THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Écologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Chimie, Écologie, Géosciences et AgroSciences Théodore Monod (Poitiers)
Secteur de recherche : Biochimie, biologie moléculaire

Présentée par :
Aurélien Alafaci

Implication des interactions Quorum Sensing dépendantes dans la mise en place et la prévalence des co-infections et la virulence de B. afzelii et B. garinii, agents responsables de la Borréliose de Lyme en Europe

Directeur(s) de Thèse :
Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon, Vincent Delafont

Soutenue le 16 décembre 2021 devant le jury

Jury :

Président	**Christine Braquart-Varnier**	Professeur, EBI, Université de Poitiers
Rapporteur	**Olivier Duron**	Directeur de recherche CNRS, MIVEGEC, Montpellier
Rapporteur	**M-Thérèse Giudici-Orticoni**	Directeur de recherche CNRS, BIP, Université d'Aix-Marseille
Membre	**Jean-Marc Berjeaud**	Professeur, EBI, Université de Poitiers
Membre	**Julien Verdon**	Maître de conférences, EBI, Université de Poitiers
Membre	**Vincent Delafont**	Maître de conférences, EBI, Université de Poitiers
Membre	**Géraldine Dubreuil**	Maître de conférences, IRBI, Université de Tours
Membre	**Sarah Bonnet**	Directeur de recherche INRAE, Maisons-Alfort

Pour citer cette thèse :
Aurélien Alafaci. *Implication des interactions Quorum Sensing dépendantes dans la mise en place et la prévalence des co-infections et la virulence de B. afzelii et B. garinii, agents responsables de la Borréliose de Lyme en Europe* [En ligne]. Thèse Biochimie, biologie moléculaire. Poitiers : Université de Poitiers, 2021. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : Chimie Ecologie Géosciences Agrosciences « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biochimie, Biologie moléculaire

Présentée par :

Aurélien ALAFACI

****

Implication des interactions Quorum Sensing dépendantes dans la mise en place et la prévalence des co-infections et la virulence de *B. afzelii* et *B. garinii*, agents responsables de la Borréliose de Lyme en Europe

****

Directeurs de Thèse : **Jean-Marc BERJEAUD**, Professeur, Université de Poitiers
Julien VERDON, Maître de Conférences, Université de Poitiers
Vincent DELAFONT, Maître de Conférences, Université de Poitiers

****

Soutenue le 16 décembre 2021, devant la Commission d'Examen

****

JURY

Rapporteurs :

Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI	Directrice de Recherche, CNRS, Université d'Aix-Marseille
Olivier DURON	Directeur de Recherche, CNRS, Université de Montpellier

Examinateurs :

Sarah BONNET	Directrice de Recherche, INRAE, Maisons-Alfort
Géraldine DUBREUIL	Maître de Conférences, Université de Tours
Christine BRAQUART-VARNIER	Professeur, Université de Poitiers
Jean-Marc BERJEAUD	Professeur, Université de Poitiers
Julien VERDON	Maître de Conférences, Université de Poitiers
Vincent DELAFONT	Maître de Conférences, Université de Poitiers

Remerciements

Je voudrais commencer cette partie en remerciant les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces travaux : **Marie-Thérèse Giudici-Orticoni** et **Olivier Duron**, qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, **Sarah Bonnet**, **Géraldine Dubreuil** et **Christine Braquart-Varnier** en qualité d'examinatrices. Merci à chacun et chacune d'entre vous.

Je voudrais ensuite remercier **Jean-Marc Berjeaud**, tout d'abord pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire EBI, mais aussi et surtout d'avoir accepté d'encadrer ces travaux de thèse. Merci d'avoir su vous rendre disponible malgré votre emploi du temps chargé. Merci pour vos conseils scientifiques avisés votre bonne humeur quotidienne. Merci également pour les rires qu'on a pu partager, il y en a eu beaucoup entre les références de Kaamelott, les différents surnoms et les forficules. Bon courage pour les 100 articles avant la retraite et vive le ftade Touloufain !

Je souhaiterais également remercier **Julien Verdon**, pour m'avoir fait confiance avec ce stage de M2 et ce projet de thèse. Merci pour ta disponibilité malgré tes responsabilités en enseignements. Merci pour le soutien moral tout au long de ces trois ans, il y a eu des hauts et des bas mais j'ai toujours trouvé une porte ouverte quand j'en avais besoin. Merci également pour les bons moments qu'on a passé ensemble pendant cette période avec une pensée particulière pour cette soirée de 2019 à Montpellier (tu sauras de laquelle je parle).

Je tiens aussi à remercier **Vincent Delafont** d'avoir accepté d'encadrer ces travaux de thèse. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur à toute épreuve. Merci de m'avoir enseigné avec ta pertinence scientifique les arcanes des études bioinformatiques et des études de diversité (je resterai toujours impressionné par le nombre d'outils/applis/logiciels que tu connais pour tout et n'importe quoi). Merci également pour tous les bons moments que l'on a pu partager au cours des trois dernières années, autour d'un café, d'un verre, d'un repas et j'en passe.

Enfin, bien qu'il ne soit pas administrativement impliqué dans la direction de cette thèse, je remercie **Alexandre Crépin** qui a participé l'encadrement au même titre que Jean-Marc, Julien et Vincent. Merci pour tous les conseils scientifiques et ton aide, notamment en ce qui concerne la partie sur le Quorum Sensing. Là aussi, merci pour tous les bons moments que l'on a passé ensemble durant cette thèse, à discuter sport et PB86, citer les références de Kaamelott, parler Craft Beer, etc.

Merci à mes quatre encadrants de m'avoir accompagné aussi bien scientifiquement qu'humainement pendant les trois dernières années. Merci pour ces réunions de thèse qui se sont toujours déroulées dans la bonne humeur et où science et rires étaient toujours mélangés. Enfin, je vous remercie pour le temps que vous avez tous consacré à la correction de ce manuscrit de thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe MDE. Pour leur accueil et leur joie de vivre. Merci à **Marie-Hélène** et **Christine**, successivement responsables de l'équipe, de m'avoir accueilli au sein de cette équipe de recherche. Je voudrais adresser mes remerciements à **Yann** d'avoir accepté de m'encadrer lors de mon stage de Master 1 qui m'a permis d'avoir pour la première fois mon nom en tant qu'auteur d'un article scientifique, j'en suis vraiment très reconnaissant. Je remercie **Willy** pour tous

les conseils scientifiques que tu m'as donné, notamment en ce qui concerne les clonages et la production de protéines hétérologues. Promis on va essayer de faire un suivi correct de la croissance des bactéries par cytométrie. Merci à **Ascel** pour l'humanité et la gentillesse dont tu as fait preuve depuis que je te connais. Merci également d'avoir ramené (même indirectement) un peu d'Alsace à Poitiers. J'espère que tu auras un jour l'opportunité d'élever des chèvres dans le Larzac. Je voudrais remercier **Romain**, le « petit nouveau » chez les maîtres de conférences, pour ta bonne humeur indéfectible et l'empathie dont tu as toujours fait preuve. Merci à **Daniel**, alias Dada, pour ses entrées fracassantes dans le bureau toujours pleines de bonne humeur et son rire si particulier et si communicatif qui ramènent beaucoup de joie dans le laboratoire. Merci à **Stéphanie** pour ta gentillesse et les attentions que tu as toujours eu pour les thésards et thésardes (le porte-crayons chaton est toujours sur mon bureau et il me suivra longtemps). Je voudrais adresser mes remerciements à **Anne**, pour ta gentillesse et l'intérêt que tu as porté à mon projet de thèse, mais aussi pour toutes les douceurs que tu as apporté au fil des mois pour les pauses café. C'était toujours un plaisir de rentrer dans cette salle et de découvrir ce qui se cachait sous tes fameux torchons. Je tiens également à remercier **Christine** et **Marion** pour nos (trop rares à mon goût) conversations au moment des repas du midi ou des pauses café et pour leur gentillesse. Merci à **Laurence** et **Sylvie** pour tout le travail administratif fourni, que ce soit pour les commandes, les ordres de mission, l'organisation des divers repas et sorties, etc. Le labo ne tournerait pas aussi bien sans vous. Enfin, merci à **Christophe** pour ton aide technique au laboratoire.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude envers les thésards et thésardes que j'ai pu côtoyer, que ce soit lors de mes stages ou en thèse. Je tiens à exprimer une pensée toute particulière et toute ma gratitude pour **Marie-Hélène**, pour tous les moments que l'on a partagé aussi bien au laboratoire qu'en dehors, pour tout le soutien que tu m'as apporté dans les moments difficiles de la thèse. Merci. Je remercie également **Clément**, qui a été présent au laboratoire du début de mon stage de Master 1 jusqu'à la fin de cette thèse et qui sera sûrement encore présent après mon départ (si si). Merci pour tous les bons moments partagés, toutes les conversations, toutes les virées au carrefour et la boulangerie les midis, toutes les soirées jeux et raclette. Merci également pour tes tutos de mise en page de ce manuscrit, bien qu'ils soient arrivés un tout petit peu trop tard ! En revanche je ne te remercie pas vraiment d'avoir transmis mon surnom… Un grand merci également à **Florine** pour ta gentillesse, nos conversations au détour d'une pause café ou d'une cigarette, toutes les soirées etc. Un grand merci également pour avoir relu une partie de ce manuscrit. Merci à **Yoann** pour tous les repas et soirées que l'on a partagés. Merci également d'avoir ramené un peu de Grand-Est à Poitiers, même si tu es né du mauvais côté des Vosges. Je remercie également **Steven** pour sa bonne humeur et ses blagues (nulles) et d'avoir embaumé la salle de pause avec tes crevettes à l'ail, **Meg** pour toutes ces soirées au PLB, ta bonne humeur quotidienne et tes danses et chants, **Antoine** pour nos sorties paddle et l'organisation des excursions pendant les week-end (on se souviendra de ce week-end au Mont-Dore). Je remercie également **Vincent R.** pour les discussions que l'on a eu pendant ton passage au laboratoire et tes chansons (insupportables) qui restent dans la tête. Je souhaite également bon courage aux thésards et thésardes nouvellement arrivés, **Audrey**, **Guillaume**, **Amélie** et **Alban**. Merci à vous pour les petits apéros pré couvre-feu, pour les discussions dans le bureau qui ont parfois duré bien trop longtemps, pour votre soutien pendant cette période difficile qu'est la rédaction de thèse.

J’espère que l’on pourra partager encore beaucoup de moments comme ça et que vous pourrez vous épanouir autant dans la thèse que j’ai pu le faire, malgré les moments de doutes et de déprime.

Je tiens à exprimer ma gratitude pour les stagiaires que j’ai pu encadrer et/ou qui ont participé, de près ou de loin, à ce projet. Merci à **Raphaël**, à **Alban**, à **Sabine** (qui a passé de nombreuses heures à nettoyer, broyer, extraire de l’ADN des tiques pour l’analyse de diversité), à **Patrick**, à **Valentin** et à **Maria**.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont pris de leur temps pour aider à la réalisation de ce projet de thèse, notamment **Joanne**. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ta patience et tes conseils scientifiques pour l’utilisation de l’apotome. J’aurais aimé pouvoir continuer plus longtemps sur cette partie et j’espère qu’on aura l’occasion de collaborer à nouveau dans le futur.

