig, E. (1997) Arthropod- and host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Invest.* 99(3), 377-9.

Table 1. *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains used in this study.

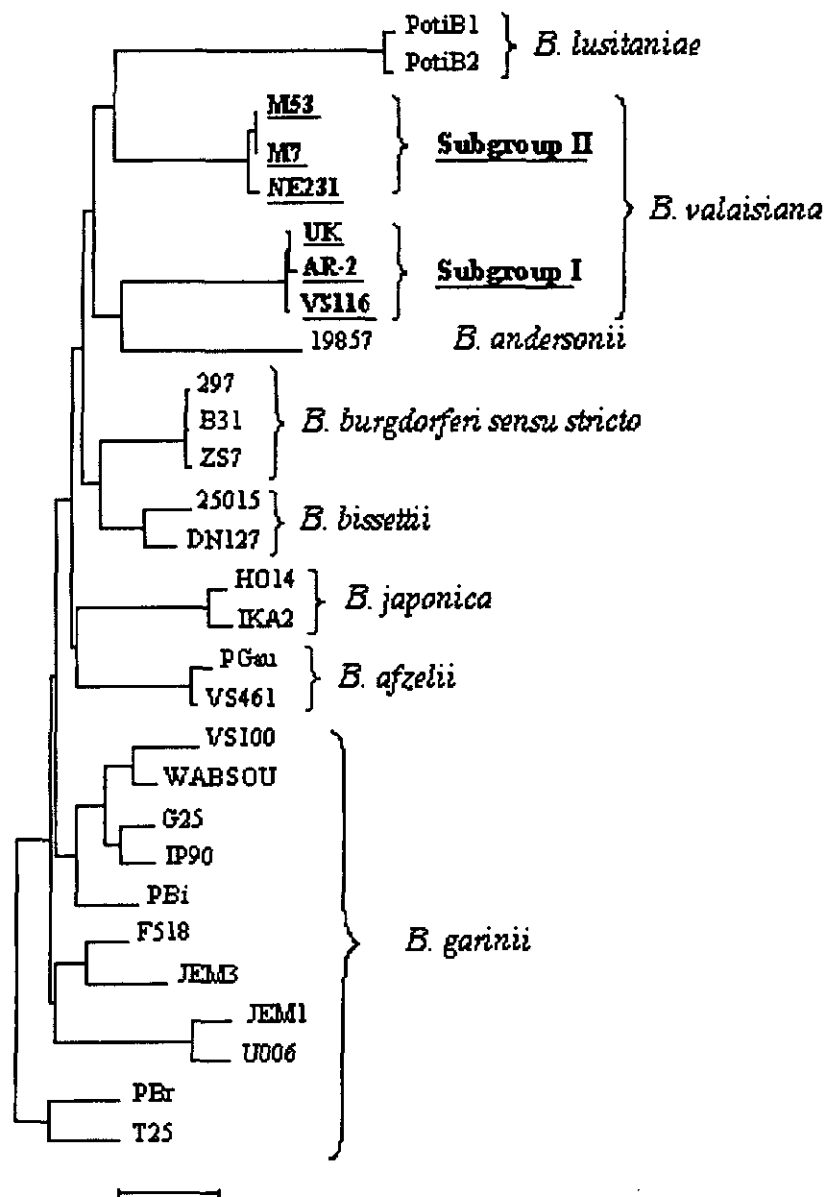
Species and strain	Biological source	Geographical origin	PCR results
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (n = 25)			
GeHo	Human skin	Germany	neg
PkA	Human skin	Germany	neg
IPI	Human cerebrospinal fluid	France	neg
IP2	Human cerebrospinal fluid	France	neg
20006	<i>I. ricinus</i>	France	neg
A44S	Human skin	The Netherlands	neg
VS130	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS215	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS73	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS134	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS137	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS115	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS619	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
NE49	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS109	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS206	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS396	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
NE56	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
B31	<i>I. scapularis</i>	United States	neg
HUM3336	<i>I. pacificus</i>	United States	neg
CA-2-87	<i>I. pacificus</i>	United States	neg
Charlie tick	<i>I. dammini</i>	United States	neg
CA55	<i>I. neotomae</i>	United States	neg
297	Human cerebrospinal fluid	United States	neg
ZS7	<i>I. ricinus</i>	Germany	n.d.
<i>B. garinii</i> (n = 33)			
SO1	<i>I. ricinus</i>	Great Britain	positive
PWUDII	<i>I. ricinus</i>	Germany	neg
T25	<i>I. ricinus</i>	Germany	neg
TN	<i>I. ricinus</i>	Germany	neg
PD89	Human blood	China	neg
20047	<i>I. ricinus</i>	France	neg
BITS	<i>I. ricinus</i>	Italy	positive
HP3	<i>I. persulcatus</i>	Japan	neg
SIKA1	<i>I. ovatus</i>	Japan	neg
SIKA2	<i>I. persulcatus</i>	Japan	neg
A77C	Human cerebrospinal fluid	The Netherlands	neg
AR-1	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	neg
A19S	Human skin	The Netherlands	neg
G25	<i>I. ricinus</i>	Sweden	neg
NBS16	<i>I. ricinus</i>	Sweden	neg
VS100	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS185	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS244	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS277	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS488	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS492	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS711	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	positive
VS102	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS286	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS641	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
WABSOU	Human skin	Austria	n.d.
IP90	<i>I. persulcatus</i>	Russia	n.d.
PBi	Human cerebrospinal fluid	Germany	n.d.

F518	<i>I. persulcatus</i>	Japan	n.d.
JEM1	Human skin	Japan	n.d.
JEM3	Human skin	Japan	n.d.
U006	<i>I. persulcatus</i>	Japan	n.d.
PBr	Human cerebrospinal fluid	Germany	n.d.
<i>B. afzelii</i> (n = 25)			
PGAU	Human skin	Germany	neg
PSPE	Human cerebrospinal fluid	Germany	neg
M7	<i>I. persulcatus</i>	China	neg
934U	Rodent (<i>Apodemus agrarius</i>)	Corea	neg
DK8	Human skin	Danemark	neg
DK3	Human skin	Danemark	positive
Ipersul	<i>I. persulcatus</i>	Japan	neg
A42S	Human skin	The Netherlands	neg
M55	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	neg
A38S	Human skin	The Netherlands	neg
A26S	Human skin	The Netherlands	neg
A51T	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	neg
A58T	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	neg
ACA1	Human skin	Sweden	neg
F1	<i>I. ricinus</i>	Sweden	neg
SMS1	Rodent (<i>A. flavicollis</i>)	Sweden	neg
VS461	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
NE44	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS018	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	neg
VS42R	Rodent (<i>A. sylvaticus</i>)	Switzerland	neg
VS25R	Rodent (<i>A. flavicollis</i>)	Switzerland	neg
NE36	Rodent (<i>Clethrionomys glareolus</i>)	Switzerland	neg
NE42	Rodent (<i>C. glareolus</i>)	Switzerland	neg
NE43	Rodent (<i>C. glareolus</i>)	Switzerland	neg
NE39	Rodent (<i>C. glareolus</i>)	Switzerland	neg
<i>B. lusitanae</i> (n = 5)			
Poti B1	<i>I. ricinus</i>	Portugal	neg
Poti B2	<i>I. ricinus</i>	Portugal	neg
Poti B3	<i>I. ricinus</i>	Portugal	neg
BR41	<i>I. ricinus</i>	Czech Republic	positive
IR345	<i>I. ricinus</i>	Bielorussia	neg
<i>B. japonica</i> (n = 6)			
IKA2	<i>I. ovatus</i>	Japan	neg
FIAE2	Rodent (<i>A. speciosus</i>)	Japan	neg
FIEE2	Rodent (<i>Eothenomys smithi</i>)	Japan	neg
FSAE4	Rodent (<i>A. argenteus</i>)	Japan	neg
FI340	<i>I. ovatus</i>	Japan	neg
HO14	<i>I. ovatus</i>	Japan	n.d.
<i>B. andersonii</i> (n = 3)			
21123	<i>I. dentatus</i>	United States	neg
19952	<i>I. dantatus</i>	United States	neg
19857	<i>I. dentatus</i>	United States	n.d.
<i>B. bissettii</i> (n = 3)			
DN127	<i>I. pacificus</i>	United States	neg
25015	<i>I. scapularis</i>	United States	neg
CA128	<i>I. neotomae</i>	United States	neg
<i>B. valaisiana</i> (n = 24)			
VS116	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	positive
VS732	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	positive

NE168	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	positive
NE218	Bird skin (Turdus merula)	Switzerland	positive
NE223	Bird skin (T. merula)	Switzerland	positive
NE224	Bird skin (T. merula)	Switzerland	positive
NE225	Bird skin (T. merula)	Switzerland	positive
NE226	<i>I. ricinus (xenodiagnose/bird)</i>	Switzerland	positive
NE229	<i>I. ricinus (xenodiagnose/bird)</i>	Switzerland	positive
NE230	<i>I. ricinus (xenodiagnose/bird)</i>	Switzerland	positive
NE231	<i>I. ricinus (xenodiagnose/bird)</i>	Switzerland	neg
NE248	<i>I. ricinus (xenodiagnose/bird)</i>	Switzerland	positive
NE253	<i>I. ricinus (xenodiagnose/bird)</i>	Switzerland	positive
AG1	<i>I. ricinus</i>	Switzerland	positive
Frank	<i>I. ricinus</i>	Germany	positive
F10894	<i>I. ricinus</i>	Germany	positive
Z61193	<i>I. ricinus</i>	Germany	positive
M7	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	positive
M19	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	positive
M52	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	positive
M53	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	positive
M57	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	positive
AR-2	<i>I. ricinus</i>	The Netherlands	positive
UK	<i>I. ricinus</i>	Great Britain	positive

Table 2. Amino acid identity matrix of the OspA proteins from different *B. burgdorferi* sensu lato species.

Species and strain		% identity																		
<i>B. lusitanae</i> PotB1		100																		
<i>B. japonica</i> HO14			100,0																	
<i>B. garinii</i> PBr				100,0																
<i>B. afzelii</i> Pgau					100,0															
<i>B. afzelii</i> VS461						100,0														
<i>B. garinii</i> VS100							100,0													
<i>B. garinii</i> G25								100,0												
<i>B. garinii</i> F518									100,0											
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto B31										100,0										
<i>B. bissettii</i> DN127											100,0									
<i>B. valaisiana</i> M53												100,0								
<i>B. valaisiana</i> M7													100,0							
<i>B. valaisiana</i> NE231														100,0						
<i>B. garinii</i> JEM1															100,0					
<i>B. valaisiana</i> UK																100,0				
<i>B. valaisiana</i> VS116																	100,0			
<i>B. valaisiana</i> AR-2																		100,0		
<i>B. andersonii</i> 19857																			100,0	
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto B31																				100,0
<i>B. bissettii</i> DN127																				
<i>B. valaisiana</i> M53																				
<i>B. valaisiana</i> M7																				
<i>B. valaisiana</i> NE231																				
<i>B. garinii</i> JEM1																				
<i>B. valaisiana</i> UK																				
<i>B. valaisiana</i> VS116																				
<i>B. valaisiana</i> AR-2																				
<i>B. andersonii</i> 19857																				



Legend to figure.

Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of OspA proteins of 6 *B. valaisiana* isolates and 23 *B. burgdorferi* sensu lato isolates representing different *Borrelia* species. The phylogenetic tree was constructed by using Genetics Computer Group sequence analysis software package as described in the text.

3.3 Implication clinique de *Borrelia valaisiana*

3.3.1 Scored antibody reactivity by immunoblot shows an association between clinical manifestations and *Borrelia burgdorferi* ss., *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. valaisiana* in humans

Karine Ryffel¹, Olivier Péter *¹, Bernard Rutti ², André Suard ³ and Eric Dayer ¹

¹ Maladies infectieuses et Immunologie, Institut Central des Hôpitaux Valaisans, 1950 Sion-CH

² Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, 2007 Neuchâtel-CH

³ Dermatologist, 1870 Monthey-CH

Published in Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1999. p. 4086-4092.

Dr Olivier Péter, PhD
Maladies infectieuses et Immunologie
Institut Central des Hôpitaux Valaisans
CH-1950 Sion, Switzerland
e-mail: olivier.peter@ichv.vsnet.ch
fax: ++41 27 203 29 75
tel: ++41 27 324 53 91

ABSTRACT

An IgG immunoblot was developed with antigenic extracts of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. valaisiana* genospecies and reacted with sera from patients with neuroborreliosis, acrodermatitis and arthritis. A detailed analysis of the reactivity of protein bands was performed and a two-step scoring procedure was selected to determine the preferential reactivity of sera to one particular genospecies. The discriminative potential of five proteins (12 kDa, 16 kDa, 18 kDa, OspA and 66 kDa) was used as a rapid first-step scoring method followed by scoring 14 additional protein bands if necessary. This procedure presented the advantage of a low percentage of sera with inconclusive results to one of the four species (10% for patients with neuroborreliosis, 6% for patients with acrodermatitis chronica atrophicans and 6% for patients with arthritis). Among 31 sera of patients with neuroborreliosis, 16 were more reactive to *B. garinii*, seven to *B. afzelii*, three to *B. valaisiana* and two to *B. burgdorferi* sensu stricto. Out of 31 sera of patients with acrodermatitis, 26 showed a higher reactivity to *B. afzelii*. Out of 34 sera of patients with arthritis, 21 were more reactive to *B. burgdorferi* sensu stricto, ten to *B. afzelii* and one to *B. valaisiana*. Our results suggest an organotropism of *Borrelia* species and provide some evidence of a pathogenic potential of *B. valaisiana* in humans.

Introduction

Lyme borreliosis (LB) is a tick-borne multistage disease caused by spirochetal bacterium, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl.). *B. burgdorferi* sl. is divided into several species on the basis of phenotypic and genotypic characteristics [35]. In Europe, five species of *B. burgdorferi* sl. have been isolated from *Ixodes ricinus*: *B. burgdorferi* sensu stricto (ss.), *B. garinii*, *B. afzelii* [4, 9], Group VS116 classified as *B. valaisiana* novel species [44] and *B. lusitaniae* [24].

It appears that the geographic distribution of these species is not uniform, even in close neighborhood [34]. However, in Western Europe and in Switzerland *B. garinii* is more frequently isolated, followed by *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss. and *B. valaisiana* respectively [39]. In Scandinavia and The Netherlands *B. afzelii* is probably the most common *Borrelia* [36, 42] followed by *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* ss. and *B. garinii*. In Ireland, *B. valaisiana* is described as the most prevalent genospecies followed by *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss. and *B. afzelii* [23]. *B. lusitaniae* first isolated from *I. ricinus* in Portugal was subsequently isolated from ticks in other European countries [24].

After the bite of an infected tick, the spirochetes undergo an hematogenous dissemination and can be found in many of the major organ systems. The first stage and hallmark of LB is a distinctive skin rash, erythema migrans (EM), that frequently appears at the site of the tick bite [40]. Days to months after the tick bite, the disease may progress towards secondary and tertiary stages. In some patients, chronic diseases may develop which may affect the skin, such as acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), a clinical manifestation primarily observed in Europe, possibly affects joints with arthritis, which is more common in the USA [40]. In Europe, neurological symptoms appear in 30% of untreated patients and musculoskeletal symptoms in 20% of patients [1]. These observations have suggested that clinical outcome could depend on infection by strains of different genospecies. Neurological symptoms are thought to be mainly caused by *B. garinii*, while *B. afzelii* is often associated with ACA and *B. burgdorferi* ss. with arthritis [3, 13, 32, 42]. However, controversial reports described a good match between the distribution of *Borrelia* sl. in ticks and in patients of the same area [14] or an organotropism linked to strain-specific characteristics, not to genotypes [45]. Furthermore, the pathogenic potential of *B. valaisiana* was described by PCR among patient with EM [37] but there is no indication of a potential association of *B. valaisiana* with chronic clinical symptoms.

Immunoblot is unanimously reported to be a confirmatory test for LB. One of the factors affecting the performance of this assay is the polymorphism of *Borrelia* antigens which is evident among species and intraspecies. Norman et al [30] described that the preferential reactivity to genospecies is not absolute and that regional variations in the reactivity to the

genospecies strains may occur. The purpose of the current study was to compare IgG immunoblot of four different *Borrelia* genospecies present in Switzerland [34]. Therefore, we tested sera of patients living in Switzerland. In order to decrease the percentage of sera with inconclusive predominance to one of the four species we modified the scoring method described by Péter [32]. Preferential reactivity of sera led us to confirm the association between some manifestations of the LB and the species of *B. burgdorferi* sl..

Material and methods

Study samples

Serum samples from Swiss patients with a clinical diagnosis of late LB and a positive screening test confirmed by immunoblot were collected among referred sera for confirmatory diagnostic procedure. They included 31 patients with neuroborreliosis, 31 patients with ACA and 34 patients with Lyme arthritis. Sera of patients with several symptoms of LB were excluded. Among serum samples from patients with neuroborreliosis, all were confirmed by intrathecal antibodies synthesis. The index of intrathecal antibodies production was calculated as follows: IgG specific CSF/serum divided by albumin CSF/serum (negative below 2.0).

In order to establish the persistence of the reactivity to the infecting species after antibiotic therapy, parallel sera from patients were tested. Patients with neuroborreliosis (2), ACA (6) and arthritis (1) were selected. The first sera were taken during the first clinical visit, the second six months to five years after treatment.

Antigen preparation

Borrelia strains, *B. burgdorferi* ss. (VS215), *B. garinii* (VS102), *B. afzelii* (VS461) and *B. valaisiana* (VS 116) were used for antigen preparations [32, 44]. All strains were isolated from ticks (*I. ricinus*) [33]. Spirochetes were cultured in BSK II medium (Sigma, St-Louis MI, USA). During the late log phase growth, the culture was centrifuged at 14'000 g for 15 minutes and washed twice in PBS pH 7.2 with addition of MgCl₂ (0.05 M). The protein concentration of the suspension was determined by the Biuret method and adjusted to 1 mg/ml in distilled water. Washed *Borrelia* were stored at -20°C until use [34]. Isolates used in this study were all low-passage strains. Prior to western blotting, all antigen preparations were adjusted to contain equal amount of p41, knowing that it is rather constant in all strains [16, 50], quantified by serial dilution using Coomassie blue-stained immunoblot and a densitometry analysis program.

Electrophoresis and Immunoblot

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page) and western blot were performed by standard procedure [33]. Briefly, samples were heated 5 minutes at 95°C before undergoing electrophoresis on polyacrylamide gel at 12.5% (Constant Voltage 170V). After electrophoresis proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane and cut into strips.