Je remercie également toutes les personnes extérieures au monde scientifique qui m’ont écouté, épaulé, soutenu, conseillé ces trois dernières années. Je remercie ainsi tous mes **amis** pour les moments de détente, que ce soit en Alsace, à Paris, à Montpellier, à Bordeaux ou à Poitiers qui m’ont permis de relâcher la pression. Bien que je n’aie pas été très disponible les derniers temps, on rattrapera le temps perdu, c’est promis. Merci à tous les membres de ma **famille** pour le soutien que vous m’avez apporté et ceux, malgré le fait que vous n’ayez pas toujours compris les tenants et les aboutissants de cette thèse (non JC, l’objectif n’a jamais été de trouver un vaccin à la maladie de Lyme). Je voudrais également remercier Maëva pour ces moments qui m’ont permis de m’aérer l’esprit et de changer d’air tout au long de la période de rédaction. J’espère que l’on aura l’occasion de tous se retrouver au moment de la soutenance de thèse pour que je puisse partager ce moment et le fruit de mon travail avec chacun d’entre vous.

J’ai sans doute oublié des remercier des personnes dans cette partie et je m’en excuse. Mais les gens qui sont dans le monde scientifique savent probablement l’état dans lequel on se trouve au moment de la rédaction de cette partie et me pardonneront probablement. Sachez cependant que j’éprouve énormément de gratitude envers toutes les personnes que j’ai pu rencontrer, avec qui j’ai pu discuter et qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd’hui.

INTRODUCTION 1

I. Généralités sur les tiques 2
I.1 Biologie des tiques 2
I.1.1 Les différentes familles de tiques et leurs spécificités 2
I.1.2 Le cycle de vie des Ixodidae 5
I.1.3 Les stratégies de recherche et la spécificité d'hôtes 6
I.1.4 L'importance de la salive de tique dans le repas de sang 7
I.2 Diversité microbienne au sein des tiques 9
I.2.1 La diversité bactérienne au sein des tiques 9
I.2.2 Les bactéries mutualistes de tiques 11
I.2.3 Les tiques comme vecteurs de pathogènes 12
I.2.4 Les interactions microbiennes au sein des tiques 14

II. La Borréliose de Lyme 17
II.1 Historique 17
II.2 *Borrelia*, un genre qui divise 17
II.3 Symptômes et prévalence de la maladie de Lyme 21
II.3.1 Symptômes de la Borréliose de Lyme 21
II.3.2 Prévalence de la Borréliose de Lyme 22
II.4 Les espèces de *Borreliella* et leurs spécificités 24
II.5 Caractéristiques physiologiques et morphologiques des *Borreliella* 25

III. Comparaison entre *B. afzelii* et *B. garinii* 28
III.1 Caractéristiques génomiques 30
III.1.1 Caractéristiques chromosomiques 30
III.1.2 Caractéristiques plasmidiques 30
III.2 Caractéristiques physiologiques 31
III.3 Données épidémiologiques 33
III.4 Tropisme différentiel de *B. afzelii* et *B. garinii* chez l'Homme 37
III.5 Facteurs de virulence chez ces deux espèces 38

IV. Le Quorum Sensing 42
IV.1 Le QS chez les bactéries Gram négatives 43
IV.2 Le QS chez les bactéries Gram positives 45
IV.3 La communication AI-2 dépendante 48
IV.4 Le QS chez les *Borreliella* 52

V. Contexte de l'étude et objectifs 54

MATERIELS ET METHODES 56

I. Culture bactérienne et échantillonnage de tiques 57
I.1 Souches bactériennes 57
I.2 Milieux de cultures utilisés 58

I.2.1 Milieux de culture de *Borreliella* 58
I.2.2 Milieu de culture pour *V. harveyi* 59
I.2.3 Milieux de culture pour *E. coli* 59
I.3 Croissance d'*E. coli* 60
I.4 Croissance de *Borreliella* 60
I.4.1 Suivi de croissance de *Borreliella* en monoculture 61
I.4.2 Suivi de croissance de *Borreliella* en co-cultures 61
I.5 Préparation des bactéries *E. coli* compétentes et transformation....61
I.6 Préparation des *Borreliella* électro-compétentes et transformation....62
I.7 Transformation de *B. afzelii* et *B. garinii* pour l'expression de protéines fluorescentes 63
I.8 Echantillonnage et traitement des tiques....65

II. Biologie moléculaire 66
II.1 Extraction d'ADN génomique 66
II.2 Extraction d'ADN plasmidique 66
II.3 Extraction d'ARN et transcription inverse....67
II.4 Extraction d'ADN à partir d'individus d'*I. ricinus* 68
II.5 Extraction d'ARN pour l'étude du rôle de la température sur l'expression des gènes de *B. afzelii* et *B. garinii*....69
II.6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)....69
II.6.1 PCR réalisée avec la polymérase GoTaq G2....69
II.6.2 PCR réalisée par la polymérase Q5 70
II.7 Séparation des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose....71
II.8 Réaction de PCR quantitative (qPCR)....71
II.9 Amplification par PCR et séquençage haut-débit pour l'analyse de diversité bactérienne interne des nymphes d'*I. ricinus* 72
II.10 Expression des gènes de l'opéron *luxS* 72
II.11 Suivi de l'expression des gènes de l'opéron *luxS* 73
II.12 Suivi de croissance des *Borreliella* par qPCR 74
II.12.1 Analyse *in silico* pour la génération d'amorces discriminantes 74
II.12.2 Validation expérimentale des couples d'amorces 75
II.12.3 Vérification de l'efficacité des couples d'amorces 76
II.13 Mutants de délétion du gène *luxS* de *B. afzelii* et *B. garinii* 78
II.13.1 Amplification du gène *luxS* et clonage dans le plasmide pGEMT-Easy 78
II.13.2 Amplification du gène *km*^{r} et clonage dans le plasmide pTM61 79
II.13.3 Sous-clonage de la séquence du promoteur du gène *flaB+km*^{r} dans la séquence codante du gène *luxS* 80

III. Observation des bactéries en microscopie à illumination structurée 81

IV. Production et purification de LsrK....82
IV.1 Production de LsrK....82
IV.1.1 Vecteurs utilisés 82
IV.1.2 Transformation d'*E. coli* pour la production de LsrK 84
IV.1.3 Transformation d'*E. coli* par les plasmides pQE30+LsrK et pQE70+LsrK....85
IV.2 Expression de LsrK par le plasmide pET28b 86

IV.3 Séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes 88

V. Mesure de l'activité AI-2 par bioluminescence 89

VI. Analyses Bioinformatiques 89

VI.1 Analyse *in silico* du gène *luxS* et de son environnement chez les *Borrelia* et les *Borreliella* 89

VI.2 Traitement des données de séquençage des amplicons du gène codant l'ARNr 16S 90

VI.3 Analyse des ASVs assignés à *Borreliella* 91

VI.4 Analyse du rôle de la température sur l'expression des gènes de *B. afzelii* et *B. garinii* 91

RESULTATS 93

I. Etude de la diversité bactérienne interne d'*Ixodes ricinus* en Poitou-Charentes 94

I.1 Publication: Exploring the Individual Bacterial Microbiota of Questing *Ixodes ricinus* Nymphs 95

I.2 Données complémentaires 118

II. Etude *in vitro* de *B. afzelii* et *B. garinii* 121

II.1 Développement d'outils pour l'étude des interactions entre *B. afzelii* et *B. garinii* 121

II.1.1 Mise en place d'une méthode de qPCR pour la quantification spécifique de *B. afzelii* et *B. garinii* 121

II.1.2 Application de la méthode de qPCR pour la quantification de *B. afzelii* et *B. garinii* 124

II.1.2.1. Quantification de *B. afzelii* et *B. garinii* en monoculture 124

II.1.2.2. Quantification de *B. afzelii* et *B. garinii* en co-cultures 126

II.1.3 Etude des interactions physiques entre *B. afzelii* et *B. garinii* 128

II.1.3.1. Transformation de *B. afzelii* et *B. garinii* pour l'expression de protéines fluorescentes 128

II.1.3.2. Etude des biofilms formés par *B. afzelii*-mCherry et *B. garinii*-GFP 129

II.2 Le Quorum Sensing chez *B. afzelii* et *B. garinii* 133

II.2.1 Analyse *in sillico* de l'environnement génétique de *luxS* chez les *Borrelia* et les *Borreliella*. 133

II.2.2 Etude de la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à transcrire les gènes de l'opéron *luxS* 135

II.2.3 Expression des gènes de l'opéron *luxS* en fonction de la phase de croissance 138

II.2.4 Mise en évidence de la production d'AI-2 par *B. afzelii* et *B. garinii* 140

II.2.5 Procédures expérimentales pour bloquer la communication induite par AI-2 142

II.3 Analyse transcriptomique de la réponse de *B. afzelii* et *B. garinii* à un changement de température 149

II.3.1 Données de séquençage 149

II.3.2 Analyse des gènes différentiellement exprimés 152

II.3.3 Localisation des gènes différentiellement exprimés 153

II.3.4 Rôle des gènes différentiellement exprimés 154

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 158

I. Analyse de la diversité des pathogènes au sein des tiques et du rôle des co-infections 160

II. Etude des interactions entre *B. afzelii* et *B. garinii* et de leur capacité à produire un signal de Quorum Sensing 163

CONCLUSION 169

BIBLIOGRAPHIE 1711

ANNEXES 191

Annexe 1 : Gènes de *B. afzelii* différentiellement exprimés en réponse au changement de température 192

Annexe 2 : Gènes de *B. garinii* différentiellement exprimés en réponse au changement de température 200

CURRICULUM VITAE 202

Liste des abréviations :

ABC : ATP-binding-cassette
AHL : *N*-acylhomosérines-lactones
AI : Auto-inducteur
AI-2 : Auto-inducteur 2
AI-2-P : Phospho-AI-2
***B. burgdorferi* sl** : *Borreliella burgdorferi sensu lato*
***B. burgdorferi* ss** : *Borreliella burgdorferi sensu stricto*
BSA : Albumine sérique bovine
BSK : Barbour-Stonner-Kelly
***Coxiella*-LE** : *Coxiella* like endosymbionts
CRASP : Complement regulator-acquiring surface protein
CSI : Conserved signature inserts/deletions
CSP : Conserved signature proteins
Ct : Cycle threshold
Dbp : Decorin binding proteins
DPD : 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione
DPE : Denatured Protein Extract
***Francisella*-LE** : *Francisella* like endosymbionts
FC : Fold Change
HTS : High-Throughput Sequencing
IAFGP : *Ixodes scapularis* antifreeze glycoprotein
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
MCP : Methyl-accepting chemotaxis proteins
MKP : Modified Kelly-Pettenkofer
NPE : Native Protein Extract
PIXR : Protein of *I. scapularis* with a Reeler domain
POCP : Percentage of conserved proteins
Pfam : Paralogous protein family ParA partition proteins
QS : Quorum Sensing
QQ : Quorum Quenching
***R*-THMF** : *R*-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran
rSAP : Phosphatase alcaline de crevette
SAM : S-adenosylméthionine
SAH : S-adénosylhomocystéine
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SRH : S-ribosylhomocystéine
***S*-THMF-borate** : *S*-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate

Liste des figures :