Before use, strips were blocked for 1 hour at 37°C with Tris buffer saline (TBS) pH 7.2 with 5% gelatin and washed 3 times for 5 minutes with washing-buffer (W-buffer) (TBS with 0.1% of gelatin and 0.05% Tween 20) at room temperature. Each step of this procedure was performed at room temperature. The four antigen strips were incubated for 2 hours with patient serum diluted 1/500 in D-buffer (TBS with 1% of gelatin and 0.05% Tween 20). Strips were washed 3 time for 5 minutes with W-buffer. After washing, rabbit anti-human IgG conjugated to alkaline phosphatase diluted 1/1000 in D-buffer was added. At the end of the second 2-hour incubation, two washes were proceeded with W-buffer and one with TBS. The bound conjugate was visualized by addition of the chromogenic substrate BCIP/NBT (Kirkegaard and Perry laboratories). The reaction was stopped ten to fifteen minutes later by two rinses in distilled water. Incubations were always performed with all the strips of each antigen in the same well.

Characterization of protein bands

Reproducibility was confirmed by repeat probing of immunoblot strips from different gels with four sera preferentially reactive with each species. In all strains the 39 kDa could be clearly differentiated from the flagellin (41 kDa), the 30 kDa from OspA and the 58 kDa from 60 kDa.

Blots were analyzed visually by one person and interpretation was confirmed independently by an other one. Since only minor divergences were observed for the typing of the serological reactions between the two readers, we used the classification of one reader only. For comparison between the four strips, scores were allocated (0-3 points) depending on the

presence and intensity of the reaction to 19 proteins of *Borrelia*: 93 kDa (p100), 75 kDa, 66 kDa, 60 kDa, 58 kDa, 54-56 kDa, 45 kDa, 41 kDa (flagellin), p39, 35 kDa, OspA, 30 kDa, OspD, OspC, 20 kDa, 18 kDa, 16 kDa, 14 kDa and 12 kDa. Some of these proteins were identified in the four *Borrelia* species by monoclonal antibodies: LA 114 Zs7 (93 kDa), sl60 (60 kDa), H9724 (Flagellin), LA 112 Zs7 (39 kDa) and LA 22 2B8 (OspC) (kindly provided by A.G. Barbour, University of California, Irvine, CA, USA; R. Wallich, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Germany; B. Wilske, Max von Pettenkofer Institut, München, Germany). OspA was identified with two different monoclonal antibodies, H5332 (reactive with VS215, VS102 and VS461) and A116k (reactive with *B. valaisiana*). A report characterizing the A116k monoclonal antibody is in preparation. The other proteins were identified in the four *Borrelia* species by specific serum reactivities and the software of molecular analyst. (Figure 1, Table 1)

Determination of the predominant reactivity for each species

To determine preferential reactivity of sera, a detailed analysis was performed. Five out of 13 proteins with a discriminative potential were selected (12 kDa, 16 kDa, 18 kDa, OspA and 66 kDa) and used as a rapid first-step scoring procedure (method I). A total score of these five proteins superior by two points for one individual species compared with the others was considered as a preferential reactivity. If one could not be found, the score of all 19 protein bands was taken into account (method II). A total score superior by three points for one individual species compared with the other species was considered as a preferential reactivity. The differential number of scored points necessary to define this preferential reactivity to one particular species, was established on the basis of a previous statistical study [32].

Comparison of immunoreactivity with genotypic detection

Oligoprimers recognizing OspA sequences of most *B. burgdorferi* strains [11], were used to amplify DNA by PCR for patients with clinical suspicion of Lyme arthritis. Presence of *B. burgdorferi* sl. DNA in synovial fluids (n=15) and urine (n=1) were shown by agarose gel analysis. The specificity of the PCR amplicons were controlled by colorimetric solid-phase capture hybridization assay [28]. Stored aliquots of each PCR positive synovial fluid or urine were retrospectively analyzed using species specific primers to type by PCR the infecting strains [11]. Without knowing the results of the PCR, sera from these patients were analyzed and interpreted independently.

Results

Characterization of serological responses

In order to determine the preferential reactivity of sera from patients with neuroborreliosis (n=31), ACA (n=31) and arthritis (n=34), the following protein bands were scored and analyzed on four species specific immunoblots: 93 kDa (p100), 75 kDa, 66 kDa, 60 kDa, 58 kDa, 54-56 kDa, 45 kDa, 41 kDa (flagellin), p39, 35 kDa, OspA, 30 kDa, OspD, OspC, 20 kDa, 18 kDa, 16 kDa, 14 kDa and 12 kDa (Figure 1, Table 1).

When specimens were grouped by their preferential reactivity to each of the four species, only a few bands appeared to have discriminative potential. Among sera with a preferential reactivity to *B. burgdorferi* ss. (n=23) the following antigen bands (12 kDa, 16 kDa, OspC, 58 kDa and 66 kDa) were found to have a higher discriminating power with *B. burgdorferi* ss. than with other species. Sera with a preferential reactivity to *B. garinii* (n=17) presented a higher reactivity with the 16 kDa, 18 kDa, 20 kDa, OspC, OspD, 30 kDa, OspA, 45 kDa and 60 kDa antigen bands. Sera with a preferential reactivity to *B. afzelii* (n=43) presented a higher reactivity with 12 kDa, 14 kDa, 16 kDa, 18 kDa, OspC and 45 kDa antigen bands. Among sera with a preferential reactivity to *B. valaisiana* (n=4), the reactivity of OspA, 45 kDa and 66 kDa were higher. Proteins of 12 kDa, 14 kDa, 16 kDa, 18 kDa, 20 kDa, OspC, OspD, 30 kDa, OspA, 45 kDa, 58 kDa, 60 kDa and 66 kDa presented a discriminative potential to the four species. Based on these results, the five proteins with the best discriminative potential (12 kDa, 16 kDa, 18 kDa, OspA and 66 kDa) were used as a rapid first-step procedure to determine preferential reactivity of sera to the four species (Figure 2 A-D). If not discriminative with this procedure, the second-step was then used based on the score of all the 19 scored proteins.

Among patients with neuroborreliosis, 18 sera presented a preferential reactivity to one species after the first-step; 16 of them were confirmed with the second-step. In two cases the total score was not superior by three points. Among patients with ACA and arthritis, 21 and 19 sera, respectively, presented a preferential reactivity to one species after the first-step. Nineteen and 17 of the samples were confirmed with the second-step. The four last sera presented no total score superior by three points for one species compared with the others. Percentages of sera showing a preferential reactivity to a particular species are shown in Table 2. The percentage of sera with a preferential reactivity with the combined method was 90% for patients with neuroborreliosis (28/31), 94% for patients with ACA (29/31) and 94% for patients with arthritis (32/34). Out of the three sera from patients with neuroborreliosis having an undetermined reactivity, one was an early infection with a weak IgG reaction. We suspect a mixed infection in another case as the total scores of the 19 bands with *B. garinii* and *B. afzelii* were clearly higher than with *B. valaisiana* and *B. burgdorferi* ss.. Out of the two sera from patients with arthritis and inconclusive reactivity to a particular genospecies, one seemed to be a mixed infection. The total scores of the five specific bands were much higher with *B. burgdorferi* ss. and *B. afzelii* than with *B. garinii* and *B. valaisiana*.

Two protein bands presented a preferential reactivity to one specific species whatever the clinical symptoms were. The 14 kDa of *B. afzelii* and the 58 kDa of *B. burgdorferi* ss. had a higher reaction.

Preferential serological reactivity of patients with different clinical symptoms

The percentage of serum samples per group showing a preferential reactivity to each species are presented in Table 3. Reactivities of sera from patients with neuroborreliosis were higher with *B. garinii* than with other species (52% to *B. garinii* versus 6 to 22% with others). Reactivities of sera from patients with ACA were predominant with *B. afzelii* (84%). Reactivities of sera from patients with arthritis were higher with *B. burgdorferi* ss. (62%) and with *B. afzelii* (29%). Three sera from patients with neuroborreliosis and one serum from patient with arthritis presented a preferential reactivity to *B. valaisiana*.

Persistence of reactivity to species specific immunoblot

The persistence of the predominant reactivity after treatment with antibiotics was evaluated by comparing sequential sera from nine patients. Two paired sera from patients with

neuroborreliosis were analyzed. One of them presented a preferential reactivity to *B. valaisiana* for both sera. In the case of the other patient, the reactivity of the first sera was inconclusive and the second sera presented a preferential reactivity to *B. afzelii*. With both of these patients a decreasing IgG antibody response was observed. Six paired of sera from patients with ACA were analyzed. In both sera, five of them presented preferential reactivity to *B. afzelii* and a decrease of the immune response in the second sera. In the second sera one of them presented only a preferential reactivity to *B. burgdorferi* ss. although a decrease of the immune response was observed. One pair of sera from a patient with arthritis was analyzed. Both sera presented a preferential reaction to *B. burgdorferi* ss. with an increased immune response on the second serum (3.5 years later).

Immunoblot reactivity compared with genomic detection

PCR in synovial and urine samples detected five *B. burgdorferi* ss., one *B. garinii*, nine *B. afzelii* and one untypable *Borrelia*. Preferential reactivities were observed in serum samples of these patients by immunoblot (three with *B. burgdorferi* ss. and 13 with *B. afzelii*). The results of these two methods performed independently agreed each other in 11 patients (69%) (two samples had a preferential reactivity to *B. burgdorferi* ss., nine to *B. afzelii*). One sample presented a preferential reactivity by immunoblot to *B. burgdorferi* ss. but could not be amplified by any specific primers. One serum sample presented a preferential reactivity by immunoblot with *B. afzelii* although PCR results of urine from this patient indicated an infection with *B. garinii*. Only three discrepancies were found. In two cases the strain detected in the synovial fluid was *B. afzelii* whereas the IgG immunoblots presented a preferential reactivity with *B. burgdorferi* ss. and the third case, *B. burgdorferi* ss. was detected in the synovial fluid with an IgG immunoblot suggesting a *B. afzelii* infection.

Discussion

Our four species immunoblot allowed us to observe predominant serum-antibody reactivity to one *Borrelia* species in the majority of sera from patients with chronic LB (90% for neuroborreliosis (28/31), 94% for ACA (29/31) and 94% for arthritis (32/34)). The association of a given clinical manifestation with a defined *Borrelia* species was confirmed by these results. The predominant reactivity persisted long after treatment of the disease. Indirect evidence suggested the involvement of *B. valaisiana* in some chronic clinical manifestations.

Results of serological tests for LB may depend on the different isolates causing infection and on antigenic source, because isolates from different species are rather heterogeneous [47, 48] and lead to differences in reactivities on westernblots [3, 21, 26, 27, 30, 46, 49, 50]. Moreover, as the infecting species is area specific [8], we studied the four observed species in Switzerland and tested patients with LB from the same area. Norman et al [30] suggested that development, optimization and validation of immunoblots criteria must be done for each specific strains as different levels of reactivity with each strains may occur. Therefore, we selected the best way to determine the preferential reactivity to each *Borrelia* species. Species specific immunoblot analysis achieved by scoring individual discriminating bands allowed to type for a high percentage of predominant reactivity. Preferential reactivity of sera to one species was determined with a first-step analysis based on the scores of five protein bands with a high discriminating potential (12 kDa, 16 kDa, 18 kDa, OspA and 66 kDa). Two of these five proteins are recommended by the CDC for the confirmation of positive serological tests (18 kDa and 66 kDa). First, the 18 kDa protein has already been described by authors and is now considered as a good marker for LB [12, 22, 32, 38]. Second, the 66 kDa has been described as a heat-shock protein with high specificity for LB [7, 12, 25, 26]. Analysis of isolates of *B. burgdorferi* sl. obtained in North America and Europe has demonstrated that OspA has antigenic variability and that several distinct groups can be serologically defined [45, 47]. However, there are controversial reports about its specificity in immunoblot [6, 10, 12, 20]. The function of 12 kDa and 16 kDa antigens are not yet clear. When the rapid first-step scoring method was inconclusive, it was followed by a second-step scoring method based on the total score of the 19 selected proteins. In most instances, the 19 protein band analysis allowed for the confirmation and extension of the initial typing, leaving only few inconclusive reactivities. This two-step procedure presented the advantage of a first rapid scoring method with about two third of sera presenting a preferential reactivity at the end of this step and 93% at the end of the second-step. No divergence on preferential reactivities was observed between the first-step and the second-step approach.

A preliminary blinded study comparing immunoblot typing with genomic detection in synovial fluids and urine of selected patients showed agreement in sixty nine percent (11/16) of samples. Four out of 16 samples only showed discrepancies and for the last sample no comparison was possible. Among these four patients, one had frequent tick bites during several years and so could have been in contact with several *B. burgdorferi* sl. species. In a second patient, only urine was available and revealed the presence of *B. garinii* whereas the serologic interpretation was in favor of *B. afzelii*. A mixed infection in this case could also be envisaged. One case showed a preferential reactivity on IgG immunoblot to *B. burgdorferi* ss. but no amplification with species specific primers was possible.

The reproducibility of immunoblot typing was high in the sera of a given patient. Seven sera with preferential reactivity to one of the four species were shown to have the same reactivity with the second paired sera. Excluding the risk of a reinfection, the preferential reactivity of an infection may be observable for several years. Although reinfection caused by the bites of separate ticks cannot be excluded, the presence of several species in lesions of EM and ACA patients may reflect the occurrence of mixed infections in the local tick populations [37]. It was also shown that infection with multiple species can persist in patients for a prolonged period [11]. In our study, the percentage of sera with undetermined reactivity was 10% for patients with neuroborreliosis, 6% for patients with ACA and 6% for patients with arthritis. However,

significantly higher scores against two of the four *Borrelia* species were observed in two among the seven sera with inconclusive reactivity suggesting mixed infections.

Sera from patients with ACA clearly showed greater reactivity with *B. afzelii*, which confirmed results described by other authors [2, 3, 13, 42]. Reactivities of sera from patients with arthritis were predominantly specific to *B. burgdorferi* ss. (62%) and to *B. afzelii* (29%), which has also been confirmed by other serological analysis [2, 3]. However, a PCR analysis performed on small numbers of synovial fluids in Germany revealed no association between arthritis and *B. burgdorferi* ss. [15,43]. In our study, we also observed discrepant results between the serological study (62% of association with *B. burgdorferi* ss) versus (31% of *B. burgdorferi* ss.) in the small PCR collective. We think that the selection of patients with Lyme arthritis based on their PCR results is highly dependant of the test characteristics and could have led to biased prevalence of *Borrelia* species. By the way, in the two referred papers [15,43] a high proportion of negative PCR Lyme arthritis (4/11, 36 % and 7/20, 35 % respectively) was observed.

Our results lead us to confirm an association between *B. garinii* (52 % of preferential reactivity) and the neuroborreliosis although some authors are opposed to it. The good match described by Eiffert [14], between the distribution of *Borrelia* sl. in ticks and in CSF from patients of the same area, was interpreted as a random selection of organisms, but it doesn't take into account the predominant occurrence of nymph bites on human [17]. In Switzerland nymphs are mainly infected with *B. afzelii* (L. Gern personal communication). The association between neuroborreliosis and *B. garinii* in Europe has already been described in reports [2, 10, 11, 32, 42]. The percentage of association in this study was nevertheless lower than that described by others. This may be explained by a falsely attributed preferential reactivity to *B. garinii* in absence of *B. valaisiana* antigen. *B. valaisiana* was tested for the first time with comparative immunoblot and a pathogenic potential similar to *B. garinii* was suggested. Moreover *B. garinii* and *B. valaisiana* have been demonstrated to have both an enzootic cycle in avian host [18, 19, 29, 31]. Furthermore, phylogenetic position of VS116 (*B. valaisiana*) has been described as closely related to *B. garinii* [5, 41].

A preferential reactivity to *B. valaisiana* was observed among three serum samples from patients with neuroborreliosis and one with arthritis. These preliminary results provided some additional clues of the potential pathogenicity of *B. valaisiana* in human. As recently reported, *B. valaisiana* has been detected by PCR and Restriction Length Polymorphism in skin biopsies of two EM patients and mixed infections including *B. valaisiana* were identified in both EM and ACA [37]. Clinical histories were obtained from the three patients with neuroborreliosis potentially infected with *B. valaisiana*. The three patients had partial facial palsy. One of them presented an EM 14 days after a tick bite.

Conclusion

Our scoring method on discriminative proteins of immunoblots allows to attribute the serum reactivity of patient with chronic Lyme borreliosis to one *Borrelia* species in most cases. Our results suggest an organotropism of *Borrelia* species and provide some evidence of a pathogenic potential of *B. valaisiana* in humans.

Acknowledgments

This work was supported by the Foundation for research and development from the Institut Central des Hôpitaux Valaisans and the Swiss Foundation for Scientific Research grant. n° 32.52739.97

We thank A. F. Rodriguez and S. Bochuz for their excellent technical assistance and A.G. Barbour, B. Wilske and R. Wallich for providing monoclonal antibodies

This research is part of the Ph.D dissertation of K. Ryffel

References

1. Altpeter, E.S. and C. Meier. 1992. Epidemiologische Aspekte der neurologischen Komplikationen der Lyme-Borreliose in der Schweiz. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 122: 22-26.
2. Anthonissen, F.M., M. De Kesel, P.P. Hoet, and G.H. Bigaignon. 1994. Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. *Res. Microbiol.* 145: 327-331.
3. Assous, M.V., D. Postic, G. Paul, P. Nevot, and G. Baranton. 1993. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 261-268.
4. Baranton, G., D. Postic, I. Saint-Girons, P. Boerlin, J.C. Piffaretti, M. Assous, and P.A.D. Grimont. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 378-383.
5. Bernasconi, M.V., C. Valsangiacomo, T. Balmelli, O. Péter, and J.C. Piffaretti. 1997. Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. *Eur. J. Epidemiol.* 13: 209-215.
6. Bruckbauer, H.R., V. Preac-Mursic, R. Fuchs, and B. Wilske. 1992. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 224-232.
7. Bunikis, J., C.J. Luke, E. Bunikiene, S. Bergstrom, and A.G. Barbour. 1998. A surface-exposed region of a novel outer membrane protein (P66) of *Borrelia* spp. is variable in size and sequence. *J. Bacteriol.* 180: 1618-1623.
8. Bunikis, J., B. Olsen, G. Westman, and S. Bergstrom. 1995. Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in a population at risk for and patients with Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1473-1478.
9. Canica, M.M., F. Nato, L. du Merle, J.C. Mazie, G. Baranton, and D. Postic. 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25: 441-448.
10. Cinco, M., R. Murgia, M. Ruscio, and B. Andriolo. 1996. IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 14: 159-166.
11. Demaerschalck, I., A.B. Messaoud, M. de Kesel, B. Hoyois, Y. Lobet, P. Hoet, G. Bigaignon, A. Bollen, and E. Godfroid. 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33: 602-608.
12. Dressler, F., J.A. Whalen, B.N. Reinhardt, and A.C. Steere. 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 167: 392-400.
13. Dunand, V., et al. 1998. Acrodermatitis chronica atrophicans and serologic confirmation of infection due to *Borrelia afzelii* and/or *Borrelia garinii* by immunoblot. *Clin. Microbiol. and Infect.* 4: 159-163.
14. Eiffert H, A. Ohlenbusch, H-J. Christen, R. Thompson, A. Spielman, and F-R. Matuschka. 1995. Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. *J. Infect. Dis.* 171: 476-479.
15. Eiffert H, A. Karsten, R. Thompson, and H-J. Christen. 1998. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. *Scand. J. Infect. Dis.* 30: 265-268.
16. Engstrom, S.M., E. Shoop, and R.C. Johnson. 1995. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 33: 419-427.
17. Gray JS, O. Kahl, J.N. Robertson, M. Daniel, A. Estrada-Pena, G. Gettinby, T.G. Jaenson, P. Jensen, F. Jongejan, F. Korenberg, K. Kurtenbach, and P. Zeman. 1998. Lyme borreliosis habitat assessment. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 211-228.