Figure 1 : Morphologie générale des Argasidae et des Ixodidae. 3
Figure 2 : Cycle de vie des Ixodidae. 6
Figure 3 : Molécules présentes dans la salive de tiques, impliquées dans l'inhibition des réponses de l'hôte à la morsure. 8
Figure 4 : Facteurs impliqués dans la modulation de la composition du microbiote bactérien interne des tiques. 10
Figure 5 : Transmission de pathogènes par co-feeding. 13
Figure 6 : Résumé des différents types d'interactions microbiennes. 14
Figure 7 : Exemples d'interactions entre des bactéries pathogènes et la tique. 15
Figure 8 : Arbre phylogénétique des séquences codants l'ARNr 16S de *Borrelia*. 19
Figure 9 : Manifestations cutanées de la borréliose de Lyme. 21
Figure 10 : Incidence de la borréliose de Lyme en France métropolitaine. 23
Figure 11 : Répartition mondiale de la borréliose de Lyme et de ses principaux vecteurs. 25
Figure 12 : Pléomorphisme chez *B. burgdorferi B31* 26
Figure 13 : Organisation flagellaire de *B. burgdorferi sl*. 27
Figure 14 : Mécanismes de dissémination et d'échappement au système immunitaire de l'hôte par *B. afzelii* et *B. garinii*. 38
Figure 15 : Biofilm en formation par *B. garinii* 41
Figure 16 : Exemples d'AHLs produites par des bactéries Gram négatives 43
Figure 17 : Représentation schématique du système de QS LuxI/LuxR chez *Vibrio fischeri*. 44
Figure 18 : Molécules de communication non-AHL produites par les bactéries Gram négatives ainsi que leur synthase et leur récepteur 45
Figure 19 : Représentation schématique des deux systèmes de communication chez les bactéries Gram positives. 46
Figure 20 : Représentation de la voie métabolique de la méthionine et de la formation du DPD 49
Figure 21 : Présentation des différentes conformations naturellement adoptées par le DPD. 49
Figure 22 : Représentation des deux systèmes de synthèse d'AI-2, dépendant (à gauche) et indépendant (à droite) de LuxS. 50
Figure 23 : Les deux principaux récepteurs à l'AI-2 et la transduction du signal associée. 51
Figure 24 : Organisation génétique de la région du chromosome de *B. burgdorferi* ss contenant l'opéron *luxS*. 52
Figure 25 : Voie métabolique de la méthionine chez *B. burgdorferi* ss. 53
Figure 26 : Carte du plasmide pTM61. 64
Figure 27 : Carte du plasmide pBSV2G_PflaB_mCherryBb. 65
Figure 28 : Exemple de courbe obtenue après amplification des gammes de concentration par qPCR. 77
Figure 29 : Carte du plasmide pQE-30 82
Figure 30 : Carte du plasmide pQE-70 83
Figure 31 : Carte du plasmide pT7. 86
Figure 32 : Comparaison des traitements à l'éthanol et à l'eau de javel sur l'intégrité de la cuticule d'*I. ricinus* et sur les bactéries externes 119
Figure 33 : Observation par microscopie électronique à balayage de l'extrémité d'une patte d'*I. ricinus* traitée à l'eau de javel. 120
Figure 34 : Exemple de résultats obtenus après amplification par PCR en utilisant des couples d'amorces pour l'amplification spécifique des gènes. 122
Figure 35 : Suivi de croissance de *B. afzelii* et *B. garinii* en monoculture par comptage en microscopie et qPCR 125
Figure 36 : Suivi de croissance de *B. afzelii* et *B. garinii* en co-culture 127
Figure 37 : Expression de la GFP chez *B. afzelii* et *B. garinii* après transformation par le plasmide pTM61. 128
Figure 38 : Expression de la mCherry par *B. afzelii* après transformation par le plasmide pBSV2G_P_{flaB}-mCherry^{Bb} 129

Figure 39 : Observation des biofilms formés par *B. garinii*-GFP et *B. afzelii*-mCherry 131
Figure 40 : Observation en trois dimensions des biofilms formés par *B. garinii*-GFP et *B. afzelii*-mCherry 132
Figure 41 : Environnement de l'opéron *luxS* chez les *Borrelia* et les *Borreliella* 134
Figure 42 : Transcription des gènes de l'opéron *luxS* chez *B. garinii* et *B. afzelii* 136
Figure 43 : Mise en évidence de la structure opéronique des gènes pdeB, metK, pfs et *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii* 137
Figure 44 : Suivi de l'expression des gènes de l'opéron *luxS* en fonction du temps 138
Figure 45 : Expression du gène *luxS* par *B. afzelii* et *B. garinii* en co-culture 140
Figure 46 : Cinétique de production d'AI-2 par *B. afzelii et B. garinii* 141
Figure 47 : Mécanisme de blocage de la communication AI-2 dépendante par ajout de LsrK dans le milieu extracellulaire 144
Figure 48 : Production et purification de la protéine LsrK analysées par gel SDS-PAGE 145
Figure 49 : Production de LsrK dans des lysats totaux d'*E. coli* avec et sans induction à l'IPTG analysée par gel SDS-PAGE 146
Figure 50 : Production de LsrK par *E. coli* analysée par gel SDS-PAGE 146
Figure 51 : Analyse SDS-PAGE des échantillons purifiés par résine Ni-NTA 147
Figure 52 : Mesure de l'activité AI-2 de *B. afzelii* et *B. garinii* après traitement par LsrK 148
Figure 53 : Analyse en composantes principales des échantillons de RNAsequencing 151
Figure 54 : Gènes différentiellement exprimés par *B. afzelii* (A) et *B. garinii* (B), en fonction de la température 153

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Principales maladies infectieuses humaines et animales transmises par les tiques. 4
Tableau 2 : Caractéristiques génomiques, physiologiques et pathologiques de *B. afzelii* et *B. garinii* 29
Tableau 3 : Résumé des résultats de quatre méta-analyses étudiant l'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl. en Europe 34
Tableau 4 : Sensibilité in vitro de *B. afzelii* et *B. garinii* aux sérums de divers animaux 36
Tableau 5 : Diversité de AIs produits par les bactéries Gram positives 47
Tableau 6 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette étude 57
Tableau 7 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des gènes pdeB, pfs, metK et *luxS* et de leurs régions intergéniques 73
Tableau 8 : Couples d'amorces utilisés pour la méthode de quantification discriminante par qPCR 75
Tableau 9 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification de la totalité de la séquence codante des gènes d'intérêt pour l'étude de l'efficacité 76
Tableau 10 : Validation multi-étapes de la méthode de qPCR discriminante pour la quantification de *B. afzelii* et *B. garinii* 123
Tableau 11 : Statistiques de séquençage pour chaque échantillon analysé 150
Tableau 12 : Localisation génomique des gènes différentiellement exprimés chez *B. afzelii* et *B. garinii* 153
Tableau 13 : Protéines codées par les gènes dont les expressions sont les plus impactées par le changement de température chez *B. afzelii* 155
Tableau 14 : Protéines codées par les gènes dont les expressions sont les plus impactées par le changement de température chez *B. garinii* 156

Introduction

I. Généralités sur les tiques

I.1 Biologie des tiques

I.1.1 Les différentes familles de tiques et leurs spécificités

Les tiques sont des arthropodes parasitaires hématophages stricts présents sur la quasi-totalité du globe (Roe & Sonenshine, 2014). Elles appartiennent à l'ordre des Ixodida et sont réparties en trois familles distinctes : les Ixodidae, communément appelées « tiques dures » (qui comptent environ 700 espèces), les Argasidae, communément appelées « tiques molles » (qui comptent environ 200 espèces) et la famille des Nuttallillidae qui ne comporte qu'une espèce (Beati & Klompen, 2018). Chez toutes les tiques, le cycle de vie est composé de trois stases de développement distinctes (à différencier des « stades » qui, en acarologie, désignent des mues successives sans métamorphose (McCoy & Boulanger, 2015)) : la larve, la nymphe et l'adulte. Il existe d'importantes différences morphologiques entre les Argasidae et les Ixodidae qui permettent de les distinguer (**Figure 1**).

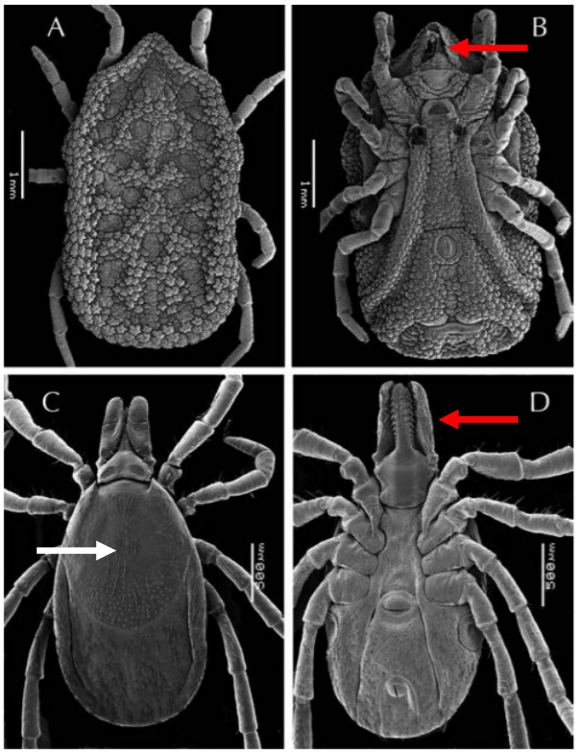

Figure 1 : Morphologie générale des Argasidae et des Ixodidae. Les individus sont observés par microscopie électronique à balayage. Les images A et B montrent respectivement les faces dorsales et ventrales d'une femelle *Ornithodoros puertoricensis* (Argasidae). Les images C et D montrent respectivement les faces dorsales et ventrales d'une femelle d'*Ixodes ricinus* (Ixodidae). Les flèches rouges indiquent le capitulum, la flèche blanche indique le *scutum* des tiques dures. Adapté de (A. Estrada-Peña, 2015).

La face dorsale des tiques dures est recouverte d'une structure rigide indéformable (d'où leur nom) que l'on appelle *scutum* (**Figure 1C**) alors que les Argasidae en sont dépourvues. A la place, ces dernières sont recouvertes d'une cuticule rugueuse et extensible, d'où le nom de tiques molles (McCoy & Boulanger, 2015). Les Argasidae ne présentent que peu de dimorphisme sexuel alors qu'il est aisé de discerner les Ixodidae adultes par le *scutum* qui va recouvrir l'intégralité de la face dorsale chez le mâle et une partie plus restreinte de la face dorsale chez la femelle. De plus, la localisation des pièces buccales permettant la prise de sang (que l'on nomme *capitulum* ou gnathosome) varie entre les Ixodidae et les Argasidae. Chez ces dernières, le *capitulum* est situé sur la face ventrale alors que chez les Ixodidae, il est situé en position antérieure. En plus des caractères morphologiques, les tiques dures et molles se distinguent également dans leurs cycles de vie. Les différences majeures se trouvent dans le nombre de repas de sang et la durée de ces derniers. Les Ixodidae prennent un seul repas de sang de longue durée (4 à 10 jours) à chaque stase développementale alors que les Argasidae peuvent prendre de multiples repas de sang sur des temps plus réduits (de quelques minutes à quelques heures) (A. Estrada-Peña, 2015). En plus des distinctions morphologiques et biologiques, ces deux familles présentent aussi des différences dans leur capacités à vectoriser des microorganismes pathogènes (Roe & Sonenshine, 2014).