18. Humair, P.F., D. Postic, R. Wallich, and L. Gern. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 521-538.
19. Isogai, E., S. Tanaka, I.S. Braga III, C. Itakura, H. Isogai, K. Kimura, and N. Fujii. 1994. Experimental *Borrelia garinii* infection of Japanese quail. *Infect. Immun.* 62: 3580-3582.
20. Kalish, R.A., J.M. Leong, and A.C. Steere. 1993. 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.
21. Karlsson, M. 1991. Antibody response against autologous and heterologous isolates of *Borrelia burgdorferi* in four patients with Lyme neuroborreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 742-745.
22. Karlsson, M., I. Mollegard, G. Stiernstedt, and B. Wretling. 1989. Comparison of Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 871-877.
23. Kirstein, F., S. Rijpkema, M. Molkenboer, and J.S. Gray. 1997. The distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *Eur. J. Epidemiol.* 13: 67-72.
24. Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Péter, and G. Baranton. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 921-925.
25. Luft, B.J., P.D. Gorevic, W. Jiang, P. Munoz, and R.J. Dattwyler. 1991. Immunologic and structural characterization of the dominant 66- to 73- kDa antigens of *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 146: 2776-2782.
26. Ma, B., B. Christen, D. Leung, and C. Vigo-Pelfrey. 1992. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 370-376.
27. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson, R.C. Johnson, R.B. Nadelman, and G.P. Wormser. 1994. Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1154-1158.
28. Mansy, F., B. Hoyois, M.J. de Vos, A. van Elsen A. Bollen, and E. Godfroid. 1996. Colorimetric solid-phase capture hybridization assay for detection of amplified *Borrelia burgdorferi* DNA. *Biotechniques* 21: 122-125.
29. Nakao, M., K. Miyamoto, and M. Fukunaga. 1994. Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. *J. Infect. Dis.* 170: 878-882.
30. Norman, G.L., J.M. Antig, G. Bigaignon, and W.R. Hogrefe. 1996. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii* western blots (immunoblots). *J. Clin. Microbiol.* 34: 1732-1738.
31. Olsen, B., T.G. Jaenson, L. Noppa, J. Bunikis, and S. Bergstrom. 1993. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* 362: 340-342.
32. Péter, O., A.-G. Bretz, D. Postic, and E. Dayer. 1997. Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin. Microbiol. and Infect.* 3: 423-431.
33. Péter, O. and A.G. Bretz. 1992. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. *Zentralbl. Bakteriol.* 277: 28-33.
34. Péter, O., A.G. Bretz, and D. Bee. 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. *Eur. J. Epidemiol.* 11: 463-467.
35. Postic, D., M.V. Assous, P.A. Grimont, and G. Baranton. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrf* (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 743-752.
36. Rijpkema, S.G., R.G. Herbes, N. Verbeek-De Kruif, and J.F. Schellekens. 1996. Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 117: 563-566.

37. Rijpkema, S.G.T., D. Tazelaar, M. Molkenboer, G. Noordhoek, G. Plantinga, L. Schouls, and J. Schellekens. 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin. Microbiol. Infect. 3: 109-116.
38. Ryffel, K., O. Péter, L. Binet, and E. Dayer. 1998. Interpretation of immunoblots for Lyme borreliosis using a semiquantitative approach. Clin. Microbiol. and Infect. 4: 205-212.
39. Saint Girons, I., L. Gern, J.S. Gray, E.C. Guy, E. Korenberg, P.A. Nuttall, S.G.T. Rijpkema, A. Schönberg, G. Stanek, and D. Postic. 1998. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. Zentralbl. Bakteriologie. 287: 190-195.
40. Steere, A.C. 1989. Lyme disease. N. Engl. J. Med. 321: 586-596.
41. Valsangiacomo, C., T. Balmelli, and J.C. Piffaretti. 1997. A phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato based on sequence information from the *hbb* gene, coding for a histone-like protein. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 1-10.
42. van Dam, A.P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widdjojokusumo, B. M. de Jongh, S. Spanjaard, A. C.T. Ramselaar, M.D. Kramer, and J. Dankert. 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin. Infect. Dis. 17: 708-717.
43. Vasiliu, V., P. Herzer, D. Rossler, G. Lehnert, and B. Wilske. 1998. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. Med. Microbiol. Immunol. (Berl). 187: 97-102.
44. Wang, G., A.P. van Dam, A. Le Flèche, D. Postic, O. Péter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert. 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 926-932.
45. Wilske, B., U. Busch, H. Eiffert, V. Fingerle, H.W. Pfister, D. Rössler, and V. Preac-Mursic. 1996. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. Med. Microbiol. Immunol. (Berl). 184: 195-201.
46. Wilske, B., V. Fingerle, V. Preac-Mursic, S. Jauris-Heipke, A. Hofmann, H. Loy, H.W. Pfister, D. Rössler, and E. Soutschek. 1994. Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Microbiol. Immunol. (Berl). 183: 43-59.
47. Wilske, B., V. Preac-Mursic, U.B. Göbel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab, and G. Zumstein. 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 340-350.
48. Wilske, B., V. Preac-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner. 1993. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 61: 2182-2191.
49. Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, and K.V. Busch. 1986. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiol. Hyg. [A]. 263: 92-102.
50. Zoller, L., S. Burkard, and H. Schafer. 1991. Validity of western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. 29: 174-182.

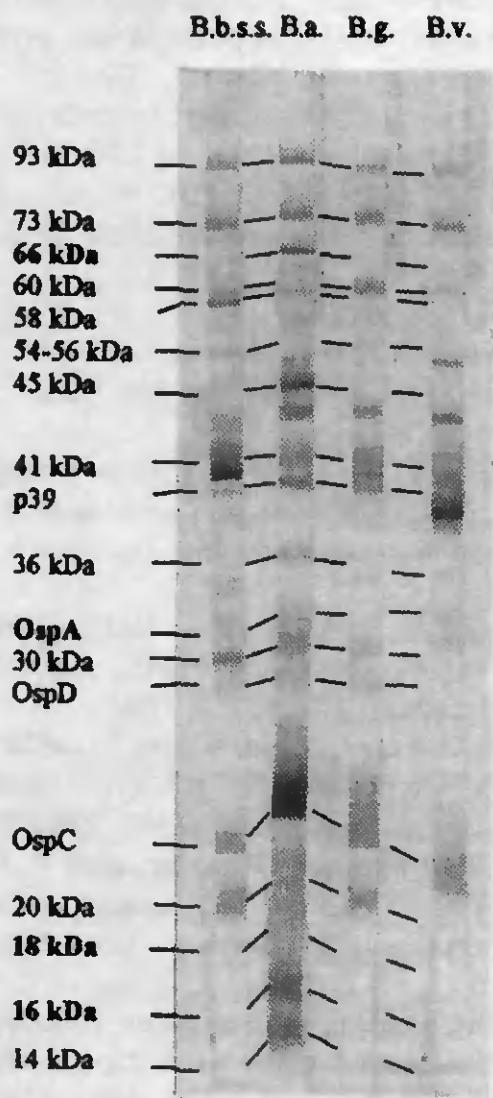


FIG. 1. Example of an immunoblot with a predominant score for *B. afzelii*. Immunoblots (IgG) were done with the serum from a patient with ACA. B.b.s.s., *B. burgdorferi sensu stricto* VS215; B.a., *B. afzelii* VS461; B.g., *B. garinii* VS102; B.v., *B. valaisiana* VS116. Boldface indicates the five discriminative proteins used in method I.

TABLE 1. Scores for reactivity of a serum sample to the four *Borrelia* species for 19 proteins^a

Protein band	Score ^b			
	B.b.s.s.	B.a.	B.g.	B.v.
93 kDa	2	2	1	1
73 kDa	2	2	2	2
66 kDa	0	3	0	0
60 kDa	1	0	2	1
58 kDa	2	1	0	1
54-56 kDa	1	1	1	0
45 kDa	1	3	0	0
41 kDa	2	2	2	2
p39	1	2	2	2
36 kDa	0	1	0	1
OspA	1	1	0	1
30 kDa	2	2	1	1
OspD	1	1	1	0
OspC	2	3	2	2
20 kDa	2	2	2	0
18 kDa	0	1	0	0
16 kDa	0	2	0	0
14 kDa	0	2	0	0
12 kDa	0	0	0	0
Score method I ^c	1	7	0	1
Score method II ^d	20	31	16	14

^a See Fig. 1. Boldface proteins and scores indicate the five discriminative proteins used in method I and the scores obtained with those proteins.

^b B.b.s.s., *B. burgdorferi sensu stricto*; B.a., *B. afzelii*; B.g., *B. garinii*; B.v., *B. valaisiana*.

^c Score with the five discriminative proteins (the score was discriminative if the score for reactivity to one species was two points greater than the scores for reactivity to the other species).

^d Total score with 19 proteins (the score was discriminative if the score for reactivity to one species was three points greater than the scores for reactivity to the other species).

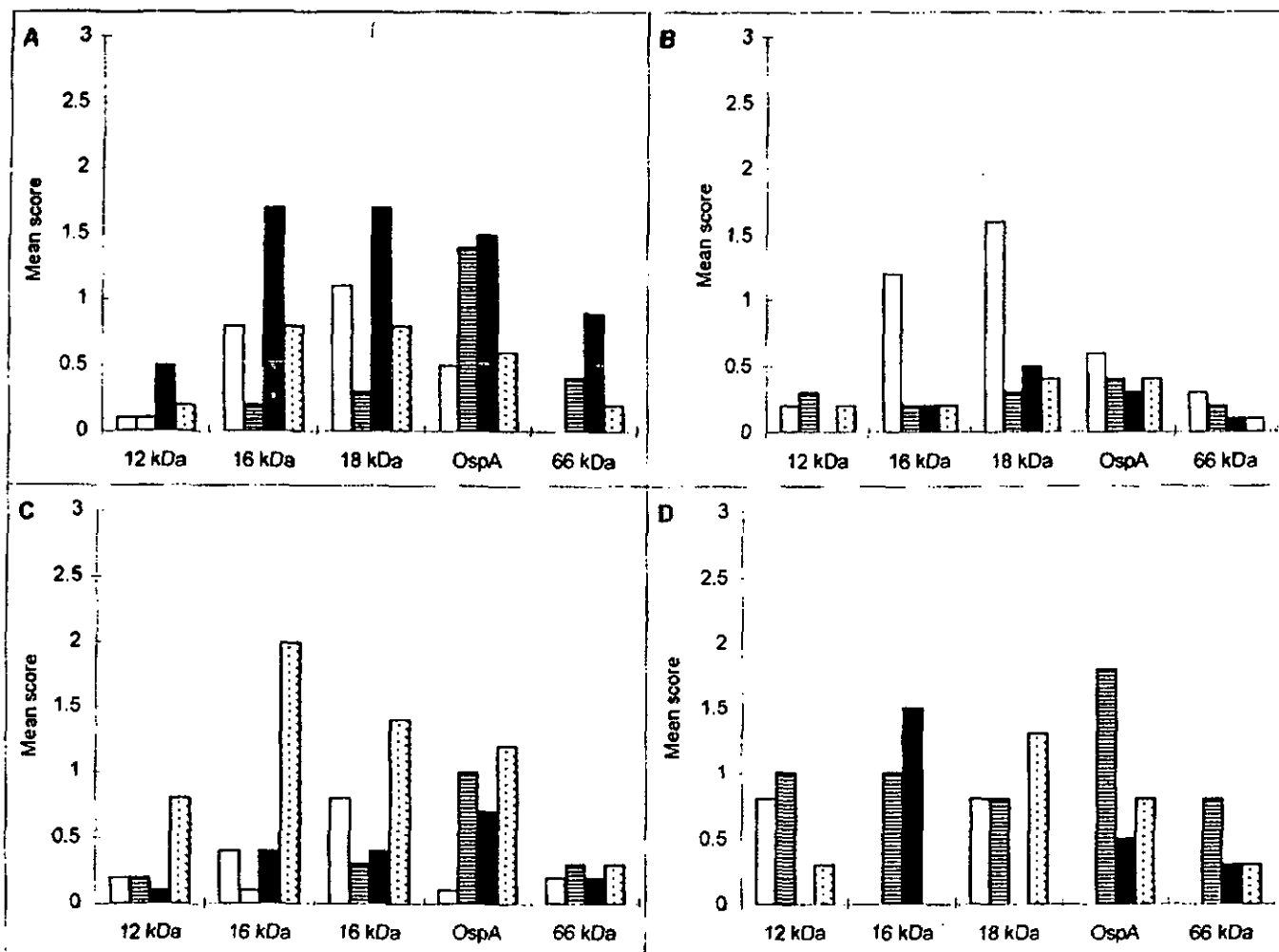


FIG. 2. Mean score of specific reactivity to different *Borrelia* species. (A) Specific reactivity to *B. burgdorferi* sensu stricto ($n = 23$). (B) Specific reactivity to *B. garinii* ($n = 17$). (C) Specific reactivity to *B. afzelii* ($n = 43$). (D) Specific reactivity to *B. valaisiana* ($n = 4$). ■, *B. burgdorferi* sensu stricto; □, *B. garinii*; ▨, *B. afzelii*; ▩, *B. valaisiana*.

TABLE 2. Percentage of preferential reactivity to particular *Borrelia* species by scoring method

Clinical manifestation	% Reactivity		Methods I and II
	Method I	Method II	
Neuroborreliosis ($n = 31$)	58	84	90
ACA ($n = 31$)	68	87	94
Arthritis ($n = 34$)	56	88	94

TABLE 3. Percentage of serum samples per disease group showing preferential reactivity for individual species by methods I and II

Clinical manifestation	% Reactivity ^a			
	B.b.ss	B.g.	B.a.	B.v.
Neuroborreliosis ($n = 31$)	6	52	22	10
ACA ($n = 31$)	7	3	84	0
Arthritis ($n = 34$)	62	0	29	3

^a B.b.ss, *B. burgdorferi* sensu stricto; B.g., *B. garinii*; B.a., *B. afzelii*; B.v., *B. valaisiana*.

3.3.2 Détermination du potentiel infectieux de *Borrelia valaisiana* sur des échantillons cliniques au moyen d'amorces spécifiques

Introduction

Le diagnostic d'une infection active est en premier lieu basé sur les manifestations cliniques et sur l'anamnèse. Il nécessite souvent des tests de laboratoires, dont les plus courants sont les tests sérologiques et en particulier, l'ELISA et l'immunoblot. De par sa sensibilité modeste, la PCR est encore peu utilisée en laboratoire de routine, bien que plus d'une centaine de tests ait déjà été proposé pour détecter une infection à *B. burgdorferi* ss.. La sensibilité dépend du matériel clinique employé ainsi que du choix du gène cible. La PCR effectuée sur des biopsies d'EM s'avère de bonne sensibilité (70-80%), mais son utilité dans le diagnostic est très relative, étant donné que cette lésion cutanée est pathognomique de la borréliose de Lyme. Seuls les érythèmes atypiques nécessiteraient un tel examen. Les anticorps ne pouvant être détectés que quelques semaines après la piqûre (Malane 91), dans ce laps de temps, l'immunoblot et l'ELISA sont moins sensibles que la PCR. 89% des EM précoces peuvent être diagnostiqués par PCR alors que 35-40% des EM sont diagnostiqués positifs avec un ELISA IgM et 15% avec un ELISA IgG (Moter 94, Mourtisen 96, Schwartz 92). Contrairement aux PCR sur les liquides céphalo-rachidiens (LCR), les PCR sur les liquides articulaires ont été décrites comme présentant une bonne sensibilité (Nocton 94). Quelques laboratoires les proposent comme analyses complémentaires à l'ELISA et à l'immunoblot. La sensibilité de chaque test dépend principalement du gène cible et de la préparation des échantillons. Parmi les PCR les plus couramment employées, on compte celles permettant d'amplifier une partie des gènes codant pour les protéines de surface dont principalement l'OspA et l'OspB. Ces gènes situés sur un plasmide linéaire sont malheureusement très variables, en Europe en particulier, ce qui rend les PCR souvent peu sensibles face aux différentes espèces (Debue 91, Keller 92, Nielsen 90). Le but de cette étude est de déterminer le potentiel infectieux de *B. valaisiana* au moyen d'une paire d'amorces spécifiques de cette espèce dirigées contre le gène *ospA*. Jusqu'à présent, l'implication clinique de *B. valaisiana* n'a été suggérée que dans des cas d'infections précoces (Rijkema 95). Seul le potentiel infectieux de *B. burgdorferi* ss., *B. garinii* et *B. afzelii* a pour l'instant été confirmé (Baranton 92).

Matériel et Méthodes

Echantillons analysés

Tous les échantillons de liquides articulaires ont été prélevés chez des patients avec une suspicion d'arthrite de Lyme. Les cas dont la sérologie était limite ont été considérés comme des cas peu probables d'arthrite de Lyme ; tandis que ceux dont la sérologie était positive ont été considérés comme des arthrites de Lyme.

Toutes les biopsies ont été préparées à partir de patients présentant une infection cutanée de type érythème migrant. Seuls les cas dont la sérologie s'est révélée positive ont été considérés comme borréliose de Lyme.

Préparation des liquides articulaires

Les liquides articulaires ont été centrifugés 20 min à 10'000 g. Après trois lavages dans une solution de PBS stérile (0.1 M, pH 7.2), le culot a été resuspendu dans de l'eau bidistillée (environ 80 µl). Au moment de l'amplification, les échantillons ont été lysés 20 min à 95°C, puis conservés sur glace.

Préparation des biopsies

Les biopsies ont été digérées pendant la nuit à 55°C, sous agitation périodique, avec la protéinase K (1.5 mg de protéinase, diluée dans du tampon ATL, pour 100 mg de biopsie). L'extraction de l'ADN s'est faite selon le protocole « QIA amp tissue kit » (QIAGEN, Bâle, CH).

PCR sur des échantillons cliniques

Des amorces reconnaissant les séquences du gène *ospA* de la plupart des souches *B. burgdorferi* sl. (Demaerschalk 95) ont été employées pour tester 19 biopsies et 46 ponctions de patients avec une suspicion clinique de borréliose de Lyme. Pour optimiser la détection de *B. valaisiana*, les amorces spécifiques à cette espèce ont été employées conjointement lors de la même réaction. Chaque amorce, resuspendue dans 1 ml de tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7.5, filtré), a été utilisée à une concentration finale de 20 pmoles par réaction d'amplification (50 µl). L'amplification de chaque échantillon (10 µl) s'est faite dans le tampon Taq PCR Master Mix (Taq DNA polymérase 2.5 U, tampon 1x, dNTP 200 µM), (Qiagen, Bâle, CH) aux conditions suivantes : 3 min, 94°C suivi de 40 cycles (1 min, 60°C ; 1 min, 72°C ; 1 min, 94°C) puis 1 min, 60°C ; 7 min, 72°C.

La présence de l'ADN de *B. burgdorferi* sl. a été observée sur gel d'agarose 2%. La spécificité de la réaction a été confirmée par hybridation selon la méthode décrite par Mansy (Mansy 96). Chaque échantillon positif a ensuite été testé indépendamment avec les amorces *B. valaisiana*.

Table 1
Séquence des amorces et des sondes nécessaires à la réalisation du test PCR-hybridation (Demaerschalk 95, Mansy 96)

	Séquence 5'----3'	Position	
Amorces <i>B. burgdorferi</i> sl.	<u>Amorce directe</u> AATAGGTCTAATAATAGCCTTAATAGC	21-47	→
	<u>Amorce complémentaire</u> CTAGTGTTTTGCCATCTTCTTGAAAA	302-328	←
Amorces <i>B. valaisiana</i>	<u>Amorce directe</u> TGCTGAAAATGCTACAAAAGCAGT	453-476	←
	<u>Amorce complémentaire</u> CAAGACAAAACCTTGATTTACAAAAC	696-721	→
Oligonucléotide de capture	GCATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGA		
Sonde biotinilée	GGGAAGCTTGAGCTTAAAGGAAGCTTC		

Hybridation des amplicons

La spécificité de l'amplification a été confirmée par hybridation selon la méthode décrite par Mansy (Mansy 96). Cette hybridation a été réalisée au moyen d'un oligonucléotide de capture fixé de façon covalente à la surface d'une microplaque. L'ADN hybridé est alors reconnu par une sonde biotinilée. Les séquences des oligonucléotides et des sondes sont décrites dans la table 1. Brièvement, 12.5 µl d'échantillon ont été dénaturés 10 min avec 50 µl de NaOH 0.25 M. Le produit dénaturé a ensuite été dilué dans du tampon-Tris (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 1M, MgCl₂ 2 mM, triton X-100 0.05%, pH 7.5) contenant 5% de lait écrémé, 0.2 M d'acide acétique et 4 pmoles de sondes et incubé, 90 min à 37°C, dans des microplaques tempérées et préalablement lavées au tampon-Tris contenant 5% de lait écrémé. A la fin de la période d'incubation, les plaques ont été lavées cinq fois au tampon-Tris avec 5% de lait écrémé. 100 µl de conjugué couplé à la peroxidase (Dako, Copenhague, Danemark) et dilué 1/1000 dans du tampon-Tris contenant 3% d'albumine sérique bovine a été ensuite ajouté à chaque puits. Après 30 min d'incubation à température ambiante, cinq nouveaux lavages ont été réalisés avec du tampon-Tris. 200 µl de substrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) ont été ajoutés dans

chaque puits et incubé 15 min dans l'obscurité. La lecture de la densité optique a été mesurée à 450 nm, après que la réaction ait été stoppée avec 100 µl d'acide sulfurique 5%.

Chaque échantillon positif a ensuite été testé indépendamment avec les amorces *B. valaisiana*.

Analyse sérologique des échantillons cliniques

Les sera des patients avec une suspicion de borréliose de Lyme ont été testés par un ELISA (IgG+IgM) commercial (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Les résultats positifs ont été confirmés par immunoblot selon la méthode de laboratoire employée à l'Institut Central des Hôpitaux Valaisans (Sion, Suisse). Les critères de positivité de l'immunoblot IgG sont les suivants : 5 bandes visibles dont 3 appartenant aux bandes spécifiques suivantes (93 kDa, Flagelline, 39 kDa, OspA et OspC). Les critères de positivité de l'immunoblot IgM sont les suivants : 4 bandes visibles dont 2 appartenant aux bandes spécifiques suivantes (93 kDa, Flagelline, 39 kDa, OspA et OspC). Il s'agit généralement de la Flagelline et de l'OspC.

Résultats

Une analyse sérologique et génétique a été effectuée sur des échantillons (n=63) de patients avec une suspicion de borréliose de Lyme. La sérologie de 37 échantillons s'est révélée positive et trois échantillons ont présenté des résultats limites qui ne pouvaient conclure à une symptomatologie de borréliose de Lyme chronique. Parallèlement, une PCR avec les amorces *B. burgdorferi* sl. et *B. valaisiana* dirigée contre le gène *ospA* a été réalisée sur des biopsies (n=19) et des ponctions de liquides articulaires (n=44) provenant de ces mêmes patients. Les résultats PCR positifs ont ensuite été confirmés par hybridation et comparés aux résultats sérologiques (Tables 2 et 3). La PCR simultanée avec les amorces *B. burgdorferi* sl. et *B. valaisiana* a ainsi permis d'amplifier l'ADN de deux biopsies et neuf ponctions. Les résultats des deux biopsies ont été confirmés positifs par le test d'hybridation, tandis que seuls les résultats de cinq ponctions ont été confirmés. La comparaison des résultats sérologiques avec ceux de l'hybridation permet de définir la sensibilité de la méthode génique, qui est de 17% (2/12) sur les biopsies et de 16% (4/25) sur les ponctions.

Les deux biopsies et neuf ponctions des 11 patients, dont les échantillons avaient présentés un résultat positif lors de la première amplification, ont ensuite été testés par PCR avec, cette fois-ci, uniquement les amorces spécifiques à *B. valaisiana*. Parmi ces 11 échantillons, une ponction a présenté une amplification suggérant la présence de *B. valaisiana*. Le résultat de l'hybridation de cette ponction suite à l'amplification avec les amorces combinées *B. burgdorferi* sl. et *B. valaisiana* était positif. Cependant les analyses sérologiques étaient limites. Le manque de matériel à disposition n'a pas permis d'effectuer une troisième PCR qui aurait pu exclure une infection mixte. Par ailleurs, le résultat positif en PCR pour *B. valaisiana* pourrait être une *B. garinii* faussement amplifiée, du fait que les amorces spécifiques à *B. valaisiana* amplifient 12% des souches *B. garinii* testées. Il faudrait donc au minimum séquencer l'amplicon pour confirmer l'espèce.

Table 2

Résultats sérologiques et analyse PCR (amorces *Bb* sl. + *Bv*) des biopsies de peau avec suspicion clinique de Borréliose de Lyme

PCR		Positif	Négatif
Sérologie		(nombre d'échantillons confirmés par hybridation)	(nombre d'échantillons)
	Positif	2	10
	Négatif	0	7

Table 3

Résultats sérologiques et analyse PCR (amorces *Bb* sl.+ *Bv*) des ponctions articulaires avec suspicion clinique de Borréliose de Lyme

PCR		Positif	Négatif
Sérologie		(nombre d'échantillons confirmés par hybridation)	(nombre d'échantillons)
	Positif	4	21 ^a
	Limite	1 ^b	2
	Négatif	0	16 ^c

^a Dont 1 échantillon PCR (*Bb* sl. + *Bv*) positif non confirmé par hybridation

^b Echantillon aussi positif avec les amorces *B. valaisiana*

^c Dont 3 échantillons PCR (*Bb* sl. + *Bv*) positifs non confirmés par hybridation

Discussion

Parmi les 63 patients avec une suspicion de borréliose de Lyme, 37 échantillons ont présenté une sérologie positive suggérant une borréliose de Lyme et 11 échantillons (deux biopsies et neuf ponctions) ont présenté un résultat positif lors de l'amplification avec les amorces *B. burgdorferi* sl. et *B. valaisiana*. Un test d'hybridation a ensuite permis de confirmer la spécificité de l'amplification. Ainsi, sept échantillons (deux biopsies et cinq ponctions) se sont révélés positifs avec le test PCR-hybridation de Mansy (Mansy 96). Les résultats sérologiques de six, parmi ces sept échantillons, s'accordaient avec les résultats génétiques. Le dernier échantillon (une ponction) présentait un résultat sérologique limite, estimé trop faible pour un cas d'arthrite de Lyme. Cependant, bien que l'immunoblot ait présenté une faible réactivité contre *B. burgdorferi* ss. et aucune réactivité contre *B. garinii* ni contre *B. afzelii*, le résultat positif suite à l'amplification dirigée spécifiquement contre *B. valaisiana* laisse suggérer une infection spécifique de *B. valaisiana*. Le manque de matériel n'a cependant pas permis d'effectuer une troisième PCR qui aurait permis d'exclure une infection mixte. Il s'agit du premier cas de maladie chronique chez lequel le potentiel infectieux de *B. valaisiana* a été observé. En effet, jusqu'à présent, l'implication clinique de *B. valaisiana* n'a été suggérée que dans des cas d'infections précoces. Après une amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl*, une hybridation a permis de déterminer l'espèce présente chez des patients avec érythème migrant. Deux biopsies de peau ont alors révélé la présence de *B. valaisiana* (Rijpkema 95). Parmi les 16 ponctions qui présentent un résultat sérologique négatif, un échantillon présente une amplification. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les conditions d'amplification des amorces *B. burgdorferi* sl. ont été modifiées au profit du schéma d'amplification des amorces *B. valaisiana* (diminution de trois degrés sur la température d'annealing). En effet, au vu de la faible sensibilité des amorces *B. burgdorferi* sl. face aux souches *B. valaisiana*, les deux paires d'amorces ont été utilisées conjointement dans une même PCR, de peur de ne pas détecter un échantillon clinique infecté par *B. valaisiana*. Ainsi cette modification des conditions

d'amplification a certainement contribué à diminuer la spécificité de la PCR *B. burgdorferi* sl.. La spécificité de l'amplification, par rapport au test PCR-hybridation, est de 63%. La confirmation des résultats par le test d'hybridation est alors indispensable. En effet, quatre échantillons, dont trois ayant une sérologie positive, présentent un résultat positif après l'amplification qui n'est pas confirmé par le test d'hybridation.

Les PCR employées dans le diagnostic clinique de la borréliose de Lyme présentent un taux de détection variant en fonction de la nature de l'échantillon. Ainsi, les PCR sur les échantillons de peau présentent habituellement une sensibilité de 60% à 80% (Melchers 91, Moter 94, Müller 94, von Stedingk 95), tandis que celles sur les LCR, lors des manifestations neurologiques, présentent un pourcentage d'amplification beaucoup plus faible (Amouriaux 93, Lebech 98, Luft 92, Nocton 96, Péter 97). La sensibilité des tests PCR effectués sur des liquides articulaires est, quant à elle, aussi décrite comme étant plus faible que celle des échantillons de peau. Elle dépend généralement du gène amplifié (Liebling 93, Malawista 92). Compte tenu des travaux précédemment décrits, la sensibilité du test PCR-hybridation employé dans cette étude est relativement faible (biopsies 17% et ponctions 16%). Il faut cependant tenir en compte que tous les échantillons à disposition avaient préalablement été congelés avant l'amplification, ce qui peut expliquer cette faible sensibilité de la PCR.

En conclusion, cette PCR avec les amorces *B. valaisiana* est une méthode simple qui s'avère utile lors de la détermination du potentiel infectieux de l'espèce. La combinaison des amorces *B. valaisiana* avec celles dirigées contre *B. burgdorferi* sl. permet d'augmenter la sensibilité du test commercial PCR-hybridation de Mansy (Mansy 96) face aux souches *B. valaisiana*. Cependant, cette étude semble démontrer que la présence de *B. valaisiana* dans des cas d'arthrites est occasionnelle. Au vu de ces résultats, il n'apparaît pas nécessaire de combiner les deux types d'amorces dans le diagnostic de routine. Les amorces *B. burgdorferi* sl. présentent, en effet, une sensibilité suffisante sur des échantillons cliniques fraîchement préparés (Mansy 96). Néanmoins, de nouvelles recherches devraient être menées afin de cibler les échantillons cliniques présentant un risque accru d'une infection par *B. valaisiana*. Jusqu'à présent l'implication clinique de *B. valaisiana* n'a été suggérée que dans des cas d'infections précoces (Rijpkema 97). Par ailleurs, bien qu'elles présentent une sensibilité plus faible, il serait intéressant de réaliser des PCR sur les LCR. Il se peut en effet que *B. valaisiana* soit, comme cela a été suggéré avec *B. garinii* (Assous 93, Anthonissen 94, Busch 96, Péter 97), associée aux symptômes neurologiques (Ryffel 99). Dans cette étude, les LCR ont été congelés dans des conditions inadaptées, ce qui a rendu impossible l'évaluation de l'amplification.

Bibliographie

1. **Amouriaux P., M.V. Assous, D. Margarita, G. Baranton, and I. Saint-Girons.** Polymerase chain reaction with the 30-kb circular plasmid of *Borrelia burgdorferi* B31 as a target for detection of the Lyme borreliosis agents in cerebrospinal fluid. 1993. Res. Microbiol. 144 : 211-219.
2. **Anthonissen F.M.,** Syph. 101 : 405-406.
3. **Anthonissen F.M.,** Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. 1994. Res. Microbiol. 145: p. 327-331.
4. **Assous M.V., D. Postic, G. Paul, P. Nevot, and G. Baranton.** Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. 1993. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: p. 261-268.
5. **Baranton, G., D. Postic, I. Saint-Girons, P. Boerlin, J.C. Piffaretti, M. Assous, and P.A.D. Grimont.** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. 1992. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: p. 378-383.
6. **Busch U., C. Hizo-Teufel, R. Boehmer, V. Fingerle, H. Nitschko, B. Wilske, and V. Preac-Mursic.** Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. 1996. J. Clin. Microbiol. 34: p. 1072-1078.
7. **Debue M., P. Gautier, C. Hackel, A. van Elsen, A. Herzog, G. Bigaignon, and A. Bollen.** Detection of *Borrelia burgdorferi* in biological samples using the polymerase chain reaction. 1991. Res. Microbiol. 142 : 565-572.
8. **Demaerschack I., A.B. Messaoud, M. de Kesel, B. Hoyois, Y. Lobet, P. Hoet, G. Bigaignon, A. Bollen, and E. Godfroid.** Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. 1995. J. Clin. Microbiol. 33: 602-608.
9. **Keller T.L., J.J. Halperin, and M. Whitman.** PCR detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in cerebrospinal fluid of Lyme neuroborreliosis patients. 1992. Neurology. 42 : 32-42.
10. **Lebech A.M., K. Hansen, B.J. Rutledge, C.P. Kolbert, P.N. Rys, and D.H. Persing.** Diagnostic Detection and Direct Genotyping of *Borrelia burgdorferi* Regular by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid in Lyme Neuroborreliosis. 1998. Mol. Diagn. 3 : 131-141.
11. **Liebling M.R., M.J. Nishio, A. Rodriguez, L.H. Sigal, T. Jin, and J.S. Louie.** The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. 1993. Arthritis Rheum. 36 : 665-6675.
12. **Luft B.J., C.R. Steinman, H.C. Neimark, B. Muralidhar, T. Rush, M.F. Finkel, M. Kunkel, and R.J. Dattwyler.** Invasion of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* in acute disseminated infection. 1992. JAMA. 267 : 1364-1367.
13. **Malane M.S., J.M. Grant-Kels, H.M. Feder, and S.W. Luger.** Diagnosis of Lyme disease based on dermatologic manifestations. 1991. Ann. Inter. Med. 114 : 490-498.
14. **Malawista S.E., R.T. Schoen, T.L. Moore, D.E. Dodge, T.J. White, and D.H. Persing.** Failure of multitarget detection of *Borrelia burgdorferi*-associated DNA sequences in synovial fluids of patients with juvenile rheumatoid arthritis : a cautionary note. 1992. Arthritis Rheum. 35 : 246-247.
15. **Mansy F., B. Hoyois, M.J. de Vos, A. van Elsen A. Bollen, and E. Godfroid.** Colorimetric solid-phase capture hybridization assay for detection of amplified *Borrelia burgdorferi* DNA. 1996. Biotechniques 21: 122-125.
16. **Melchers W.J.G., J.F. Meis, P.A. Rosa, E.C.J. Claas, L. Nohlmans, R. Koopman, A. Horrevorts, and J. Galama.** Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease. 1991. J. Clin. Microbiol. 29 : 2401-2406.

17. **Moter S.E., H. Hofman, R. Wallich, M.M. Simon, and M.D. Kramer.** Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA-specific PCR. 1994. J. Clin. Microbiol. 32 : 2980-2988.
18. **Mourtisen C.L., C.T. Wittwer, C.M. Litwin, L.M. Yang, J.J. Weis, T.B. Martins, T.D. Jaskowski, and H.R. Hill.** Polymerase chain reaction detection of Lyme disease-correlation with clinical manifestations and serologic responses. 1996. A. J. Clin. Pathol. 105 : 647-654.
19. **Müller D.E., P.H. Itin, S.A. Böchner, and T. Ruffli.** Acrodermatitis chronica atrophicans involving the face. Evidence for *Borrelia burgdorferi* infection confirmed by DNA amplification. 1994. Dermatology. 189 : 430-431.
20. **Nielsen S.L., KJ. Younk, and A.G. Barbour.** Detection of *Borrelia burgdorferi* by the polymerase chain reaction. 1990. Mol. Cell. Probes. 4 : 73-79.
21. **Nocton J.J., F. Dressler, B.J. Rutledge, P.N. Rys, D.H. Persing, and A.C. Steere.** Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. 1996. J. Infect. Dis. 174 : 623-627.
22. **Péter O., A.-G. Bretz, D. Postic, and E. Dayer.** Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. 1997. Clin. Microbiol. and Infect. 3 : p. 423-431.
23. **Rijpkema S.G., R.G. Herbes, N. Verbeek-De Kruif, and J.F. Schellekens.** Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* ss., *Borrelia garinii* and group Vs116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. 1997. Clin. Microbiol. Infect. 3 : 109-116.
24. **Schwartz I., G.P. Wormser, J.J. Schwartz, D.A. Cooper, P. Weissensee, A. Gazumyan, E. Zimmermann, N.S. Goldberg, S. Bittker, G.L. Campbell, and C.S. Pavia.** Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions. 1992. J. Clin. Microbiol. 30 : 3082-3088.
25. **Von Stendink L.V., I. Olsson, H.S. Hanson, E. Asbrink, and A. Hovmark.** Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. 1995. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14 : 1-5.