Les tiques sont responsables de la transmission de la plus grande diversité de microorganismes pathogènes (la transmission de pathogènes par les moustiques entraîne plus de cas mais sur un nombre de maladies plus restreint) (Dantas-Torres et al., 2012). Le **Tableau 1** présente les principaux pathogènes transmis par les tiques, montrant l'importance qu'elles représentent en termes de santé humaine et animale. Les capacités vectorielles des Ixodidae et des Argasidae ne sont pas équivalentes puisque la majorité des microorganismes pathogènes sont transmis par les tiques dures (seuls les agents responsables de fièvres récurrentes et de la peste porcine africaine sont vectorisés par des Argasidae) (Roe & Sonenshine, 2014). Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à *Borrelia burgdorferi*, l'agent responsable de la maladie de Lyme qui est transmis par des tiques appartenant aux Ixodidae. Par conséquent, la suite de l'introduction sera principalement axée sur la biologie des tiques dures.

Tableau 1 : Principales maladies infectieuses humaines et animales transmises par les tiques. Les * indiquent les tiques appartenant à la famille des Argasidae. Adapté de (Roe & Sonenshine, 2014)

	Nom commun de la pathologie	Agent(s) responsable(s)	Tique(s) vectrice(s)	Hôte(s) touché(s) par la pathologie
Protozoaires	Babésiose	*Babesia bigemina*, *B. microti*, etc.	*Rhipicephalus* spp.	Bovins, Cerfs
	Fièvre de la côte Est	*Theileria parva*	*R. appendiculatus*	Bovins, Buffles
	Théiériose	*T. annulata*	*Hyalomma* spp.	Bovins, Buffles
	Babésiose humaine	*B. microti*	*Ixodes scapularis*, *I. ricinus*	Humains, souris
Bactéries	Fièvre pourprée des montagnes rocheuses	*Rickettsia ricketsii*	*Dermacentor* spp.	Humains, chiens, petits mammifères
	Fièvre boutonneuse méditerranéenne	*R. conorii*	*Rhipicephalus sanguineus*	Humains, hérissons, petits mammifères
	Anaplasmose	*Anaplasma phagocytophilum*	*I. scapularis*, *I. ricinus,* autres	Cerfs, Humains, chiens, autres
		A. marginale, A. centrale	*Dermacentor* spp., autres	Bovins, moutons, autres ruminants
	Ehrlichiose monocytique humaine	*Ehrlichia chafeenesis*	*Amblyomma americanum*	Cerfs, Humains
	Ehrlichiose canine	*E. canis*, *E. ewingii*	*R. sanguineus*, autres	Chiens
	Cowdriose (*Heartwater* en Anglais)	*E. ruminantium*	*A. hebraeum*, *A. variegatum*	Bovins, autres ruminants
	Fièvre Q	*Coxiella burnetti*	Espèces variées	Bovins, Humains, autres mammifères

	Borréliose de Lyme	*Borreliella* spp.	*I. scapularis*, *I. ricinus*, autres	Humains, divers mammifères, oiseaux
	Fièvre récurrente à tiques	*Borrelia spp*.	Divers Argasidae *	Humains, autres mammifères
	Tularémie	*Francisella tularensis*	*Haemaphysalis leporis-palustris*, *Dermacentor* spp., autres	Lagomorphe, humains, autres mammifères
Virus	Encéphalite à tiques	*Flavivirus*	*Ixodes* spp.	Rongeurs, humains
	Fièvre à tiques du Colorado	*Coltivirus*	*D. andersoni*	Humains, mammifères variés
	Fièvre hémorragique de Crimée-Congo	*Nairovirus*	*Hyalomma* spp.	Humains, lagomorphes, hérissons, etc.
	Peste porcine Africaine	*Iridovirus*	*Ornithodors porcinus* *	Cochons, phacochères

I.1.2 Le cycle de vie des Ixodidae

Le cycle de vie des Ixodidae est composé de trois stases distinctes, chacune étant séparée par la prise d'un repas de sang unique sur un hôte vertébré **(Figure 2)**. Après éclosion d'un œuf, la larve émergente va se mettre en quête d'un hôte vertébré sur lequel prendre son repas de sang **(Fig. 2A et B)**. Une fois arrivée à réplétion, la larve se décroche et tombe au sol. L'énergie fournie par la prise du repas de sang va lui permettre de passer à la stase nymphale. La nymphe va à son tour chercher un hôte vertébré à parasiter, prendre son repas de sang et se décrocher pour changer de stase et passer à la stase adulte **(Fig. 2C)**. Pour finir, les femelles vont chercher un dernier hôte, prendre leur repas de sang et s'accoupler. Les mâles quant à eux ne vont que peu, ou pas, se nourrir, leur objectif étant de se mettre en quête d'une femelle pour s'accoupler. Les femelles gorgées vont ensuite tomber au sol et pondre de plusieurs centaines à des milliers d'œufs **(Fig. 2D)**. Les tiques dures alternent donc entre deux phases de vie : une phase active au cours de laquelle la tique va se mettre en quête d'un hôte pour se nourrir et une phase libre durant laquelle elle change de stase ou pond

ses œufs. Les phases de vie libres sont ainsi dédiées au changement de stase puis à la recherche d'un nouvel hôte sur lequel prendre son repas de sang.

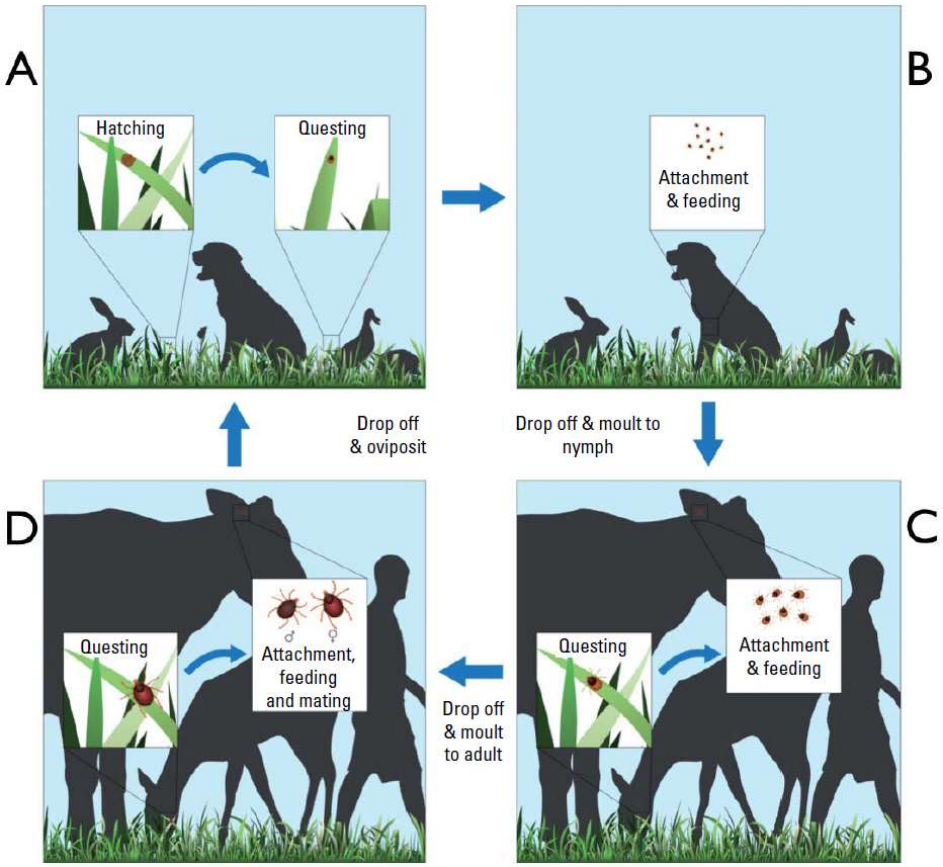

Figure 2 : Cycle de vie des Ixodidae. Après éclosion des œufs, les larves se mettent en quête d'un hôte (A) sur lequel s'attacher et se nourrir (B). Une fois arrivée à réplétion, elles se détachent et tombent au sol pour passer à la stase nymphale (B → C). La nymphe va alors se mettre en quête d'un nouvel hôte, s'attacher et se nourrir (C). Elle va ensuite tomber au sol pour passer à la stase adulte (C → D). Finalement, les adultes vont se mettre en quête d'un dernier hôte pour se nourrir et se reproduire. Les femelles tombent alors au sol pour pondre leurs œufs (D) (Agustín Estrada-Peña & De La Fuente, 2014).

I.1.3 Les stratégies de recherche et la spécificité d'hôtes

Les tiques peuvent adopter deux types de comportements selon l'espèce considérée (A. Estrada-Peña, 2015). Les tiques endophiles habitent des nids ou des terriers de vertébrés et vont prendre leurs repas de sang sur les vertébrés qui les occupent. Une fois le repas de sang pris, les tiques se décrochent dans le nid ou le terrier et vont continuer leur cycle de vie dans ce milieu qui leur offre un environnement protecteur. *A contrario,* certaines espèces de

tiques sont exophiles. Celles-ci vont prendre leurs repas de sang sur des vertébrés que l'on retrouve dans des milieux ouverts selon deux stratégies de recherche d'hôtes. Elles peuvent se mettre à l'affût au sommet de la végétation et attendre qu'un hôte potentiel se présente ou bien se mettre en « chasse » d'un hôte.

La recherche d'un hôte est également modulée par la spécificité d'hôtes de la tique. On distingue les espèces spécialistes, qui vont prendre leurs repas de sang sur une seule espèce d'hôte et les généralistes, qui peuvent prendre leurs repas de sang sur diverses espèces de vertébrés. La spécialisation d'une espèce de tique envers un hôte est dépendante de divers facteurs, aussi bien environnementaux que génétiques (McCoy et al., 2013). Le caractère spécialiste des tiques est susceptible d'évoluer au fil des générations. Cela a par exemple été démontré pour *Rhipicephalus microplus*, une tique monophasique, qui, après environ 240 générations, a évolué pour parasiter non plus un mais deux hôtes distincts (De Meeûs et al., 2010).

Le nombre d'hôtes différents parasités par une tique varie en fonction de l'espèce (Agustín Estrada-Peña & De La Fuente, 2014). La majorité des tiques dures d'intérêt clinique est triphasique, c'est-à-dire qu'elles vont prendre leur repas de sang sur trois hôtes différents (un à chaque stase) et tomber au sol pour réaliser leur métamorphose. On retrouve également des espèces diphasiques qui vont prendre leur repas de sang aux stases larvaire et nymphale sur le même hôte. La nymphe tombe au sol pour se métamorphoser en adulte qui va alors se mettre en quête d'un repas de sang sur un hôte différent. Enfin, certaines espèces sont monophasiques. Ces dernières vont prendre l'ensemble des repas de sang sur le même hôte. Lorsque l'adulte femelle arrive à réplétion, elle tombe alors au sol pour pondre.

Le succès du repas de sang de la tique dépend donc de sa capacité à trouver un hôte adapté mais nécessite également que le repas soit ininterrompu. Pour cela, les tiques produisent un cocktail de molécules transmises avec la salive au moment de la morsure.