4. Discussion

4.1 Classification des espèces *Borrelia burgdorferi* sl.

La première isolation de l'agent responsable de la borréliose de Lyme, *B. burgdorferi*, date de 1982. Elle a été réalisée à partir d'une tique américaine (Burgdorfer 82). L'année suivante on dénombre déjà quelques isolats européens (Barbour 83 et Benach 83). La comparaison entre isolats européens et américains laisse aussitôt entrevoir une grande variabilité au sein de *Borrelia*. En effet, Barbour décrit en 1985 quatre phénotypes distincts de la bactérie à partir du profile protéique particulier de l'OspA. Il appuie ses résultats sur les réactions spécifiques des anticorps monoclonaux et d'une sonde moléculaire dirigée contre le gène *ospA*.

Dès 1990, un article de Postic suggérait que *B. burgdorferi* sl. pouvait cacher plus d'une espèce (Postic 90). Par la suite ces observations seront largement reprises par d'autres auteurs (Péter 92, Wilske 86, Wilske 92). En 1992, alors que Marconi publie deux études sur la variabilité du gène 16S rARN, démontrant l'existence de trois groupes distincts GI, GII et GIII (Marconi^a 92 et Marconi^b 92), Péter définit quatre groupes distincts sur la base du profil de migration de l'OspA et de l'OspB de différents isolats (Péter 92). Ces résultats sont déjà confirmés par la spécificité d'un anticorps monoclonal, le D6 (Péter 92). C'est cependant Baranton qui emploie pour la première fois le terme de nouvelle espèce en présentant la caractérisation de *B. garinii* (Baranton^a 92). La description de cette nouvelle espèce est établie sur la base du taux d'hybridation ADN-ADN entre les souches des différentes espèces. Il définit également un troisième groupe, appelé VS461, dont le profil de migration avait été décrit par Péter (Péter 92). Canica, suivant les mêmes critères, proposera l'année suivante de le renommer du nom de *B. afzelii* (Canica 93). Depuis la caractérisation de *B. afzelii*, de nombreuses nouvelles espèces ont été décrites en Europe et au Japon. Ainsi, on peut citer *B. japonica* (Kawabata 93) et plus récemment encore, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae* (Le Flèche 97, Wang 97) ainsi que *B. tanukii* et *B. turdi* (Fukunaga^b 96).

Se basant sur l'analyse des gènes codant pour la flagelline, l'OspA et deux « heat shock proteins », Wallich a estimé que la classification de *Borrelia* comporterait un nombre restreint d'espèces différentes. Il a ainsi évalué à 12 le nombre de séquences variables de l'OspA (Wallich 92). Cependant, il est fort de constater que le nombre d'espèces ne fait qu'augmenter. Une analyse des souches *B. garinii* a relevé, outre une variabilité du gène codant pour la 39 kDa (Roessler 97), une grande hétérogénéité du gène *ospA* parmi les différents isolats de cette espèce (Godfroid 95). Par ailleurs, comme le confirme cette étude, plusieurs souches de *B. valaisiana* semblent démontrer une grande diversité dans la séquence de cette protéine. A ce jour, on dénombre chez *B. valaisiana* quatre profils protéiniques différents de l'OspA dont plusieurs semblent être confirmés par la variabilité de ce gène (Masuzawa 99). Cependant, l'hétérogénéité de l'*ospA* n'a pas encore été expliquée.

4.2 Epidémiologie de *Borrelia valaisiana*

Isolée pour la première fois en Suisse-VS, à partir d'une tique *Ixodes ricinus*, la souche VS116 fait référence pour caractériser l'espèce *B. valaisiana* (Péter 92, Péter 95, Wang 97).

Bien que la majorité des isolats proviennent d'*I. ricinus*, l'association absolue entre *B. valaisiana* et ce vecteur n'a pas été confirmée. En effet, des isolats ont été obtenus à partir des tiques *I. persulcatus* (Postic^a 94), *I. columnae* (Japon), *I. granulatus* (Chine du Sud) et *I. nipponensis* (Corée) (Fukunaga^b 96, Fukunaga^c 96, Masuzawa 99).

Même si la PCR a permis de détecter sa présence dans de nombreux pays d'Europe, l'isolement de *B. valaisiana* demeure faible (Kirstein 97, St-Girons 98). Il est par ailleurs difficile de déterminer si ces résultats sont dus à une prédominance des autres espèces de *Borrelia* ou si les méthodes d'isolement sont moins favorables à *B. valaisiana*. De nombreuses études semblent prouver que cette espèce se développe difficilement dans de nombreux hôtes. En effet, Kurtenbach décrit qu'en Angleterre, même si *B. valaisiana* est l'espèce prédominante

détectée chez les tiques, aucune souche n'a pu être isolée à partir des rongeurs (Kurtenbach^a 98). Il semblerait ainsi, que cette espèce se développe de préférence chez les oiseaux (*Turdus merula*) plutôt que chez les rongeurs (Humair^a 96, Humair^a 98). Au vu de ces résultats, il est probable que certains facteurs présents chez les rongeurs inhibent la croissance de *B. valaisiana*, comme cela a été démontré avec *B. garinii* et le complément (Kurtenbach^b 98, Sewell 99). La température corporelle élevée des oiseaux semble être un des éléments nécessaires à la croissance de *B. valaisiana*, ce qui pourrait expliquer les difficultés rencontrées dans l'isolement de cette espèce. Le nombre d'isolats de *B. valaisiana* était trop faible dans cette étude pour pouvoir déterminer sa température de croissance préférentielle en milieu BSK. Elle semble cependant se situer au-dessus de 32°C. Dans tous les cas, il apparaît clairement que les espèces n'ont pas le même potentiel infectieux suivant les différents hôtes (Donahue 87, Humair^a 98, Kurtenbach^a 98, Nakao 94, Mather 89, Matuschka 92, Olsen 93), elles ne présentent pas la même pathogénicité chez l'homme.

Il est par ailleurs intéressant de noter que la transmission de *B. valaisiana* est souvent associée à celle de *B. garinii* et que des infections mixtes par ces deux espèces sont courantes (Kurtenbach^a 98, Kirstein 97), même si des infections mixtes par *B. afzelii* et *B. valaisiana* ont aussi été décrites (Golubic 98, Rijpkema 96). Le rapprochement entre ces deux espèces peut même aussi être appliqué à leur répartition géographique. En effet, la présence de *B. valaisiana* en Europe semble souvent liée à celle de *B. garinii*. Ainsi, dans la plupart des régions où les souches de *B. valaisiana* ont été détectées (Angleterre, Irlande, Suisse et Russie), *B. garinii* est apparue comme espèce prédominante (Kurtenbach^a 98, Péter 95, Postic 97, Rijpkema 95). De même en Irlande, alors que *B. valaisiana* est décrite comme espèce dominante, *B. garinii* apparaît aussi comme une espèce fréquemment isolée dans cette région (Kirstein 97). Au vu de ces résultats, nous pouvons supposer que les conditions nécessaires à la croissance de *B. valaisiana* sont comparables à celles de *B. garinii*. Ce qui justifierait l'affinité que porte ces deux espèces pour les mêmes hôtes (Humair^a 98, Kurtenbach^a 98).

4.3 Typisation des isolats *Borrelia valaisiana*

La typisation des isolats de *B. valaisiana* était jusqu'à présent possible selon trois méthodes de caractérisation. La première consiste en une digestion enzymatique du rARN par des enzymes de restriction, telles que *Hind* III ou *EcoRV* suivie d'une hybridation avec une sonde moléculaire. Le profil de migration des souches *B. valaisiana* est alors caractérisé respectivement par quatre (2.1, 1.2, 0.8 et 0.6 kb) et trois (6.9, 3.2 et 1.4 kb) fragments d'ARN (Wang 97). La deuxième méthode quant à elle, consiste, après amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl*, en une digestion avec l'enzyme de restriction *Mse* I. On obtient ainsi quatre fragments (175, 50, 23 et 7 pb) caractéristiques de *B. valaisiana* (Postic 94). Une digestion de l'intergène codant pour les sous-unités ribosomiques 5S-23S par les enzymes de restriction *Mlu* I ou *Sma* I a aussi été décrite et présente, respectivement, deux bandes (340 et 90 kb) et quatre fragments caractéristiques (Busch 99). Après amplification du gène *rrs* de l'ARN ribosomique (Ras 96), une digestion avec l'enzyme de restriction *Bfa* I permet d'obtenir un profil de migration, caractéristique de *B. valaisiana*, de cinq fragments (689, 504, 159, 78 et 58 pb). L'amplification du gène *ospA* au moyen d'amorces spécifiques qui est proposée dans cette étude est cependant la seule méthode qui parvienne, en une seule étape, à typiser *B. valaisiana*. Néanmoins, cette méthode ne présente pas une sensibilité et une spécificité suffisante pour garantir la typisation d'un isolat. Il convient alors de confirmer chaque résultat par une seconde approche qu'elle soit génétique ou protéique.

L'évaluation des amorces spécifiques du gène *ospA* de *B. valaisiana* a permis de déterminer au moins deux sous-groupes chez *B. valaisiana*. En effet, l'absence d'amplification de la souche NE231 avec ces nouvelles amorces nous a conduit à séquencer son gène *ospA*. Le degré d'homologie entre cette séquence et celle de la souche VS116 s'est révélé être de 70.3%, alors qu'il se situe généralement autour de 99% entre deux souches appartenant au même sous-groupe. Ces résultats sont par ailleurs confirmés par le manque de réactivité de

cette souche avec le monoclonal A116k, spécifique à l'OspA de *B. valaisiana*. D'autre part, les résultats obtenus suite à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *Mlu* I (Busch 99) démontrent chez la souche M7, un profil de migration particulier. Or, comme décrit dans ce travail, le séquençage de la souche M7, s'apparie très nettement à celui de la souche M53 et NE231. Nous avons donc proposé, dans cette étude, de regrouper ces trois isolats dans le même sous-groupe de *B. valaisiana*. Afin de déterminer si ce groupe peut être attaché à une nouvelle espèce de *Borrelia*, il faudrait séquencer d'autres parties du génome. Sur ce point, la question reste donc ouverte. Cependant, la souche Frank fait, elle aussi, très certainement partie de ce sous-groupe, du fait que le profil protéinique de son OspA est similaire à celui des souches M7 et M53. En considérant, dès lors, que les quatre souches qui ne présentaient pas de réactivité avec le monoclonal A116k font partie d'un sous-groupe particulier, la sensibilité du monoclonal A116k se révèle excellente face au sous-groupe 1, réunissant la plupart des isolats de *B. valaisiana* décrits jusqu'à présent. Nous le conseillons donc vivement comme support à la méthode génique lors de la caractérisation des isolats de *Borrelia*.

Potentiel infectieux

En 1992, alors que Baranton établit la première classification chez *Borrelia*, incluant *B. burgdorferi* ss., *B. garinii* et le groupe VS461, le rôle pathogène de ces trois espèces était déjà démontré chez l'homme (Baranton^a 92, Wilske 86, Wilske 88). On dénombrait alors, au moins quatre isollements de *B. burgdorferi* ss. (Ip1, Ip2, Ip3 et 297) et deux isollements de *B. garinii* (Pbi et Pbr) à partir du liquide céphalo-rachidien chez l'homme; ainsi que trois isollements de *B. afzelii*, identifiés sous le groupe VS461, (Bo23, Pgau et UMOI) à partir d'échantillons de peau. La confirmation du potentiel pathogène de ces différentes espèces n'est garanti que par le nombre d'isollements de chacune de ces espèces et par la caractérisation génétique des spirochètes amplifiés à partir d'échantillons humains. Cependant, la probabilité, aussi minime soit-elle, que derrière chaque résultat se cache une infection multiple n'est pas à exclure. Une étude réalisée par L. Gern a ainsi démontré que le taux d'isolation des différentes espèces ne dépendait pas du nombre de spirochètes mais du potentiel de chaque espèce à se développer dans le milieu de culture (Gern 99). Il se peut donc que les spirochètes isolés à partir des échantillons humains ne soient pas forcément représentatifs de l'espèce infectante. Cependant, même si la caractérisation par PCR ne permet pas d'exclure tout risque d'infection mixte, elle appuie fortement les résultats de la culture au sujet de la pathogénicité des différentes espèces. Jusqu'à présent, l'implication clinique de *B. valaisiana* n'a été suggérée que dans des cas d'infections précoces. Après une amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl*, une hybridation a permis de déterminer la présence de cette espèce chez des patients avec érythème migrant. Deux échantillons ont alors révélé la présence de *B. valaisiana* (Rijpkema 97). Au moyen des amorces *ospA* spécifiques à *B. valaisiana*, nous avons suggéré le pouvoir pathogène de cette espèce. Par ailleurs, une étude sérologique nous a permis d'évaluer contre quelle espèce était préférentiellement dirigée la réponse immunologique chez une centaine de patients atteints de borréliose de Lyme chronique. A mon avis, la mise au point de cette méthode permet d'observer la pathogénicité des différentes espèces en fonction de la réponse immunologique de l'hôte. Nous avons ainsi pu déterminer, dans quatre cas, le potentiel infectieux de *B. valaisiana* dans les manifestations chroniques de la borréliose de Lyme. En effet, trois patients atteints de neuroborrélioses et un patient avec arthrite ont démontré une réactivité plus forte dirigée contre *B. valaisiana*. Il est intéressant de noter que les manifestations cliniques observées suite à une probable infection par *B. valaisiana* sont comparables à celles engendrées par *B. garinii*. Bien qu'une controverse soit reprise, à ce propos, par plusieurs groupes, nous soutenons activement la présence d'une association entre les trois espèces de *Borrelia* et les manifestations cliniques. Cette association a été soutenue, dans ce travail, par une évaluation immunologique de la réactivité préférentielle d'une centaine de sera. Approximativement 60% des sera de patients atteints de neuroborréliose ont été décrits comme ayant une réactivité plus forte en immunoblot avec *B. garinii* (Anthonissen 94,

Assous 93, Demaerschalk 95, Péter 97). Cette association a cependant été réfutée par Eiffert qui suggère que la prévalence élevée du taux d'infection de cette espèce soit due à sa répartition géographique particulière. Cet argument ne tient malheureusement pas compte de la prédominance des piqûres de nymphes chez l'homme (Gray 98) principalement infectées par *B. afzelii* (Gern, communication personnelle) ni de la pathogénicité de chaque espèce chez l'homme. En effet, il a été démontré que les sérotypes de *Borrelia* étaient différents entre les enfants et les adultes atteints de neuroborréliose. Les différents types de l'OspA des isolats observés chez les enfants apparaissaient similaires par contre, à ceux observés chez les tiques (Wilske 96). Ces résultats, suggérant plusieurs degrés de pathogénicité des différentes espèces chez l'homme ont été corroborés par ceux de Liveris et Picken (Liveris 96, Picken 96). En effet, Picken a observé, dans une même région, une différence des espèces prédominantes entre les isollements des tiques et ceux des patients. Alors que *B. afzelii* a été principalement isolée à partir des échantillons humains (75%), suivi de *B. burgdorferi* ss. et *B. garinii*, la fréquence d'isolement de *B. afzelii* chez les tiques n'est que de 53% (*B. garinii* 33% et *B. burgdorferi* ss. 13%) (Picken 96). Liveris appuie, quant à lui, ses résultats sur une analyse PCR-RFLP du gène 16S-23S d'une centaine d'isolats obtenus à partir de patients avec un érythème migrant (Liveris 96). Il obtient ainsi des résultats différents en fonction de la nature de l'échantillon et démontre lui aussi différents degrés de pathogénicité des espèces chez l'homme.

Tandis que l'association entre les ACA et les infections dues à *B. afzelii* proposée par Canica a été confirmée par d'autres groupes (Canica 93, Dunand 98, Assous 93, Van Dam 93, Wienecke 94, Picken 98), l'association entre les arthrites et les infections dues à *B. burgdorferi* ss. présente de larges controverses. Ainsi, bien que d'autres résultats confirment une association (Assous 93, Balmelli 95, Jaulhac 99), deux analyses génétiques réalisées sur des échantillons cliniques de patients avec arthrites de Lyme ne présentent pas de prévalence d'une espèce particulière (Vasiliu 98, Eiffert 98). En effet, ces études, réalisées en Allemagne sur des liquides articulaires au moyen d'une PCR dirigée contre le gène *ospA* de *Borrelia*, ont permis de séquencer, après amplification, autant l'ADN de *B. burgdorferi* ss. que celui de *B. garinii* et *B. afzelii*. Cependant, le pourcentage élevé d'échantillons n'ayant pas présenté d'amplification (Eiffert 36%, Vasiliu 35%) permet de suggérer une déviation des résultats. Non seulement, un manque de sensibilité des amorces pourrait expliquer le faible pourcentage d'infection, mais le fait que les espèces ne présentent pas toutes le même potentiel dans leur attachement aux différents tissus humains devrait aussi être envisagé. En effet, alors que de nombreux auteurs ont démontré le rôle des protéoglycanes dans la liaison des spirochètes aux cellules épithéliales (Leong 95, Leong 98, Isaac 94, Wadstrom 99), une étude récente a démontré des variabilités dans la capacité de liaison des différentes souches (Parveen 99). Il est dès lors envisageable que plus la capacité de liaison d'une espèce est élevée, plus il sera difficile de la détecter dans les liquides avoisinants. Ce phénomène a été préalablement décrit lors de la détection des *Treponema pallidum* par PCR (Fitzgerald 77). La méthode immunoblot aurait alors détecté les anticorps dirigés contre l'espèce prédominante, probablement responsable de l'infection, tandis que la PCR aurait détecté les spirochètes présents dans le liquide biologique. Il est encore à noter que la comparaison par immunoblot est basée sur la réaction immunologique de plusieurs protéines, alors que la PCR se base sur la présence d'un fragment de gène particulier. Or, la variabilité des différentes souches rend l'interprétation de ces résultats très complexe. C'est pourquoi nous soutenons activement l'observation de la réponse immunologique dans la caractérisation de l'espèce infectante. Par ailleurs, l'association entre les manifestations cliniques et les différentes espèces pourraient être justifiée par un organotropisme. En effet, de même que l'observation des réservoirs à *Borrelia* semblait démontrer une association entre les espèces et les différents hôtes, on pourrait entrevoir une prédisposition des organes à être infectés par certaines espèces. Hovius a du reste décrit ce tropisme lors de la dissémination des espèces chez des chiens infectés (Hovius 99). Cet organotropisme expliquerait, par ailleurs, les quelques cas chez lesquels la

caractérisation de l'espèce infectante chez un même patient révèle des résultats différents en fonction de la nature des échantillons. En effet, Liveris décrit le cas d'un patient chez lequel une analyse RFLP n'a pas révélé la présence de la même espèce de *Borrelia* dans du sang que dans un échantillon de peau (Liveris 96). Par ailleurs, notre étude sur l'évaluation par immunoblot de la réactivité préférentielle des sera contre quatre espèces de *Borrelia* a démontré un résultat sérologique dirigé contre *B. afzelii* tandis que la PCR effectuée sur l'urine du même patient a révélé la présence de *B. garinii*. Il se peut par ailleurs, que la température y joue un rôle. En effet, la température préférentielle de croissance des différentes espèces pourrait être responsable de cet organotropisme. Les légères variations de températures entre la peau et les organes internes de l'homme pourraient être comparées aux différentes températures observées chez les hôtes réservoirs de *Borrelia* (oiseaux, rongeurs etc.). Ainsi, on pourrait établir une corrélation entre la température interne de l'homme et celle observée chez les oiseaux. Cette température, de quelques degrés plus élevée que celle du derme humain ou celle des rongeurs, pourrait être associée à la croissance de *B. garinii* et *B. valaisiana*, tandis qu'une température plus faible serait plus favorable à *B. afzelii*. Néanmoins, il ne s'agit ici que de suppositions qui nécessitent d'être confirmées par une méthode sensible permettant à la fois une détection des spirochètes et leur typisation. L'élaboration d'une méthode PCR présentant une sensibilité élevée sur différents échantillons cliniques, se révélerait être de grande utilité. Actuellement, les PCR employées dans le diagnostic clinique de la borréliose de Lyme présentent un taux de détection variant en fonction de la nature de l'échantillon. Ainsi, les PCR sur les échantillons de peau présentent habituellement une sensibilité de 60% à 80% (Moter 94, Melchers 91, von Stedingk 95), tandis que celles sur les liquides céphalo-rachidiens (LCR), lors des manifestations neurologiques, présentent un pourcentage d'amplification beaucoup plus faible (Amouriaux 93, Lebech 98, Luft 92, Nocton 96). La sensibilité des tests PCR effectués sur des liquides articulaires est, quant à elle, aussi décrite comme étant plus faible que celle des échantillons de peau (Nocton 94). Elle dépend généralement du gène amplifié (Liebling 93, Malawista 92).

Dans cette étude, le choix de la PCR s'est porté sur le gène spécifique de l'*ospA*. Le haut pouvoir discriminatif de la protéine ainsi que la grande variabilité de son PM, observée entre les différentes espèces, présentaient des avantages indiscutables en vue de l'obtention d'un second outil pour la typisation des isolats. Cependant, même si le gène *ospA* situé sur un plasmide présente de nombreuses copies, sa variabilité, entre et au sein des différentes espèces, est un inconvénient certain pour la caractérisation des souches. En effet, les gènes *ospA* et *ospB*, ont été décrits comme présentant une grande hétérogénéité (Wilske 92). Les PCR dirigées contre ces gènes n'amplifient alors pas toutes les souches isolées en Europe (Debue 91, Nielsen 90, Persing 90, Schmidt 95). Plusieurs régions du gène *fla* ont aussi été employées dans le diagnostic pour détecter *Borrelia*. De nombreux auteurs ont, dans ce cas, démontré la stabilité du gène *fla* entre les différentes espèces de *Borrelia* (Fukunaga 95, Nocton 95, Picken 92). Le seuil de détection et le pourcentage de sensibilité varient cependant en fonction de ces différentes régions et sont parfois communes avec d'autres bactéries tels que *Bacillus subtilis*. Le gène chromosomal 2H1, bien que n'amplifiant pas tous les isolats, a aussi été décrit comme présentant une bonne sensibilité (Pachner 93). Ainsi, Melchers a décrit un taux d'amplification de 80% sur des biopsies de peau de patients avec EM ou ACA (Melchers 91). Le gène chromosomal *ly 1* est un fragment de l'ARN de la polymérase C. Il a aussi été décrit comme présentant une sensibilité élevée sur des échantillons tels qu'urine et liquide articulaire (Bradley 94). L'extrémité 5' du gène ribosomique 23S appartient, quant à lui, à tous les isolats de *B. burgdorferi* sl. testés, sans présenter pour autant d'amplification avec d'autres espèces de *Borrelia*. La sensibilité de la méthode décrite par Schwartz atteint 59% de PCR positives sur des biopsies de peau (Schwartz 92). Au vu de ces résultats, il serait plus judicieux d'envisager une PCR dirigée contre un fragment de gène chromosomal. En effet, même si ce dernier ne présente pas l'avantage de posséder des copies multiples, sa constance entre les différentes souches en est un. Par ailleurs, il serait envisageable

d'augmenter la sensibilité de la méthode en employant une « nested » PCR avec deux amorces distinctes. Afin d'éviter le risque de contamination qu'entraîne cette technique, on pourrait alors choisir deux lots d'amorces présentant des températures d'annealing distinctes. Ce qui permettrait, en effet, d'effectuer deux PCR sans ouvrir le tube entre les amplifications. On effectue pour cela, une première PCR avec les amorces dont la température est la plus élevée. La deuxième amplification est ensuite réalisée à température plus basse avec des amorces reconnaissant un fragment des amplicons précédemment amplifiés. La sensibilité est ainsi accrue sans pour autant augmenter le risque de contamination lors de la manipulation du matériel amplifié. Cette méthode a été décrite par Picken (Picken 96). Dans le but de la typisation des espèces, les premières amorces pourraient être dirigées contre *B. burgdorferi* sl. tandis que les secondes seraient alors spécifiques à chaque espèce. On obtiendrait, ainsi, en un seul run, la caractérisation de l'espèce. Une nette amélioration de la sensibilité des PCR permettrait ainsi de limiter à un seul test la confirmation du diagnostic clinique de la maladie. Par ailleurs, on pourrait immédiatement caractériser la ou les espèces infectantes. Une meilleure connaissance du pouvoir pathogène de chaque espèce permettrait, en outre, de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'infection et pourrait ainsi améliorer l'efficacité du vaccin. D'autre part, une meilleure connaissance des protéines spécifiques, notamment celles qui sont responsables des mécanismes d'attachement des spirochètes aux différents tissus, pourrait améliorer la sensibilité des tests de détection directe, tels que la PCR, qui présente actuellement le risque de ne pas détecter les bactéries attachées aux différents tissus humains. De façon similaire, la caractérisation des protéines de *Borrelia*, comme proposé dans cette étude, permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité des tests sérologiques. On pourrait ainsi envisager, par exemple, l'élaboration d'un immunoblot recombinant réalisé à partir de protéines spécifiques à chaque espèce. On obtiendrait ainsi, au moyen d'une seule bandelette, en plus de la confirmation de l'infection par *Borrelia*, la typisation de l'espèce infectante.

4.4 Conclusion

Après avoir regroupé une majeure partie des souches *B. valaisiana* isolées à travers l'Europe, cette étude a présenté une caractérisation phénotypique et génotypique de l'espèce. La cartographie sur électrophorèse bidimensionnelle de la souche VS116 a ainsi été réalisée.

Par ailleurs, afin de simplifier la typisation des souches *B. valaisiana*, deux outils ont été proposés. A savoir, un anticorps monoclonal dirigé contre l'OspA de *B. valaisiana* et une paire d'amorce spécifique au gène *ospA* de cette espèce.

Les résultats de ces deux méthodes de typisation ont révélé l'existence d'un sous-groupe de *B. valaisiana*, incluant les souches NE231, M7, M53 et probablement aussi la souche Frank. Afin de déterminer si ce groupe pouvait être rattaché à une nouvelle espèce de *Borrelia*, il faudrait séquencer d'autres parties du génome. La question sur ce point reste donc ouverte.

Pour terminer, le potentiel pathogène de *B. valaisiana* a été évalué selon deux méthodes. En effet, la première implication clinique de cette espèce a été observée au moyen d'un immunoblot dirigé contre quatre espèces de *Borrelia* (*B. burgdorferi* ss., *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. valaisiana*). Parallèlement, une PCR a été réalisée avec les nouvelles amorces dirigées contre le gène *ospA* de *B. valaisiana*. Dans les deux cas, les résultats ont démontré la présence de *B. valaisiana* dans les stades chroniques de la maladie, suggérant ainsi le potentiel pathogène de cette espèce.

D'autre part, les résultats sérologiques de cette étude confirment l'association, souvent controversée, entre les manifestations cliniques et les différentes espèces de *Borrelia*. Ainsi il nous apparaît clairement que *B. burgdorferi* ss. est associée aux arthrites alors que *B. garinii* est associée aux problèmes neurologiques et *B. afzelii* aux ACA.

B. valaisiana semblerait, de façon générale, s'apparenter aux mêmes symptômes que *B. garinii*. Ce qui est fort intéressant du fait que ces deux espèces semblent partager la même affinité pour leurs hôtes potentiels.

Résumé

Le but de cette étude étant la caractérisation phénotypique et génotypique de *B. valaisiana*, il fallait obtenir un maximum d'isolats de cette nouvelle espèce. La souche VS116 avait été isolée à partir d'un biotope de la région de Rarogne, nous sommes donc retournés sur nos pas pour tenter d'obtenir de nouveaux isolats de *B. valaisiana*. A partir des 89 tiques récoltées, nous avons ainsi obtenu cinq isollements dont une nouvelle souche *B. valaisiana*. La sensibilité des méthodes de détection a varié en fonction du stade de développement de la tique. En effet, alors que la PCR s'est avérée efficace lors de la détection des spirochètes chez les tiques adultes, l'IF était plus sensible chez les nymphes.

Par ailleurs, nous avons regroupé une grande partie des souches *B. valaisiana* ayant été isolées à travers l'Europe. La description phénotypique de l'espèce a ainsi pu être établie sur la base de 24 isolats. Le profil de migration des souches *B. valaisiana* a ensuite été décrit et la cartographie sur électrophorèse bidimensionnelle de la souche VS116 a été réalisée.

Afin de permettre une typisation rapide par immunoblot de l'espèce, le monoclonal A116k dirigé contre l'OspA de *B. valaisiana* a été produit à partir de la souche VS116. Il s'est révélé être d'une excellente spécificité. Le manque de réactivité de quatre souches *B. valaisiana*, Frank, M7, M53 et NE231, avec le monoclonal A116k, a été expliqué du fait qu'elles présentaient une OspA particulière.

Dans le but de simplifier la caractérisation génétique de *B. valaisiana*, une nouvelle paire d'amorce spécifique du gène *ospA* de *B. valaisiana* a été décrite dans cette étude.

L'évaluation de la sensibilité et de la spécificité de cette amorce a mis en évidence le manque de réactivité de la souche NE231. Une analyse complémentaire a alors permis d'observer une séquence particulière du gène *ospA* de cette souche. Cette séquence est d'ailleurs comparable à celle des souches M7 et M53, non réactive avec A116k.

Afin de déterminer la possibilité d'une infection humaine par *B. valaisiana*, deux méthodes parallèles ont été appliquées. La première est un immunoblot dirigé contre quatre espèces de *Borrelia* (*B. burgdorferi* ss., *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. valaisiana*). Il s'agit d'une méthode indirecte permettant de détecter, dans des sérums de patients atteints de borréliose, les anticorps spécifiques de chaque espèce. D'autre part, en Europe, bien que controversées, de nombreuses études ont décrit une association entre les manifestations cliniques de la maladie et les différentes espèces de *Borrelia* (Anthonissen 94, Assous 93, Baranton 92, Péter 97, van Dam 93). Les résultats sérologiques de cette étude démontrent une association entre *B. burgdorferi* sensu stricto et les arthrites, *B. garinii* et les problèmes neurologiques ainsi que *B. afzelii* et les acrodermatites chroniques atrophiantes. Dans ce cas, trois sera de patients avec neuroborréliose et un sérum de patient avec arthrite de Lyme ont présenté une réactivité plus forte contre *B. valaisiana*. Parallèlement, une PCR a été réalisée. Il s'agit d'une méthode de détection spécifique, par amplification génique, effectuée sur des échantillons cliniques (urines, LCR, liquide synovial, biopsie de peau) de patients atteints de borréliose. Cette PCR a permis de mettre en évidence la présence de cette espèce dans une ponction articulaire de patient atteint de borréliose. Le potentiel pathogène de l'espèce a ainsi été fortement suggéré chez l'homme.

Bibliographie

1. **Aeschlimann A., W. Burgdorfer, H. Matile, O. Péter, and R. Wyler.** Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. 1979. Acta. Trop. 36 : 181-191.
2. **Aeschlimann A., E. Chamot, F. Gigon, J.P. Jeanneret, D. Kessler, and C. Walther.** *B. burgdorferi* in Switzerland. 1987. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg. [A]. 263: 450-458.
3. **Aeschlimann A., and T.A. Freyvogel.** Biology and distribution of ticks of medical importance. 1995. In Clin. Toxicology of animal venous and poisons. S. Meier and S. White. P. 177-189.
4. **Afzelius A.** Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft in Stockholm ; Sitzung vom 16. Dezember 1909. 1910. Arch. Dermat. u. Syph. 101 : 405-406.
5. **Anonyme.** Recommendations for Test Performance and Interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. 1995. MMWR. 44: 590-591.
6. **Anthonissen F.M., M de Kesel, P.P. Hoet, and G.H. Bigaignon.** Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. 1994. Res. Microbiol. 145: 327-331.
7. **Altpeter E.S., and C. Meier.** Epidemiologische Aspekte der neurologischen Komplikationen der Lyme-Borreliose in der Schweiz. 1992. Schweiz. Med. Wochenschr. 122: 22-26.
8. **Appel R.D. P.M. Palagi, D. Walther, J.R. Vargas, J.C. Sanchez, F. Ravier, C. Pasquali, and D.F. Hochstrasser.** Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. 1997. Electrophoresis. 18 : 2724-2734.
9. **Asbrink E.** Cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Clinical definitions and differential diagnoses. 1991. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 77: 44-50.
10. **Asbrink E.** *Acrodermatitis chronica atrophicans*. 1993. Clin. Dermatol. 11 : 369-375.
11. **Assous M.V., D. Postic, G. Paul, P. Nevot, and G. Baranton.** Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. 1993. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 261-268.
12. **Balmelli T., and J.C. Piffaretti.** Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 1995. Res. Microbiol. 146 : 329-340.
13. **Baranton^a G., M. Assous, and D. Postic.** Trois espèces bactériennes associées à la borreliose de Lyme. Conséquences cliniques et diagnostiques. 1992. Bull. Acad. Natl. Med. 176: 1075-85; discussion 1085-1086.
14. **Baranton^b, G., D. Postic, I. Saint-Girons, P. Boerlin, J.C. Piffaretti, M. Assous, and P.A.D. Grimont.** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. 1992. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 378-383.
15. **Baranton G, N. Marti Ras, and D. Postic.** *Borrelia burgdorferi*, taxonomie, pathogénicité et distribution. 1998. Ann. Méd. Interne (Paris). 149 : 455-458.
16. **Barbour A.G, W. Burgdorfer, S.F. Hayes, O. Péter, and A. Aeschliman.** Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. 1983. Curr. Microbiol. 8 : 123-126.
17. **Barbour A.G., S.L. Tessier, and S.F. Hayes.** Variation of a major protein of Lyme disease spirochetes. 1984. Infect. Immun. 45 : 94-100.
18. **Barbour A.G., R.A. Heiland, and T.R. Howe.** Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. 1985. J. Infect. Dis. 152: 478-484.
19. **Barbour A.G., and S.F. Hayes.** Biology of *Borrelia* species. 1986. Microbiol. Rev. 50: 381-400.

20. Barbour A.G., and C.F. Garon. Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. 1987. Science. 237: 409-411.
21. Baril C., C. Richaud, G. Baranton, and I. Saint-Girons. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. 1989. Res. Microbiol. 40 : 507-516.
22. Bellet-Edimo O.R.. Importance de la transmission transstadiale et de la transmission transovarienne du spirochète *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales :Spirochaetaceae) chez la tique *Ixodes ricinus* (Acari :Ixodidae) dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme. 1997. PhD Thesis, University of Neuchâtel, Switzerland, p.123
23. Benach J., E.M. Bosler, J.P. Hanrahan, J.L. Coleman, G.S. Habicht, T.F. Bast, D.J. Cameron, D.J. Ziegler, A.G. Barbour, W. Burgdorfer, R. Edelman, and R.A. Kaslow. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. 1983. N. Engl. J. Med. 308 : 740-742.
24. Berger B.W., R.C. Johnson, C. Kodner, and L. Coleman. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from the blood of two patients with erythema migrans lesions lacking extracutaneous signs and symptoms of Lyme disease. 1994. J. Am. Acad. Dermatol. 30 : 48-51.
25. Bissett M.L., and W. Hill. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California. 1987. J. Clin. Microbiol. 25 : 2296-2301.
26. Bradley J.F., R.C. Johnson, and J.L. Goodman. The persistence of spirochetal nucleic acids in active Lyme arthritis. 1994. Ann. Intern. Med. 120 : 487-489.
27. Brandt M.E., B.S. Riley, J.D. Radolf, and M.V. Norgard. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. 1990. Infect. Immun. 58 : 983-991.
28. Bunikis, J., I. Noppa, Y. Ostberg, A.G. Barbour, and S. Bergström.. Surface exposure and species specificity of an immunoreactive domain of a 66-kilodalton outer membrane protein (P66) of the *Borrelia* spp. that cause Lyme disease. 1996. Infect. Immun. 64: 5111-5116.
29. Burgdorfer W., A.G. Barbour, S.F. Hayes, J.L. Benach, E. Grunwaldt, and J.p. Davies. Lyme disease- a tick borne spirochetosis ? 1982. Science. 220 : 321-322.
30. Burgdorfer W. *Borrelia burgdorferi* : its relationship to tick vectors. 1989. In Lyme Borreliosis II. Zbl. Bakt. Suppl. 18 : 8-13.
31. Busch U., C. Hizo-Teufel, R. Boehmer, V. Fingerle, H. Nitschko, B. Wilske, and V. Preac-Mursic. Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. 1996. J. Clin. Microbiol. 34: p. 1072-1078.
32. Busch U., D. Rössler, S. Jauris-Heipke, and B. Wilske. Molecular characterization of *Borrelia valaisiana*. 1999. VIII ICLB Munich, Germany. Poster presentation P126.
33. Canica, M.M., F. Nato, L. du Merle, J.C. Mazie, G. Baranton, and D. Postic. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. 1993. Scand. J. Infect. Dis. 25 : 441-448.
34. Carreiro M.M., D.C. Laux, and D.R. Nelson. Characterization of the heat shock response and identification of heat shock protein antigens of *Borrelia burgdorferi*. 1990. Infect. Immun. 58 : 2186-2191.
35. Cinco M., D. Padovan, R. Murgia, L. Poldini, L. Frusteri, I. Van de Pol, N. Verbeek-De Kruif, S. Rijpkema, and M. Maroli. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. 1998. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17 : 90-94.
36. Craft J.E., D.K. Fischer, G.T. Shimamoto, and A.C. Steere. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. 1986. J. Clin. Invest. 78 : 934-939.