I.1.4 L'importance de la salive de tique dans le repas de sang

La lésion créée par la morsure de tique va entraîner une réponse de l'hôte impliquant des molécules inflammatoires et des molécules pro-coagulantes afin d'accélérer le processus de guérison de la lésion. Les repas de sang des tiques dures sont généralement longs (de 3 à 10 jours généralement) (Kröber & Guerin, 2007). Par conséquent, afin d'arriver à réplétion, elles doivent être en mesure d'inhiber les mécanismes de coagulation et d'inflammation. Pour

cela, elles vont sécréter, grâce aux glandes salivaires, un nombre important d'effecteurs qui vont avoir des effets divers et variés sur l'hôte (Hovius et al., 2008; Kazimírová & Štibrániová, 2013) (**Figure 3**).

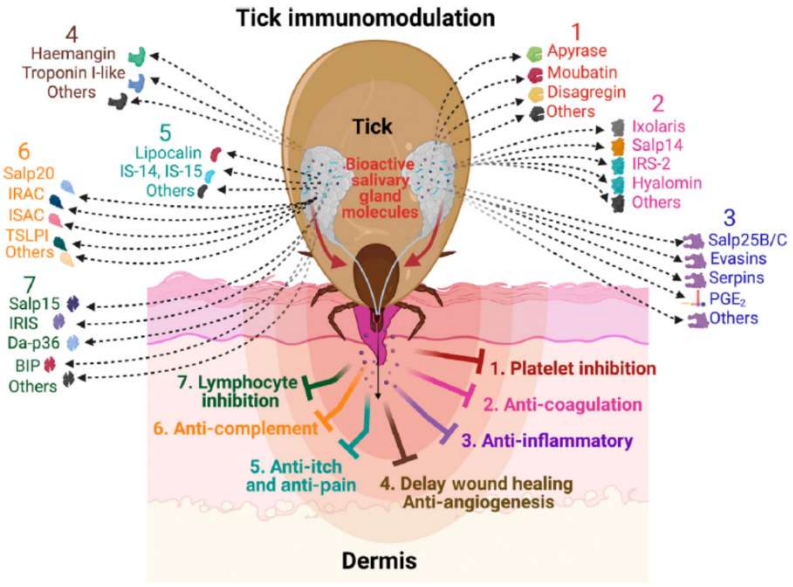

Figure 3 : Molécules présentes dans la salive de tiques, impliquées dans l'inhibition des réponses de l'hôte à la morsure. Les chiffres et les couleurs associent les molécules à leur action inhibitrice. En rouge, les molécules inhibant les plaquettes (1) ; en rose, les anticoagulants (2) ; en bleu, les anti-inflammatoires (3), en brun, les inhibiteurs de l'angiogenèse qui retardent la guérison de la lésion (4) ; en cyan, les molécules anti-démangeaison et anti-douleur (5) ; en orange, les molécules inhibant le système complément (6), en vert, les molécules inhibant la réponse lymphocytaire (7). (Kitsou et al., 2021).

Ainsi, les molécules contenues dans la salive de tiques vont inhiber l'action des plaquettes, inhibant par conséquent le processus de coagulation (on retrouve par exemple l'enzyme Apyrase, présente à la fois chez les tiques dures et molles (Kazimírová & Štibrániová, 2013; Ribeiro et al., 1985)). Elles vont également avoir un effet anti-immunitaire, par la production de molécules anti-inflammatoires, l'inhibition du système du complément et de l'action des lymphocytes. On retrouve par exemple la protéine Salp 15, produite par *I. scapularis*, qui va se lier spécifiquement aux cellules dendritiques, inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4+ et bloquer la libération de l'interleukine-2 (Anguita et al., 2002). Des homologues de Salp 15 ayant la même activité ont été décrites chez *I. ricinus* (Bierwagen et al., 2021). Pour finir, la tique produit également des molécules anesthésiantes et d'autres impliquées dans le retardement de la guérison de la lésion, notamment en bloquant l'angiogenèse (principalement par l'action de métalloprotéases présentes dans les glandes salivaires d'*I. ricinus* et *I. scapularis* (Aounallah et al., 2020; Hovius et al., 2008; Kazimírová &

Štibrániová, 2013)). L'ensemble de ces molécules agit de concert pour modifier la réponse de l'hôte et ainsi permettre à la tique de poursuivre son repas de sang jusqu'à arriver à réplétion. Ce cocktail de molécules, localisé au niveau de la morsure, va avoir une importance majeure dans l'établissement de maladies infectieuses chez l'hôte. Dans le cadre d'une étude de la réponse immunitaire d'une souris à l'infection par *B. burgdorferi*, il a été suggéré que la réponse immunitaire est plus complète chez les souris pour lesquelles les bactéries ont été transmises par une seringue comparée aux souris pour lesquelles celles-ci sont transmises par l'intermédiaire de tiques (Christe et al., 2000).

I.2 Diversité microbienne au sein des tiques

Les communautés microbiennes internes des tiques sont composées non seulement de bactéries mais aussi de virus et de protistes. Parmi ces derniers on retrouve notamment *Babesia* spp. et *Theileria* spp., deux genres de protistes principalement pathogènes pour les animaux mais qui peuvent également avoir une importance en santé humaine, comme cela a été montré pour *Babesia* spp. (Jongejan & Uilenberg, 2004). Cependant, l'étude de la diversité des microorganismes unicellulaires eucaryotes par des méthodes de séquençage à haut débit (*High Throughput Sequencing*, HTS) est encore difficile au sein de la tique car l'abondance de leur ADN est trop faible comparée à celle de l'ADN issu de la tique. En ce qui concerne les virus, les évolutions des méthodes de HTS ont permis d'étudier de façon plus approfondie les communautés virales de tiques. En 2018, 12 genres de virus répartis dans 9 familles appartenant à 2 ordres ont ainsi été décrits, auxquels s'ajoutent les séquences non-assignées retrouvées dans différentes études (J. Shi et al., 2018). La composition des communautés virales de tiques dépend également de l'espèce considérée (T. Zhao et al., 2020).

Le nombre d'études visant à caractériser les communautés de protistes et de virus au sein des tiques est bien plus réduit que le nombre d'études qui explorent les microbiotes bactériens de celles-ci.

I.2.1 La diversité bactérienne au sein des tiques

Un microbiote est défini comme l'ensemble des microorganismes présents dans un environnement déterminé. L'étude du microbiote des tiques se fait généralement après un nettoyage de la cuticule, à l'éthanol ou à l'eau de javel diluée, qui permet d'éliminer les

microorganismes externes. Par conséquent, le microbiote étudié correspond en réalité au microbiote interne des tiques puisque les microorganismes externes sont éliminés. De plus, la majorité des études visant à étudier ce microbiote sont focalisées sur l'étude des communautés bactériennes. Ainsi, le terme microbiote interne sera utilisé par la suite pour désigner les communautés bactériennes présentes à l'intérieur des tiques, sans faire de distinctions entre les tissus.

Le microbiote interne des tiques est connu pour être composé de symbiotes mutualistes, de commensaux et de pathogènes pour l'Homme et l'animal. La mise en place et la composition de ce microbiote interne sont multifactorielles. En 2014, une étude a mis en évidence que la composition et l'abondance relative des taxa colonisant des larves d'*I. scapularis* issues d'œufs ayant éclos dans un environnement stérile étaient différentes du groupe témoin (Narasimhan et al., 2014). Une partie de ce microbiote interne est transmise de manière verticale mais il semble qu'il soit aussi composé de bactéries issues de l'environnement. Des études visant à comprendre l'importance et le niveau de contribution des évènements de transmission verticaux et horizontaux dans la composition du microbiote bactérien de tiques ont été réalisées (**Figure 4**).

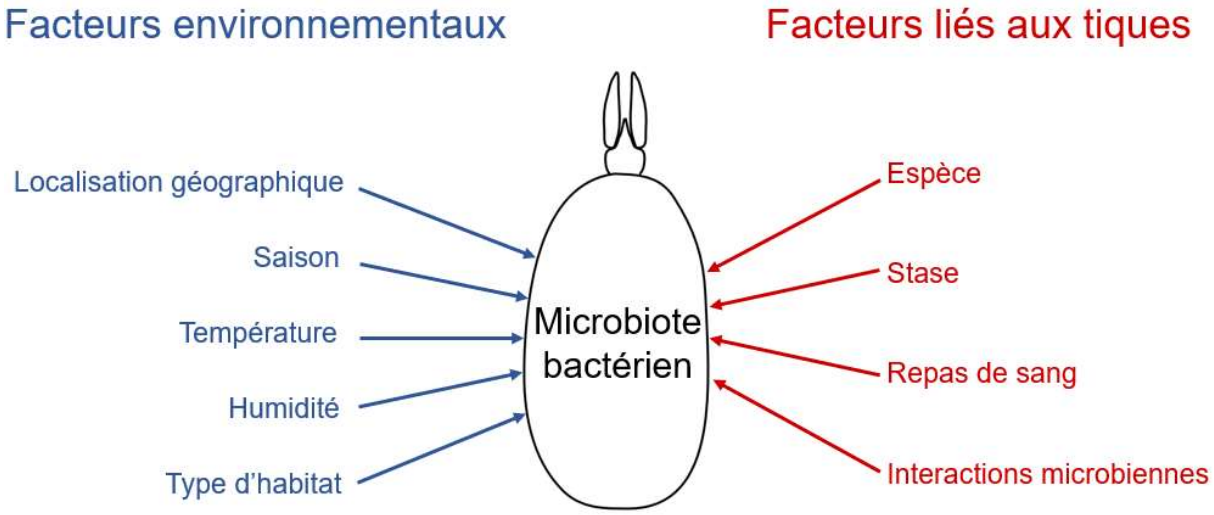

Figure 4 : Facteurs impliqués dans la modulation de la composition du microbiote bactérien interne des tiques. Les facteurs environnementaux sont présentés en bleu, les facteurs inhérents à la biologie des tiques sont présentés en rouge.

Ainsi, la composition de ce dernier dépend de la localisation géographique (Jory Brinkerhoff et al., 2020; van Treuren et al., 2015), de la saison (Lejal et al., 2021), de la température (Thapa et al., 2019), de l'humidité et du type d'habitat. La composition du microbiote interne va également dépendre de facteurs liés à la biologie de la tique, soit de façon directe (l'espèce et la stase considérée (Obregón et al., 2019)) soit de façon indirecte

(le repas de sang et donc les préférences trophiques des tiques (Landesman et al., 2020)). La composition du microbiote interne est également modulée par les interactions directes ou indirectes que vont avoir les microorganismes entre eux au sein de l'arthropode.

L'étude de ces facteurs représente un intérêt certain dans la compréhension des dynamiques de transmission de pathogènes. Cependant, une part importante du microbiote interne des tiques est composée de symbiontes mutualistes qui vont avoir un impact important dans la biologie de la tique ainsi que dans la circulation des pathogènes.