37. **Craine N.G.** The epizootiology of Lyme disease. 1994. PhD Thesis, Oxford University, UK. p.145.
38. **Craine N.G., P.A. Nuttall, A.C. Marriott, and S.E. Randolph.** Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. 1997. *Folia. Parasitol.* 44 : 155-160.
39. **Davidson B.E., J. MacDougall, and I. Saint-Girons.** Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, the causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. 1992. *J. Bacteriol.* 174 : 3766-3774.
40. **Debue M., P. Gautier, C. Hackel, A. van Elsen, A. Herzog, G. Bigaignon, and A. Bollen.** Detection of *Borrelia burgdorferi* in biological samples using the polymerase chain reaction. 1991. *Res. Microbiol.* 142 : 565-572.
41. **Demaerschalck I., A.B. Messaoud, M. de Kesel, B. Hoyois, Y. Lobet, P. Hoet, G. Bigaignon, A. Bollen, and E. Godfroid.** Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. 1995. *J. Clin. Microbiol.* 33: 602-608.
42. **Donahue J.G., J. Piesman, and A. Spielman.** Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. 1987. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36 : 92-96.
43. **Dorward D.W., T.G. Schwan, and C.F. Garon.** Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. 1991. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 1162-1170.
44. **Dressler, F., J.A. Whalen, B.N. Reinhardt, and A.C. Steere.** Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. 1993. *J. Infect. Dis.* 167: 392-400.
45. **Dunand, V., et al.** 1998. Acrodermatitis chronica atrophicans and serologic confirmation of infection due to *Borrelia afzelii* and/or *Borrelia garinii* by immunoblot. *Clin. Microbiol. and Infect.* 4: 159-163.
46. **Duray P.H., and A.C. Steere.** Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage. 1988. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 539 : 65-79.
47. **Dykhuisen D.E., D.S. Polin, J.J. Dunn, B. Wilske, V. Preac-Mursic, R.J. Dattwyler, and B.J. Luft.** *Borrelia burgdorferi* is clonal: implication for taxonomy and vaccine development. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 10163-10167.
48. **Eiffert H., A. Ohlenbusch, H.J. Christen, R. Thompsen, A. Spielman, and F.R. Matuschka.** Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. 1995. *J. Infect. Dis.* 171: 476-479.
49. **Eiffert H., F. Hanefeld, R. Thompsen, and H.J. Christen.** Reinfection in Lyme borreliosis. 1996. *Infection.* 24 : 437-439.
50. **Eiffert H., A. Karsten, R. Thompsen, and H-J. Christen.** Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. 1998. *Scand. J. Infect. Dis.* 30: 265-268.
51. **Escudero R., M. Barral, A. Hernandez, I. Rodriguez, A. Garcia-Pérez, S. Jimenez, R. Sellek, P. Anda.** Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated in Spain. 1999. VIII ICLB, Munich, Germany, Oral presentation O9.
52. **Felsenstein, J.** 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics.* 164-166.
53. **Ferdows M.S., and A.G. Barbour.** Megabase-size linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 5969-5973.
54. **Fitzgerald T.J., M.A. Tomai, G.J. Trachte, and T. Rice.** Prostaglandins in experimental syphilis: treponemes stimulate adherent spleen cells to secrete prostaglandin E2, and indomethacin upregulates immune functions. 1991. *Infect. Immun.* 59 : 143-149.
55. **Fraser C.M., S. Casjens, W.M. Huang, G.G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K.A. Ketchum, R. Dodson, E.K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J.F. Tomb, R.D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A.R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M.D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman,**

- T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fujii, M.D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H.O. Smith, and J.C. Venter. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. 1997. *Nature*. 390 : 580-586.
56. Fukunaga, M., Y. Takahashi, Y. Tsuruta, O. Matsushita, D. Ralph, M. McClelland, and M. Nakao. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. 1995. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 804-810.
 57. Fukunaga^a M., K. Okada, M. Nakao, T. Konishi, and Y. Sato. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. 1996. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 898-905.
 58. Fukunaga^b M., A. Hamase, K. Okada, and M. Nakao. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdi* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan : rapid species identification by 16S rRNA. 1996. *Microbiol. Immun.* 40 : 877-881.
 59. Fukunaga^c M., A. Hamase, K. Okada, H. Inoue, Y. Tsuruta, K. Miyamoto, and M. Nakao. Characterization of spirochetes isolates from ticks (*Ixodes tanuki*, *Ixodes turdus*, and *Ixodes columnae*) and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 2338-2344.
 60. Garin C., and M. Bujadoux. Paralyse par les tiques. 1922. *J. Med. Lyon.* 71 : 765-767.
 61. Gern L., Z. Zhu, and A. Aeschlimann. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. 1990. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65 : 89-93.
 62. Gern L., C.M. Hu, E. Kocianova, V. Vyrostekova, and J. Rehacek. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. 1999. VIII ICLB. Munich, Germany. Poster presentation p330.
 63. Gilot B., B. Degeilh, J. Pichot, B. Doche, and C. Guiguen. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) in *Ixodes ricinus* (L.) populations in France, according to a phytoecological zoning of the territory. 1996. *Eur. J. Epidemiol.* 12 : 395-401.
 64. Godfroid E., A. Ben Messaoud, A. Poliszczak, Y. Lobet, and A. Bollen. Assignment of *Borrelia burgdorferi* strains G25 and VS461 to the *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* genospecies, respectively a comparison of OspA protein sequences. 1995. *DNA Seq.* 5 : 251-254.
 65. Golaz O., G.J. Hughes, S. Frutiger, N. Paquet, A. Bairoch, C. Pasquali, J.C. Santchez, J.D. Tissot, R.D. Appel, C. Walzer, L. Balant, D.F. Hochstrasser. Plasma and red blood cell protein maps : Update 1993. 1993. *Electrophoresis.* 14 : 1223-1231.
 66. Golubic D., S. Rijpkema, N. Tkalec-Makovec, and E. Ruzic. Epidemiologic, ecologic and clinical characteristics of Lyme borreliosis in northwest Croatia. 1998. *Acta. Med. Croatica.* 52 : 7-13.
 67. Goodman J.L., P. Jurkovich, J.M. Kramber, and R.C. Johnson. Molecular detection of persistent *Borrelia burgdorferi* in the urine of patients with active Lyme disease. 1991. *Infect. Immun.* 59. 269-278.
 68. Goodman J.L., J.F. Bradley, A.E. Ross, P. Goellner, A. Lagus, B. Vitale, B.W. Berger, S. Luger, and R.C. Johnson. Bloodstream invasion in early Lyme disease : results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. 1995. *Am. J. Med.* 99 : 6-12.
 69. Gray J.S., O. Kahl, J.N. Robertson, M. Daniel, A. Estrada-Pena, G. Gettinby, T.G. Jaenson, P. Jensen, F. Jongejan, F. Korenberg, K. Kurtenbach, and P. Zeman. Lyme borreliosis habitat assessment. 1998. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 211-228.
 70. Gustafson R., B. Svenungsson, M. Forsgren, A. Gardulf, and M. Granstrom. Two-year survey of the incidence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a high-risk population in Sweden. 1992. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11 : 894-900.
 71. Hansen K., J.M. Bangsberg, H. Fjordvang, N.S. Pedersen, and P. Hindersson. Immunochemical characterization of an isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi*

- immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. 1988. *Infect. Immun.* 56 : 2047-2053.
72. **Higgins, D. G. and R. Sharp.** 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS*. 5: 151-153.
 73. **Holt S.C.** Anatomy and Chemistry of spirochetes. 1978. *Microbiol. Rev.* 42 : 114-160.
 74. **Hovius K.E., B. Beijer, S.G.T. Rijpkema, N.M.C. Bleumink-Pluym, and D.J. Houwers.** Identification of four *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in *Ixodes ricinus* ticks collected from dutch dogs. 1998. *Vet. Q.* 20 : 143-145.
 75. **Hovius K.E., L.A. Stark, N.M. Bleumink-Pluym, I. van der Pöl, N. Verbeek de Kruif, S.G. Rijpkema, L.M. Schouls, and D.J. Houwers.** Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. 1999. *Vet. Q.* 21 : 54-58.
 76. **Howe T.R., F.W. Laquier, and A.G. Barbour.** Organization of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. 1986. *Infect. Immun.* 54 : 207-212.
 77. **Hu, C.M., S. Leuba-Garcia, M.D. Kramer, A. Aeschlimann, and L. Gern.** Comparison in the immunological properties of *Borrelia burgdorferi* isolates from *Ixodes ricinus* derived from three endemic areas in Switzerland. 1994. *Epidemiol. Infect.* 112: 533-42.
 78. **Hubalek Z., J. Halouzka, and Z. Juricova.** A simple method of transmission risk assessment in enzootic foci of Lyme borreliosis. 1996. *Eur. J. Epidemiol.* 12 : 331-333.
 79. **Hubalek Z., and J. Halouzka.** Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. 1997. *Eur. J. Epidemiol.* 13 : 951-957.
 80. **Hubalek Z., and J. Halouzka.** Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. 1998. *Parasitol. Res.* 84 : 167-172.
 81. **Humair P.F., O. Péter, R. Wallich, and L. Gern.** Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. 1995. *J. Med. Entomol.* 32: 433-438.
 82. **Humair^a P.F., D. Postic, R. Wallich, and L. Gern.** An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. 1998. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 521-538.
 83. **Humair^b P.F., and L. Gern.** Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. 1998. *Acta Tropica.* 69. 213-227.
 84. **Isaacs R.D.** *Borrelia burgdorferi* binds to epithelial cell proteoglycans. 1994. *J. Clin. Invest.* 93 : 809-819.
 85. **Jaulhac B., J. Sibilia, J. Pourel, and J.L. Kuntz.** *Borrelia burgdorferi* in Lyme arthritis and undifferentiated arthritis. 1999. *Rev. Rhum. Engl. Ed.* 30: 20-22.
 86. **Johnson R.C., G.P Schmidt, F.W. Hyde, A.G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** *Borrelia burgdorferi* sp. nov. : etiologic agent of Lyme disease. 1984. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 : 496-497.
 87. **Jurca T.** Comparison of peripheral and central biopsy sites for the isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from erythema migrans skin lesions. 1998. *Clin. Infect. Dis.* 27 : 636-638.
 88. **Kahl O., L. Gern, J.S. Gray, E.C. Guy, F. Jongejan, F. Kirstein, K. Kurtenbach, S.G. Rijpkema, and G. Stanek.** Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks: immunofluorescence assay versus polymerase chain reaction. 1998. *Zentralbl. Bakteriol.* 287 : 205-210.
 89. **Karlsson M., K. Hovind-hougen, B. Svenungsson, and G. Stierstedt.** Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. 1990. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 473-479.
 90. **Kawabata, H., T. Masuzawa, and Y. Yanagihara.** Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. 1993. *Microbiol. Immunol.* 37: 843-848.

91. Keller T.L., J.J. Halperin, and M. Whitman. PCR detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in cerebrospinal fluid of Lyme neuroborreliosis patients. 1992. *Neurology*. 42 : 32-42.
92. Kelly R. Cultivation of *Borrelia hermsii*. 1971. *Science*. 173 : 443-444.
93. Kirstein F., S. Rijpkema, M. Molkenboer, and J.S Gray. The distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. 1997. *Eur. J. Epidemiol.* 13 : 67-72.
94. Kumar, S., K. Tamura and N. Masatoshi. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
95. Kurtenbach^a K., M. Peacey, S.G. Rijpkema, A.N. Hoodles, P.A Nuttall, and S.E. Randolph. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 1169-1174.
96. Kurtenbach^b K., H.S. Sewell, N.H. Ogden, S.E. Randolph, and P.A. Nuttall. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. 1998. *Infect. Immun.* 66: 1248-1251.
97. Lam T.T., T.P. Nguyen, R.R. Montgomery, F.S. Kantor, E. Fikrig, and R.A. Flavell. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. 1994. *Infect. Immun.* 62: 290-298.
98. Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Péter, and G. Baranton. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA. 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 921-925.
99. Leong J.M., P.E. Morrissey, E. Ortega-Barria, M.E. Pereira, and J. Coburn. Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. 1995. *Infect. Immun.* 63 : 874-883.
100. Leong J.M., H. Wang, L. Magoun, J.A. Field, P.E. Morrissey, D. Robbins, J.B. Tatro, J. Coburn, and N. Parveen. Different classes of proteoglycans contribute to the attachment of *Borrelia burgdorferi* to cultured endothelial and brain cells. 1998. *Infect. Immun.* 66 : 994-999.
101. Lipschütz B.. Über eine seltene Erythemform (erythema chronicum migrans). 1913. *Arch. Dermat. U. Syph.* 118 : 349-356.
102. Liveris D., G.P. Wormser, J. Nowakowski, R. Nadelman, S. Bittker, D. Cooper, S. Varde, F.H. Moy, G. Forseter, C.S. Pavia, and I. Schwartz.. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. 1996. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 1306-1309.
103. Luft, B.J., P.D. Gorevic, W. Jiang, P. Munoz, and R.J. Dattwyler. Immunologic and structural characterization of the dominant 66- to 73- kDa antigens of *Borrelia burgdorferi*. 1991. *J. Immunol.* 146: p. 2776-2782.
104. Luft B.J., S. Mudri, W. Jiang, R.J. Dattwyler, P.D. Gorevic, T. Fischer, P. Munoz, J.J. Dunn, and W.H. Schubach. The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. 1992. *Infect. Immun.* 60 : 4309-4321.
105. Ma, B., B. Christen, D. Leung, and C. Vigo-Pelfrey. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. 1992. *J. Clin. Microbiol.* 30: 370-376.
106. Magnarelli L.A., and J.F. Anderson. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. 1988. *Am. J. Epidemiol.* 127 : 818-825.
107. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson, R.C. Johnson, R.B. Nadelman, and G.P. Wormser. Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. 1994. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1154-1158.
108. Malane M.S., J.M. Grant-Kels, H.M. Feder, and S.W. Luger. Diagnosis of Lyme disease based on dermatologic manifestations. 1991. *Ann. Inter. Med.* 114 : 490-498.

109. Mansy F., B. Hoyois, M.J. de Vos, A. van Elsen A. Bollen, and E. Godfroid. Colorimetric solid-phase capture hybridization assay for detection of amplified *Borrelia burgdorferi* DNA. 1996. Biotechniques 21: 122-125.
110. Marconi^a R.T., and C.F. Garon. Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. 1992. J. Clin. Microbiol. 30 : 2830-2834.
111. Marconi^b R.T., and C.F. Garon. Identification of a third genomic group of *Borrelia burgdorferi* through signature nucleotide analysis and 16S rRNA sequence determination. 1992. J. Gen. Microbiol. 138 : 533-536.
112. Marconi R.T., D.S. Samuels, and C.F. Garon. Transcriptional analyses and mapping of the *ospC* gene in Lyme disease spirochetes. 1993. J. Bacteriol. 175 : 926-932.
113. Marconi R.T., D. Liversi, and I. Schwartz. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes : phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. 1995. J. Clin. Microbiol. 33 : 2427-2434.
114. Marti Ras N., B. Lascola, D. Postic, S.J. Cutter, F. Rodhain, G. Baranton, and D. Raoult. Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp. 1996. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 : 859-865.
115. Masuzawa T., N. Takada, Y. Imai, and Y. Yanagihara. Molecular epidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the East Asia. 1999. VIII ICLB, Munich, Germany, Oral presentation O5.
116. Mather T.N., M.L. Wilson, S.I. Moore, J.M.C. Ribeiro, and A. Spielman. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). 1989. Am. J. Epidemiol. 130 : 143-150.
117. Matile H. Etudes virologiques et épidémiologiques sur l'encéphalite à tiques en Suisse. 1982. PhD Thesis University of Neuchâtel, Switzerland, p.98
118. Matuschka F.R., P. Fischer, M. Heiler, D. Richter, and A. Spielman. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. 1992. J. Infect. Dis. 165 : 479-483.
119. Matuschka F.R., H. Eiffert, A. Ohlenbusch, and A. Spielman. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in Central Europe. 1994. J. Infect. Dis. 170 : 122-127.
120. Matuschka F.R., S. Endepols, D. Richter, and A. Spielman. Competence of urban rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. 1997. J. Med. Entomol. 34 : 489-493.
121. Mayo D.R., and D.W. Vance. Parvovirus B19 as the cause of a syndrome resembling Lyme arthritis in adults. 1991. N. Engl. J. Med. 324 : 419-420.
122. Melchers W.J.G., J.F. Meis, P.A. Rosa, E.C.J. Claas, L. Nohlmans, R. Koopman, A. Horrevorts, and J. Galama. Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease. 1991. J. Clin. Microbiol. 29 : 2401-2406.
123. Monin R., L. Gern, and A. Aeschlimann. A study of the different modes of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*. 1989. In Lyme borreliosis II. Zbl. Bakt. Suppl. 18 : 14-20.
124. Montgomery R.R., S.E. Malawista, K.J. Feen, and L. Bockenstedt. Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. 1996. J. Exp. Med. 183: 261-269.
125. Moter S.E., H. Hofman, R. Wallich, M.M. Simon, and M.D. Kramer. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by *ospA*-specific PCR. 1994. J. Clin. Microbiol. 32 : 2980-2988.