I.2.2 Les bactéries mutualistes de tiques

Les relations symbiotiques qui existent entre bactéries et tiques ont été étudiées pour un certain nombre d'espèces. Actuellement, au moins dix genres bactériens ont été répertoriés pour être transmis de manière verticale chez les tiques. Parmi ceux-ci, trois sont uniquement retrouvés chez les tiques : *Coxiella*-LE (*Coxiella* like endosymbionts), *Francisella*-LE (*Francisella* like endosymbionts) et *Candidatus Midichloria* (Bonnet et al., 2017). Les bactéries affiliées à ces genres ont établi des relations symbiotiques obligatoires avec des espèces de tiques spécifiques. Bien que l'impact de telles relations dans la survie de la bactérie ou la biologie de la tique ne soit pas encore totalement élucidé, certains mécanismes ont été explorés. Il a notamment été mis en évidence que le génome de *Coxiella*-LE présente des gènes codant des composants majeurs permettant la synthèse de la vitamine B (biotine, acide folique et riboflavine) (T. A. Smith et al., 2015). La production de ces composés permet à la tique de pallier aux carences naturellement engendrées par une alimentation exclusivement basée sur la consommation de sang (Bonnet et al., 2017; Gottlieb et al., 2015; T. A. Smith et al., 2015). Les gènes de synthèse de la vitamine B ont également été retrouvés chez les *Francisella*-LE et *Rickettsia*, suggérant là aussi un rôle de symbiote nutritionnel pour ces deux genres bactériens. *Candidatus Midichloria mitochondrii* est un endosymbiote largement retrouvé dans les mitochondries d'*Ixodes ricinus* (Sassera et al., 2006). Le rôle de ce symbiote n'est pas encore clairement établi, bien que plusieurs hypothèses aient été formulées. Ces bactéries seraient notamment impliquées dans un apport supplémentaire d'ATP au moment de l'oogenèse et permettrait également de faciliter le changement de stase de la tique (Bonnet & Pollet, 2021; Stavru et al., 2020). Il existe de nombreuses autres relations tiques-symbiontes documentées dans la littérature mais qui ne seront pas détaillées dans cette introduction (Bonnet et al., 2017; Bonnet & Pollet, 2021; Varela-Stokes et al., 2017; Y. K. Zhang & Liu, 2019).

Néanmoins, le rôle des bactéries mutualistes ne s'arrête pas aux interactions avec la tique. Aujourd'hui, plusieurs études semblent clairement indiquer qu'elles jouent un rôle important dans la composition du microbiote des tiques, notamment dans la colonisation par des pathogènes. A titre d'exemple, la présence de *R. peacockii*, un endosymbiote de la tique *Dermacentor andersonii*, limite la transmission d'autres espèces de *Rickettsia* pathogènes (Ahantarig et al., 2013). De la même manière, la présence de *Coxiella*-LE au sein d'*Amblyomma americanum* inhibe la transmission du pathogène *Ehrlichia chaffensis* (Díaz-Sánchez et al., 2019). Les mécanismes expliquant ces interactions sont encore incompris et nécessitent d'être étudiés plus en détails.

I.2.3 Les tiques comme vecteurs de pathogènes

La capacité d'un agent pathogène à circuler dans l'environnement est modulée par différents facteurs. Tout d'abord, il doit être capable d'échapper au système immunitaire de l'hôte afin de l'infecter de façon pérenne. Au moment du repas de sang, il doit être présent en quantité suffisante pour intégrer le microbiote interne de la tique, puis, il doit ensuite être capable de résister au changement de stase. Pour finir, il doit pouvoir être transmis au moment du repas de sang suivant et réussir à se répliquer afin de parasiter un nouvel hôte afin de compléter ce cycle (Agustín Estrada-Peña & De La Fuente, 2014). Dans certains cas, il est possible que des microorganismes pathogènes soient transmis presque directement d'une tique à l'autre. Ce phénomène, appelé « co-feeding », nécessite une proximité spatiale de plusieurs tiques lors de leur repas de sang (**Figure 5**). Dans ce cas précis, la proximité permet un échange quasi direct de microorganismes entre deux individus, les agents pathogènes s'affranchissent alors de la mise en place du cycle infectieux chez l'animal puisqu'ils peuvent passer directement d'une tique à l'autre. Le co-feeding peut jouer un rôle prépondérant dans la circulation des pathogènes au sein des vecteurs puisqu'il leur permet d'éviter l'élimination par le système immunitaire de l'hôte. Il est notamment fortement impliqué dans la circulation des virus entre les tiques (Kazimírová et al., 2017) mais également pour d'autres types de pathogènes comme les bactéries appartenant aux genres *Anaplasma* et *Borrelia* (Belli et al., 2017; Randolph et al., 1996; Voordouw, 2014).

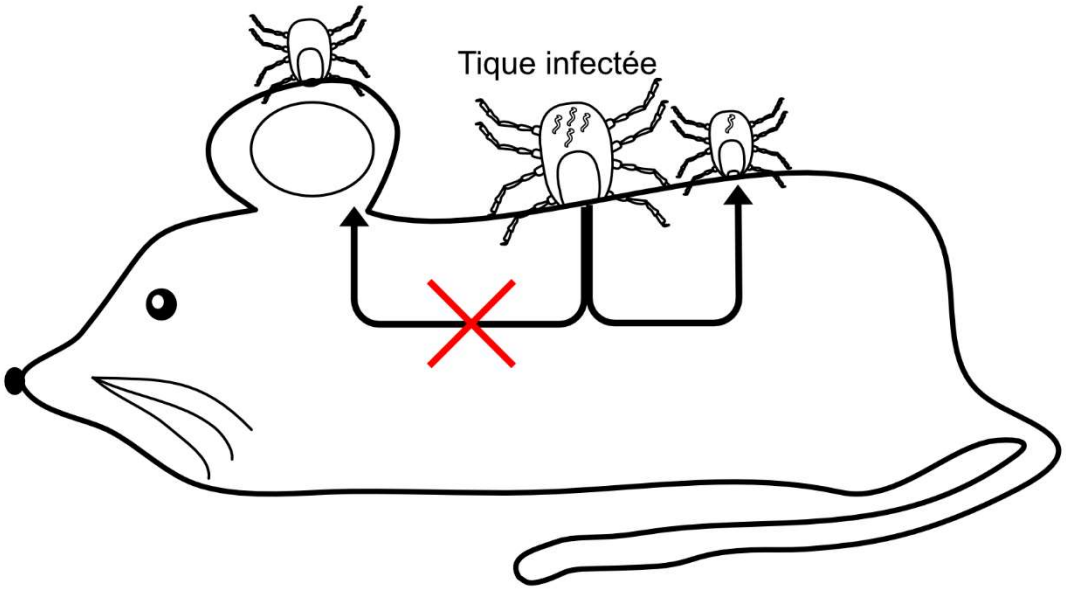

Figure 5 : Transmission de pathogènes par co-feeding. Le co-feeding nécessite une proximité spatiale des tiques (infectées et non-infectées) lors de leur repas de sang. Sur ce schéma, la tique infectée peut transmettre directement des pathogènes à la tique de droite (flèche noire) alors que la tique de gauche se situe trop loin pour que ce phénomène ait lieu (représenté par une flèche noire barrée d'une croix rouge). Adapté de (Voordouw, 2014).

Bien que la transmission par le repas de sang soit le moyen le plus courant de circulation de pathogènes entre tique et hôte, certains d'entre eux peuvent également être transférés à la descendance de la tique de façon verticale (on parle alors de transmission transovarienne). C'est le cas par exemple de certaines espèces de *Babesia* et de *Rickettsia* (Burgdorfer & Brinton, 1975; Roe & Sonenshine, 2014). Cependant, l'efficacité de la transmission semble également dépendre de la charge microbienne dans les ovaires de la femelle. Lorsqu'une femelle gorgée transmet une partie de son microbiote de façon transovarienne, cela implique que la stase larvaire de la descendance sera porteuse de ce microbiote. Ainsi, si la femelle gorgée transmet un ou plusieurs pathogènes à sa descendance, cette dernière sera vectrice du pathogène dès la stase larvaire. Concernant les bactéries du genre *Borrelia*, une seule étude a mis en évidence la transmission de ce pathogène à des souris par des larves d'*Ixodes ricinus* collectées dans la nature (Van Duijvendijk et al., 2016). Malgré ces résultats, le dogme actuel indique que leur transmission se ferait uniquement par repas de sang et non de façon transovarienne.

I.2.4 Les interactions microbiennes au sein des tiques

Les microorganismes composant des communautés microbiennes complexes, comme celles que l'on peut retrouver chez les tiques, sont en constantes interactions entre eux mais également avec leur hôte. On retrouve ainsi plusieurs types d'interactions entre (micro)organismes : la compétition, l'ammensalisme, le parasitisme, le commensalisme et le mutualisme (**Figure 6**) (Faust & Raes, 2012). Elles peuvent prendre forme de façon directe (production de molécules antibactériennes, production de molécules anti-biofilms, etc) ou indirectes (modification de certaines propriétés du vecteur qui vont conférer à certaines espèces un avantage au détriment des autres).

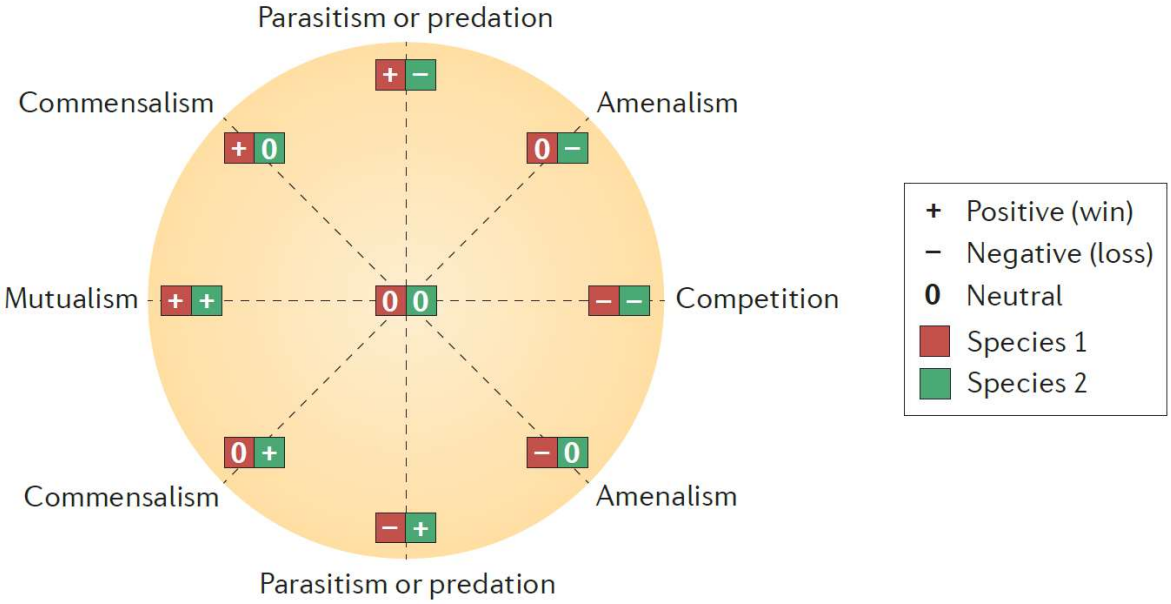

Figure 6 : Résumé des différents types d'interactions microbiennes. Pour chaque type d'interaction, il y a trois issues possibles : (+) positive ; (-) négative et (0) neutre. Adapté de (Faust & Raes, 2012).

Ces interactions microbiennes viennent rajouter un degré de complexité supplémentaire dans l'étude et la compréhension du microbiote des tiques dont la dynamique de composition est déjà multifactorielle comme indiqué précédemment (cf. partie I.2.1). Bien que de nombreuses zones d'ombres existent encore concernant les interactions microbiennes au sein de leur vecteur, plusieurs études mécanistiques ont déjà été publiées sur ce sujet (Abraham et al., 2017; Liu et al., 2012; Narasimhan et al., 2014, 2017; Pal et al., 2004; Yang et al., 2021). Ces dernières sont centrées sur deux pathogènes humains fréquemment isolés chez les tiques, à savoir *Borrelia burgdorferi* et *Anaplasma phagocytophilum*. Les mécanismes d'interactions microbiennes mis en place par ces deux bactéries sont principalement indirects (**Figure 7**). *A. phagocytophilum* est une bactérie intracellulaire obligatoire appartenant à l'ordre

des Rickettsiales, responsable de l'anaplasmose granulocytaire humaine ainsi que de l'anaplasmose ovine et bovine.

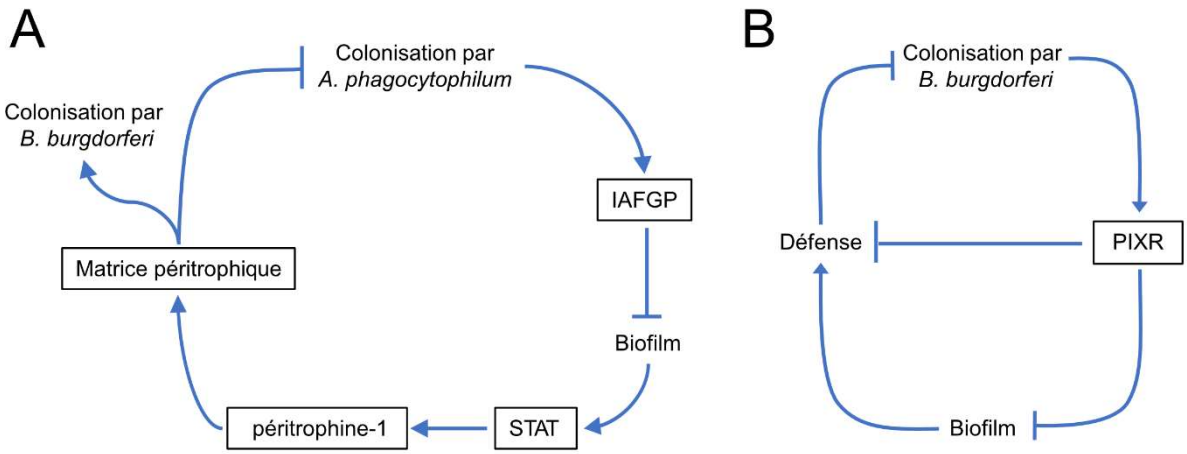

Figure 7 : Exemples d'interactions entre des bactéries pathogènes et la tique. Les encadrés noirs indiquent les protéines et gènes de la tique. (A) Modifications d'expression protéique de la tique résultants de la colonisation par *A. phagocytophilum*. IAFGP : *I. scapularis* antifreeze glycoprotein. (B) Modifications d'expression protéique de la tique suite à la colonisation par *B. burgdorferi* ss. PIXR : Protein of *I. scapularis* with a Reeler domain.

L'infection *d'I. scapularis* par cette bactérie induit la production d'une protéine appelée « *Ixodes scapularis* antifreeze glycoprotein » (IAFGP) par la tique (**Figure 7A**) (Abraham et al., 2017). Cette dernière a des propriétés multiples, parmi lesquelles est retrouvée notamment la capacité à inhiber les biofilms bactériens. Or, il se trouve qu'une dysbiose dans le système digestif de la tique entraîne une diminution de l'activité du régulateur transcriptionnel STAT (Narasimhan et al., 2014). Ce dernier est impliqué dans divers mécanismes chez la tique, principalement dans la synthèse de la péritrophine-1 qui est un composant majeur de la matrice péritrophique, une membrane acellulaire séparant physiquement le lumen des cellules épithéliales du système digestif. Par conséquent, la diminution de l'activité de STAT va diminuer l'intégrité de la matrice péritrophique de l'intestin avec deux conséquences principales. La première est une facilitation de l'infection par *A. phagocytophilum* suggérée par Liu et collaborateurs (Liu et al., 2012). La seconde est une diminution de la capacité de *B. burgdorferi* à coloniser le système digestif de la tique (Narasimhan et al., 2014) puisque la bactérie doit se lier à l'épithélium intestinal pour coloniser la tique (Pal et al., 2004). Dans le cas où la matrice péritrophique est rendue perméable, *B. burgdorferi* est alors exposée à des substances potentiellement toxiques présentes dans le lumen du système digestif, diminuant ainsi sa viabilité et sa capacité à coloniser le vecteur.

B. burgdorferi est elle aussi capable, lors de la colonisation de la tique, de modifier l'expression de certains gènes du vecteur, impactant son microbiote interne (**Figure 7B**). Une étude a suggéré que la colonisation d'*I. scapularis* par *B. burgdorferi* entraîne une augmentation de l'expression du gène codant la protéine « Protein of *I. scapularis* with a Reeler domain » (PIXR) (Narasimhan et al., 2017). L'étude du rôle de cette protéine a mis en évidence ses propriétés anti-biofilm, notamment vis-à-vis des biofilms formés par des bactéries Gram positives (*Staphylococcus aureus* dans ce cas-là) mais pas contre les biofilms produits par des bactéries Gram négatives. La même étude a également mis en évidence le rôle de PIXR dans la modulation de la composition du microbiote intestinal de la tique, dans son métabolome et dans l'expression de gènes de défense. Autant d'éléments qui permettent de faciliter la colonisation de l'intestin par *B. burgdorferi.* De plus, la dysbiose entraînée par la protéine PIXR n'impacte pas l'expression du gène codant la péritrophine-1 contrairement à ce qui a été observé pour IAFGP. Ainsi, la colonisation de *B. burgdorferi* n'est pas impactée puisque la membrane péritrophique reste intacte. Ces résultats sont à mettre en regard avec l'étude réalisée par Ross et collaborateurs (Ross et al., 2018) dans laquelle les auteurs ont montré par une approche bio-informatique la quasi-absence de gènes codant des molécules de défense antibactériennes dans les génomes de 65 membres du genre *Borrelia*, ce qui est surprenant pour des bactéries retrouvées dans des environnements polymicrobiens. Cela suggère que ces deux genres (et d'autres probablement) adoptent une stratégie alternative indirecte visant à moduler la réponse du vecteur, ayant pour conséquence une modification du microbiote interne à leur avantage. Les observations réalisées pour *A. phagocytophilum* et *B. burgdorferi* mettent également en évidence la complexité des mécanismes permettant aux bactéries pathogènes de s'implanter au sein de l'intestin de tique. Il s'agît ici d'exemples portant sur les mécanismes liés à la colonisation de bactéries pathogènes, mais on peut facilement imaginer que dans la nature, d'autres facteurs influent sur la colonisation, complexifiant encore les dynamiques de transmission de pathogènes par les tiques.

II. La Borréliose de Lyme

II.1 Historique

La maladie de Lyme tire son nom des villes de Lyme et Old Lyme, situées dans l'état du Connecticut aux Etats-Unis. En 1976, une lettre est adressée au département de la santé du Connecticut faisant mention de 51 personnes souffrant d'arthrite inflammatoire récurrente. Les symptômes apparaissaient généralement de façon saisonnière (principalement en été et au début de l'automne) et la majorité des personnes atteintes vivaient à proximité de régions fortement boisées (Lloyd, 1976). Ces résultats ont été publiés en 1977 par Steere et collaborateurs dans la revue *Arthritis and Rheumatism* (Steere et al., 1977). Le lien entre la pathologie, le vecteur et l'agent infectieux n'a été établi que cinq ans plus tard (Burgdorfer et al., 1982). Au cours de cette étude, des spécimens adultes d'*Ixodes dammini* (aujourd'hui nommée *Ixodes scapularis* (Oliver et al., 1993)) ont été collectés sur la végétation et disséqués, mettant en évidence la colonisation de ces tiques par des bactéries ayant une forme de spirochète et assimilées à des *Treponema*. Afin de confirmer l'implication de ces spirochètes dans la maladie de Lyme, des individus d'*I. dammini* ont été déposés sur des lapins afin de prendre leur repas de sang. Après 10 à 12 semaines post-engorgement, les premiers signes cliniques, notamment des érythèmes, ont été détectés chez ces lapins. Dans la même étude, l'implication de ces spirochètes dans la borréliose de Lyme a également été confirmée par la détection d'anticorps dans le sérum de patients diagnostiqués positifs. Cette spirochète a ensuite été taxonomiquement affiliée au genre *Borrelia* sur la base de sa morphologie, de sa physiologie et d'homologies d'ADN (Barbour, 1988). L'espèce de spirochète responsable de la maladie de Lyme a alors été nommée *Borrelia burgdorferi* d'après William Burgdorfer, l'une des personnes qui a participé à sa découverte et son isolement (Johnson et al., 1984). Depuis la découverte de l'agent responsable de cette pathologie, les recherches à son sujet se sont multipliées.

II.2 *Borrelia*, un genre qui divise

Depuis la découverte de *B. burgdorferi* et de la pathologie associée, les bactéries appartenant à ce genre sont réparties en deux groupes selon leur pouvoir pathogène et leurs vecteurs. On retrouve ainsi les *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes (décrites à partir

de 1907), généralement transmises par les tiques molles, et les *Borrelia* responsables de la maladie de Lyme, transmises par les tiques dures. Les bactéries constituant ces deux groupes sont identiques d'un point de vue morphologique, motilité et composition de la membrane (Bergström & Normark, 2018). En 2014, une étude *in silico* approfondie des espèces composant le genre *Borrelia* a été réalisée (Adeolu & Gupta, 2014). Les auteurs ont recherché des signatures conservées d'insertions/délétions (*conserved signature inserts/deletions*, CSI) et des signatures conservées protéiques (*conserved signature proteins*, CSP) partagées uniquement par les espèces du genre *Borrelia*, permettant ainsi la séparation de ce genre des autres genres bactériens. Ils ont également recherché des CSI et CSP qui permettraient de discriminer le groupe responsable de fièvre récurrentes du groupe responsable de la maladie de Lyme. Ils ont ainsi mis en évidence que 7 CSIs et 21 CSPs étaient uniquement présents chez les *Borrelia* responsable de maladie de Lyme alors que les *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes présentaient quant à elles 8 CSIs et 4 CSPs spécifiques. Une mesure d'homologie nucléotidique à l'échelle du génome ainsi qu'une phylogénie basée sur l'alignement de séquences codant l'ARNr 16S chez ces espèces ont également été réalisées (**Figure 8**).



Figure 8 : Arbre phylogénétique des séquences codants l'ARNr 16S de *Borrelia*. L'arbre phylogénétique a été généré par la méthode du maximum de vraisemblance. Les valeurs de Bootstraps sont présentées au niveau des nœuds. La lettre ^{T} indique la souche de référence de l'espèce considérée (Adeolu & Gupta, 2014).