126. Mourtisen C.L., C.T. Wittwer, C.M. Litwin, L.M. Yang, J.J. Weis, T.B. Martins, T.D. Jaskowski, and H.R. Hill. Polymerase chain reaction detection of Lyme disease-correlation with clinical manifestations and serologic responses. 1996. *A. J. Clin. Pathol.* 105 : 647-654.
127. Nadelman R.B., and G.P. Wormser. Erythema migrans and early Lyme disease. 1995. *Am. J. Med.* 98:15-23; discussion 23-24.
128. Nakao M., K. Miyamoto, and M. Fukunaga. Lyme disease spirochetes in Japan : enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. 1994. *J. Infect. Dis.* 170 : 878-882.
129. Nielsen S.L., K.J. Younk, and A.G. Barbour. Detection of *Borrelia burgdorferi* by the polymerase chain reaction. 1990. *Mol. Cell. Probes.* 4 : 73-79.
130. Nocton J.J., F. Dressler, B.J. Rutledge, P.N. Rys, D.H. Persing, and A.C. Steere. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. 1994. *N. Engl. J. Med.* 330 : 229-234.
131. Nohlmans L.M.K.E., R. de Boer, A.E.J.M. van der Bogaard, and C.P.A van Boven. Genotypic and phenotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from the Netherlands. 1995. *J. Clin. Microbiol.* 33 : 119-125.
132. Norris S.J., C.J. Carter, J.K. Howell, and A.G. Barbour. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. 1992. *Infect. Immun.* 60: 4662-4672.
133. Olsen B., T.G.T. Jaenson, L. Noppa, J. Bunikis, and S. Bergström. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. 1993. *Nature.* 362 : 340-342.
134. Pachner A.R.. Neurologic manifestations of Lyme disease, the new « great imitator ». 1989. *Rev. Infect. Dis.* 11 : 1482-1486.
135. Pachner A.R., and E. Delaney. The polymerase chain reaction in the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. 1993. *Ann. Neurol.* 34 : 544-550.
136. Parveen N., D. Robbins, and J.M. Leong. Strain variation in glycosaminoglycan recognition influences cell-type-specific binding by lyme disease spirochetes. 1999. *Infect. Immun.* 67 : 1743-1749.
137. Persing D.H., S.R. Telford, A. Spielman, and S.W. Barthold. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. 1990. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 566-572.
138. Persing D.H., B.J. Rutledge, P.N. Rys, D.S. Podzorski, P.D. Mitchell, K.D. Reed, B. Liu, E. Fikrig, and S.E. Malawista. Target imbalance : disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. 1994. *J. Infect. Dis.* 169 : 668-672.
139. Péter O. Contribution à la connaissance de l'écologie de la « rickettsie suisse » transmise par la tique *Ixodes ricinus*. 1981. PhD Thesis, University of Neuchâtel, Switzerland. p.94.
140. Péter O. Lyme borreliosis in the State of Valais, Switzerland. 1990. *J. Int.Fed. Clin. Chem.* 2 : 121-124.
141. Péter O. and A.G. Bretz. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. 1992. *Zentralbl. Bakteri.* 277: 28-33.
142. Péter O., A.G. Bretz, R. Zenhäusern, H. Roten, and E. Roulet. Isolement de *Borrelia burgdorferi* du liquide céphalorachidien de trois enfants avec une atteinte neurologique. 1993. *Schweitz. Med. Wschr.* 123 : 14-19.
143. Péter, O., A.G. Bretz, and D. Bee. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. 1995. *Eur. J. Epidemiol.* 11: 463-7.
144. Péter O., A.-G. Bretz, D. Postic, and E. Dayer. Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. 1997. *Clin. Microbiol. and Infect.* 3 : 423-431.

145. Pfister K., A. Roesti, P.H. Boss, and B. Balsiger. *Ehrlichia phagocytophila* als Erreger des « Weidefiebers » in Berner Oberland. 1987. Schweiz. Arch. Tierheilk. 129 : 343-347.
146. Picken R.N.. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. 1992. J. Clin. Microbiol. 30 : 99-114.
147. Picken M.M., R.N. Picken, D. Han, Y. Cheng, and F. Strle. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on Flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 1996. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15: 489-98.
148. Picken R.N.. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. 1998. J. Invest. Dermatol. 110 : 211-214.
149. Piesman J., M.C Dolan, C.M. Happ, B.J. Luft, S.E. Rooney, T.N Mather, and W.T. Golde. Duration of immunity to reinfection with tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* in naturally infected mice. 1997. Infect. Immun. 65 : 4043-4047.
150. Postic D., C. Edlinger, C. Richaud, F. Grimont, Y. Dufresne, P. Perolat, G. Baranton, and P.A. Grimont. Two genomic species in *Borrelia burgdorferi* . 1990. Res. Microbiol. 141: 465-475.
151. Postic^a D., M.V. Assous, P.A. Grimont, and G. Baranton. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. 1994. Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 743-752.
152. Postic^b D., and G. Baranton. Molecular fingerprinting and phylogeny of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 1994. In Yanagihara Y. and Masuzawa T. (ed), Proceeding of the international symposium on Lyme disease in Japan, Shizuoka, Japan. p. 133-147.
153. Postic D., E. Korenberg, N. Gorelova, Y.V. Kovalevski, E Belleger, and G. Baranton. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries : high incidence of mixed isolates. 1997. Res. Microbiol. 148 : 691-702.
154. Postic D., N. Marti Ras, R.S. Lane, M. Hendson, and G. Baranton. Expanded diversity among Californian *borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). 1998. J. Clin. Microbiol. 36 : 3497-3504.
155. Preac-Mursic V., B. Wilske, and G. Schierz. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. 1986. Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A]. 263 : 112-118.
156. Preac-Mursic V., and B. Wilske. Biology of *B. burgdorferi*. 1992. In: Aspects of Lyme borreliosis. Weber K. and Burgdorfer W. (Eds.) 44-58.
157. Probert W.S. K.M. Allsup, and R.B. Lefebvre. Identification and characterization of a surface-exposed 66-kilodalton protein from *Borrelia burgdorferi*. 1995. Infect. Immun. 63 : 1933-1939.
158. Ribeiro J.M.C., T.N. Mather, J. Piesman, and A. Spielman. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari : Ixodidae). 1987. J. Medical. Entomol. 24 : 201-205.
159. Rijpkema S.G., M. Molkenboer, L.M. Schouls, F. Jongejan, J.F.P. Schellekens. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. 1995. J. Clin. Microbiol. 33: 3091-3095.
160. Rijpkema S.G., R.G. Herbes, N. Verbeek-De Kruif, and J.F. Schellekens. Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. 1996. Epidemiol. Infect. 117 : 563-566.
161. Roessler D., U. Hauser, and B. Wilske. Heterogeneity of BmpA (p39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. 1997. J. Clin. Microbiol. 35 : 2752-2758.

162. Rosa P.A., and T.G. Schwan. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. 1989. J. Infect. Dis. 160 : 1018-1029.
163. Rosa P.A., and T.G. Schwan. Molecular biology of *Borrelia burgdorferi*. 1993. In Lyme disease, Coyle P.K. (ed.). Mosby Year Book, St. Louis, USA, p.8-17.
164. Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier and R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 416-426.
165. Ryffel, K., O. Péter, L. Binet, and E. Dayer. Interpretation of immunoblots for Lyme borreliosis using a semiquantitative approach. 1998. Clin. Microbiol. and Infect. 4 : 205-212.
166. Sadziene A., P.A Rosa, P.A. Thompson, D.M. Hogan, and A.G. Barbour. Antibody-resistant mutants of *Borrelia burgdorferi*: in vitro selection and characterization. 1992. J. Exp. Med. 176 : 799-809.
167. Sadziene A., B. Wilske, M.S. Ferdows, and A.G. Barbour. The cryptic *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. 1993. Infect. Immun. 61 : 2191-2195.
168. Saint Girons, I., L. Gern, J.S. Gray, E.C. Guy, E. Korenberg, P.A. Nuttall, S.G.T. Rijpkema, A. Schönberg, G. Stanek, and D. Postic. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. 1998. Zentralbl. Bakteriologie. 287: p. 190-195.
169. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
170. Schmidt B.L., E. Aberer, C. Stockenhuber, H. Klade, F. Breier, and A. Luger. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in the urine and breast milk of patients with Lyme borreliosis. 1995. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 21 : 121-128.
171. Schutzer S.E., P.K. Coyle, J.J. Dunn, B.J. Luft, and M. Brunner. Early and specific antibody response to OspA in Lyme Disease. 1994. J. Clin. Invest. 94: 454-457.
172. Schwan T.G., W. Burgdorfer, and G.C. Garon. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. 1988. Infect. Immun. 56 : 1831-1836.
173. Schwan T.G., and J. Piesman. 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. 2000. J. Clin. Microbiol. 38: 382-388.
174. Schwartz I., G.P. Wormser, J.J. Schwartz, D.A. Cooper, P. Weissensee, A. Gazumyan, E. Zimmermann, N.S. Goldberg, S. Bitter, G.L. Campbell, and C.S. Pavia. Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions. 1992. J. Clin. Microbiol. 30 : 3082-3088.
175. Seinost G., D.E. Dykhuizen, R.J. Dattwyler, W.T. Golde, J.J. Dunn, I.N. Wang, G.P. Wormser, M.E. Schriefer, and B.J. Luft. Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. 1999. Infect. Immun. 67: 3518-3524.
176. Sewell H.S., S. De Michelis, P.A. Nuttall, D. Strange, S.E. Randolph, and K. Kurtenbach. Resistance to complement: A key factor in the global ecology of Lyme borreliosis. 1999. VIII ICLB. Munich, Germany. Oral presentation O22.
177. Sherwood C., W.M. Huang, M. Robertson, N. Palmer, R. van Vugt, J. Peterson, D. Haft, G. Sutton, and C. Fraser. Rampant rearrangements among *Borrelia* linear plasmids ? 1999. VIII ICLB, Munich, Germany, Plenary session. S36.
178. Simon M.M., U.E. Schaible, R. Wallich, and M.D. Kramer. A mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection: approach to a vaccine against Lyme disease. 1991. Immunology Today. 12: 11-16.

179. **Simpson W. J., M. E. Schrumpf, and T. G. Schwan.** Reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. 1990. J. Clin. Microbiol. 28 : 1329-37.
180. **Stanek G., B. Jurkowitsch, C. Köchl, I. Burger and G. Khanakha.** Reactivity of European and American isolates of *Borrelia burgdorferi* with different monoclonal antibodies by means of a microimmunoblot technique. 1990. Zentralbl. Bakteriologie. 272 : 426-436
181. **Steere A.C., T.F. Broderick, and S.E. Malawista.** Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis : epidemiologic evidence for a tick vector. 1978. Am. J. Epidemiol. 108 : 312-321.
182. **Steere A.C.** . 1989. Lyme disease. N. Engl. J. Med. 321: 586-596.
183. **Steere A.C.** Treatment of chronic Lyme disease. 1996. Science. 271 : 1216-1218.
184. **Steere A.C.** Diagnosis and treatment of Lyme arthritis. 1997. Med. Clin. North. Am. 81 : 179-194.
185. **Stobierski M.G., W.N. Hall, B. Robinson-Dunn, H. Stiefel, S. Shiflett, and V. Carlson.** Isolation of *Borrelia burgdorferi* from two patients in Michigan. 1994. Clin. Infect. Dis. 19 : 944-946.
186. **Stoenner H.G., T. Dodd, and C. Larsen.** Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. 1982. J. Exp. Med. 156 : 1297-1311.
187. **Sweeney C.J., M. Ghassemi, W.A. Agger, and D.H. Persing.** Coinfection with *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in a western Wisconsin resident. 1998. Mayo. Clin. Proc. 73 : 338-341.
188. **Swofford, D. L.** 1992. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0. Illinois Natural History Survey, Champaign.
189. **van Dam A.P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widdjojokusumo, B. M. de Jongh, S. Spanjaard, A. C.T. Ramselaar, M.D. Kramer, and J. Dankert.** Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. 1993. Clin. Infect. Dis. 17 : 708-717.
190. **Vasiliu V., P. Herzer, D. Rossler, G. Lehnert, and B. Wilske.** Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. 1998. Med. Microbiol. Immunol. (Berl). 187 : 97-102.
191. **Von Stedingk L.V., I. Olsson, H.S. Hanson, E. Sbrink, and A. Hovmark.** Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. 1995. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14 : 1-5.
192. **Wadstom T., and A. Ljungh.** Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. 1999. J. Med. Microbiol. 48 : 223-233.
193. **Wallich R., S.E. Moter, M.M. Simon, K. Ebnet, A. Heiberger, and M.D. Kramer.** The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin) : molecular cloning, expression, and amplification of the gene. 1990. Infect. Immun. 58 : 1711-1719.
194. **Wallich R., C. Helmes, U.E. Schaible, Y. Lobet, S.E. Moter, M.D. Kramer, M. Simon.** Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of OspA, fla, HSP60, and HSP70 gene probes. 1992. Infect. Immun. 60 : 4856-4866.
195. **Wang, G., A.P. van Dam, A. Le Flèche, D. Postic, O. Péter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert.** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (Borrelia genomic groups VS116 and M19. 1997. Int. J. Syst. Bacteriol. 47 : 926-932.
196. **Weber G., and G. Walter.** *Babesia microti* (apicomplexa: piroplasmida): electron microscope detection in salivary glands of the tick vector *Ixodes ricinus* (Ixodoidea: Ixodidae). 1980. Z. Parasitenkd. 64 : 113-5
197. **Weber K., and H.W. Pfister.** Clinical management of Lyme Borreliosis. 1994. Lancet. 343 : 1017-1020.

198. Wienecke R., N. Zöchling, U. Neubert, E.M. Schlüpen, M. Meurer, and M. Volkenandt. Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. 1994. J. Invest. Dermatol. 103 : 19-22.
199. Wilske B., V. Preac-Mursic and G. Schierz. Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolate from patients and ticks. 1985. Lancet i : 1099 (Letter)
200. Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, and K.V. Busch. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. 1986. Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A]. 263: 92-102.
201. Wilske B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, R. Kühlbeck, A.G. Barbour, and M. Kramer. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. 1988. Ann. NY. Acad. Sci. 539 : 126-143.
202. Wilske B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, R. Kühlbeck, A.G. Barbour, and M. Kramer. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* sp. 1992. Res. Microbiol. 143 : 583-596.
203. Wilske^a B., V. Preac-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner. Immunological and molecular polymorphism of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. 1993. Infect. Immun. 61 : 2182-2191.
204. Wilske^b B., V. Fingerle, P. Herzer, A. Hofman, G. Lehnert, H. Peters, H.W. Pfister, V. Preac-Mursic, E. Soutschek, and K. Weber. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. 1993. Med. Microbiol. Immunol. (Berl) 182 : 255-70.
205. Wilske B., U. Busch, H. Eiffert, V. Fingerle, H.W. Pfister, D. Rössler, and V. Preac-Mursic. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. 1996. Med. Microbiol. Immunol. 184 : 195-201.
206. Wormser G.P., D. Liveris, J. Nowakowski, R.B. Nadelman, L.F. Cavaliere, D. McKenna, D. Holmgren, and I. Schwartz. Association of specific subtypes of *Borrelia burgdorferi* with hematogenous dissemination in early Lyme disease. 1999. J. Infect. Dis. 180: 720-725.
207. Zeman P. *Borrelia*-infection rates in tick and insect vectors accompanying human risk of acquiring Lyme borreliosis in a highly endemic region in Central Europe. 1998. Folia. Parasitol. 45 : 319-325.
208. Zhioua, E., A. Aeschlimann, and L. Gern. Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari. Ixodidae) larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. 1994. J. Medical. Entomol. 31 : 763-766
209. Zoller, L., S. Burkard, and H. Schafer. Validity of western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. 1991. J. Clin. Microbiol. 29: 174-82.
210. Zung J.L., S. Lewengrub, M.A. Rudzinska, A. Spielman, S.R. Telford, and J. Piesman. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. 1989. Can. J. Zool. 67 : 1737-1748.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes, collègues, amis et famille qui m'ont soutenues dans la réalisation de cette thèse.

Je remercie le Prof. Bruno Betschart, qui a accepté de devenir mon Directeur de thèse et qui a ainsi permis la réalisation de ce projet.

J'adresse, en outre, des remerciements particuliers au Dr. Olivier Péter, co-directeur de thèse, qui m'a conseillée et guidée tout au long de ce travail ainsi qu'au Dr. Eric Dayer pour ces judicieux conseils et son expérience lors la production de l'anticorps monoclonal.

J'exprime aussi une profonde reconnaissance

A Lise Gern, pour sa gentillesse et son appui qui m'ont permis de faire le lien entre Neuchâtel et le Valais.

A Anne-Gabrielle Bretz, qui m'a apporté, en plus de judicieux conseils techniques, son soutien et ses encouragements tout au long de ce travail.

A Edmond Godfroid, pour les amorces et les séquences des souches *B. valaisiana* qu'il a réalisées dans son laboratoire, ainsi que pour m'avoir sympathiquement fait partager son expérience dans le domaine de la génétique de *Borrelia*.

A Bernard Rutti, qui a contribué à effectuer la typisation génétique des spirochètes présents dans les échantillons cliniques et qui m'a donné des conseils relatifs à la PCR.

A Raquel Martinez, pour les informations techniques sur la PCR.

Au Dr. A. Suard, Monthey, pour les nombreux cas de patients présentant une borréliose de Lyme.

A L. Nohlmans, Université de Limburg, Pays-Bas ; M. Wittenbrink, Université de Zürich ; J. Gray, University College Dublin, Irlande ; S. Cutler, Imperial College School of Medicine, Londres, Grande-Bretagne ; D. Postic, Institut Pasteur, Paris, France, L. Gern et P.F. Humair, Université de Neuchâtel ; pour les souches *B. valaisiana*.

A A. Barbour, University of California, Irvine, CA, USA ; R. Wallich, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Deutschland ; B. Wilske, May von Pettenkofer Institut, München, Deutschland, qui nous ont aimablement fourni les anticorps monoclonaux nécessaires à la caractérisation de nos souches.

A mon mari, pour son soutien et ses encouragements dans les moments difficiles.

Et surtout,

A mon fils et aux deux grands-mamans qui m'ont accordé le temps nécessaire à la réalisation de ce projet.

Cette thèse a été réalisée avec l'aide de l'ICHV et du Fonds National Suisse de Recherche Scientifique n° 32.52739.97.