Sur la base de ces différences, les auteurs ont alors proposé la séparation du genre *Borrelia en* deux genres distincts : le genre *Borrelia*, regroupant les espèces responsables de fièvres récurrentes et le genre *Borreliella*, regroupant les espèces responsables de la Borréliose de Lyme. En 2018, Margos et collaborateurs ont remis en cause la séparation des espèces en deux genres distincts (Margos et al., 2018). Leur étude se base sur l'étude du pourcentage de protéines conservées (*percentage of conserved proteins*, POCP) entre les génomes de *Borrelia*. L'utilisation du POCP pour délimiter les genres bactériens a été

proposée par Qin et collaborateurs en 2014 (Qin et al., 2014). Ces derniers préconisent un seuil de 50% pour l'appartenance de plusieurs bactéries à un même genre (POCP > 50%). Les résultats obtenus par Margos et collaborateurs montrent que les POCP calculés entre les genres *Borrelia* et *Borreliella* proposés par Adeolu et Gupta excèdent ce seuil. D'après leurs résultats, la séparation en deux genres distincts n'a donc pas lieu d'être. En 2019, Radhey S. Gupta a publié une nouvelle étude répondant directement à l'article de Margos et collaborateurs, remettant en cause l'utilisation du POCP pour la séparation de genres bactériens et clarifiant les propos de l'article initial quant à la séparation des genres basées sur les CSIs (Gupta, 2019). En réponse à cet article, Margos et collaborateurs ont à leur tour publié une lettre commentant les conclusions tirées par Radhey S Gupta sous différents aspects, proposant une nouvelle fois la conservation d'un seul genre de *Borrelia* (Margos et al., 2020). Au-delà des considérations purement expérimentales et des études bio-informatiques menées, ce changement dans la taxonomie peut entraîner de nombreux problèmes durant la période de discussion concernant la validation ou non de cette séparation. Ces problèmes ont été résumés dans une lettre publiée dans la revue *Ticks and Tick-Borne Disease* (Stevenson et al., 2018).. Cette lettre a été co-signée par de nombreux experts du domaine, qu'ils soient chercheurs ou praticiens hospitaliers.

Tous ces éléments mettent en évidence la difficulté qui existe quant à la séparation du genre *Borrelia* en deux genres distincts et à la pertinence de cette séparation. A l'heure actuelle, aucune des deux situations n'est unanimement acceptée par la communauté scientifique, si bien qu'il est possible de trouver des articles utilisant les noms de genre « *Borrelia* », « *Borreliella* » ou bien les deux. En revanche, la séparation a été effectuée dans plusieurs bases de données d'ARN ribosomaux 16S (on retrouve deux genres distincts dans la base de données SILVA ou encore celle du NCBI par exemple). Pour cette raison et pour appuyer la distinction entre les deux groupes dans la suite de ce manuscrit, le terme *Borreliella* sera employé pour désigner les espèces responsables de la Borréliose de Lyme et le terme *Borrelia* sera utilisé pour désigner les espèces responsables de fièvres récurrentes.

II.3 Symptômes et prévalence de la maladie de Lyme

II.3.1 Symptômes de la Borréliose de Lyme

Après la transmission de la bactérie à l'Homme, celle-ci va se multiplier au niveau du site de morsure, en profitant notamment des molécules anti-immunitaires présentes dans la salive de tique. Après cette multiplication, la pathologie va se développer en trois phases distinctes présentant divers signes cliniques (**Figure 9**). Dans un premier temps, la phase précoce localisée va avoir lieu. Celle-ci se présente quelques jours à quelques semaines après la morsure et se caractérise le plus souvent par l'apparition d'un érythème migrant, une lésion érythémateuse circulaire centrée sur le site de la piqûre (**Figure 9A**).



Figure 9 : Manifestations cutanées de la borréliose de Lyme. (A) Erythème migrant (Gerold Stanek & Strle, 2017) ; (B) Lymphocytome borrélien (Steere et al., 2016) ; (C) Acrodermatite chronique atrophiante (Cardenas-de la Garza et al., 2019).

Cette lésion peut s'élargir, les bordures de la lésion étant liées au front de migration des *Borreliella* et à la réaction immunitaire associée. L'érythème migrant est un symptôme pathognomonique de la pathologie mais n'apparaît que dans 80% des cas environ (Steere & Sikand, 2003). Même en l'absence de traitement, l'érythème migrant disparaît de lui-même en quelques jours à quelques mois. Au cours de cette phase, il est également possible d'observer un lymphocytome borrélien causé par une prolifération bénigne de lymphocyte B, bien que plus rare que l'érythème (Grange et al., 2002) (**Figure 9B**). Ce symptôme apparaît le plus

souvent sur le lobe de l'oreille chez l'enfant et dans la zone aréolo-mamelonnaire chez l'adulte. Si la pathologie n'est pas traitée au moment de la phase précoce localisée, elle évolue alors vers une seconde phase appelée phase précoce disséminée, liée à la propagation de la bactérie dans divers tissus. Elle intervient généralement quelques semaines à quelques mois après la morsure. À cette phase, les atteintes sont généralement neurologiques et/ou articulaires, préférentiellement dans les grosses articulations telles que le genou. Dans des cas plus rares, des troubles de la conduction cardiaque peuvent également être observés (Steere et al., 2016). Pour finir, la maladie évolue vers une phase tardive disséminée, survenant plusieurs mois voire plusieurs années après le début de l'infection. L'évolution de cette phase est chronique et la survenue des symptômes peut être intermittente. Les troubles causés lors de cette phase sont de nature cutanée, articulaire ou neurologique. Dans le cas de troubles cutanés, on observe le plus souvent une acrodermatite chronique atrophiante qui entraîne, à terme et sans traitement efficace, une atrophie de la peau qui va la rendre de plus en plus fine (**Figure 9C**). Dans les cas d'atteintes neurologiques, on parle de neuroborréliose tardive qui se caractérise par des encéphalomyélites pouvant mener à des paralysies. Les manifestations articulaires se caractérisent par des arthrites chroniques et récurrentes (Steere et al., 2016). Dans la majorité des cas, un traitement antibiotique, à base de doxycycline chez l'adulte et d'amoxicilline chez l'enfant pendant au moins deux semaines est suffisant pour éliminer les *Borreliella* lors de la phase précoce localisée et permet ainsi d'éviter l'évolution vers les autres phases (Gerold Stanek & Strle, 2017).

II.3.2 Prévalence de la Borréliose de Lyme

La Borréliose de Lyme est la maladie vectorielle la plus importante en termes de prévalence au sein de l'hémisphère Nord. Aux Etats-Unis, environ 30 000 nouveaux cas sont reportés annuellement par le Centers for Disease Control (CDC) (https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/recent-surveillance-data.html). Ce chiffre semble cependant sous-évalué étant donné qu'il ne s'agît ici que des cas avérés de Borréliose de Lyme. Les estimations les plus récentes sur le nombre de nouveaux cas de Borréliose de Lyme s'approchent de 475 000 personnes annuellement aux Etats-Unis. Les estimations s'élèvent à près de 230 000 nouveaux cas annuels en Europe de l'Ouest (Sykes & Makiello, 2016). Ces chiffres représentent des extrapolations calculées à partir des taux d'incidences reportés dans les différents états ou pays. Les taux d'incidences connaissent une variabilité entre les régions d'un même continent, notamment par les différences climatiques qui peuvent exister entre les pays Scandinaves et les pays de l'Europe méridionale par exemple. Ces

estimations surévaluent certainement le nombre de cas annuels. En revanche, le diagnostic clinique de la pathologie est parfois difficile, et le nombre de cas reportés par les professionnels de santé est donc probablement sous-évalué. Ainsi, le nombre de cas réels de Borréliose de Lyme se situe très probablement entre les deux.

En France, l'incidence de la Borréliose de Lyme varie de manière importante en fonction des régions (**Figure 10**). On peut ainsi voir que l'est de la France est fortement impacté par cette pathologie avec un taux d'incidence compris entre 200 et 425 cas pour 100 000 habitants en Alsace et Lorraine. Ce même taux d'incidence est également estimé dans le Limousin. La région Nouvelle-Aquitaine est fortement impactée par cette pathologie puisque, outre le Limousin, les anciennes régions Poitou-Charentes et Aquitaine ont un taux d'incidence compris entre 50 et 99 cas pour 100 000 habitants. Les taux d'incidences présentés ici correspondent aux cas avérés de borréliose de Lyme, diagnostiqués par des professionnels de santé appartenant au réseau sentinelles.

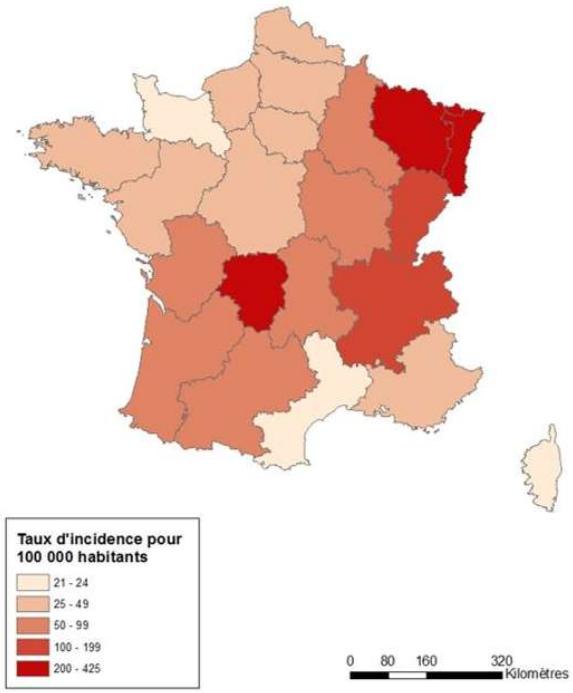

Figure 10 : Incidence de la borréliose de Lyme en France métropolitaine. Les taux d'incidence présentés correspondent aux cas diagnostiqués de borréliose de Lyme et rapportés par le réseau sentinelles entre 2015 et 2019 (**https://www.santepubliquefrance.fr/** Dernier accès le 05 novembre 2021).

II.4 Les espèces de *Borreliella* et leurs spécificités

Le genre *Borreliella* est à l'heure actuelle composé de 21 espèces souvent regroupées dans la littérature sous le nom de « *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) ». Parmi elles, trois sont majoritairement impliquées dans les cas de Borréliose de Lyme : *B. burgdorferi* sensu stricto (cette dernière sera nommée *B. burgdorferi* ss pour la suite de cette introduction), *B. afzelii* et *B. garinii*. Des cas de Borréliose de Lyme causés par d'autres espèces (*B. bavariensis*, *B. bissetti*, *B. lusitaniae*, *B. mayonii*, *B. spielmanii* et *B. valaisiana*) ont également été reportés. Cependant, il s'agît ici d'un nombre de cas très réduit en comparaison des trois espèces « principales » et l'implication de ces espèces dans la circulation de la pathologie n'est pas encore tout à fait établie. Pour cette raison, la suite de cette introduction se focalisera principalement sur *B. burgdorferi*, *B. afzelii* et *B. garinii*. Ces trois espèces sont inféodées aux tiques appartenant au genre *Ixodes*. Quatre espèces d'*Ixodes* ont une implication importante dans la transmission de ces pathogènes à l'Homme : *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. pacificus* et *I. scapularis*. Les deux premières sont principalement responsables de la transmission de la pathologie en Europe et en Asie, respectivement. *I. pacificus* et *I. scapularis* sont retrouvées aux Etats-Unis, la première est localisée sur la côte pacifique alors qu'*I. scapularis* est présente sur la côte Atlantique (**Figure 11**). Ces quatre espèces de tiques sont généralistes, triphasiques et exophiles.

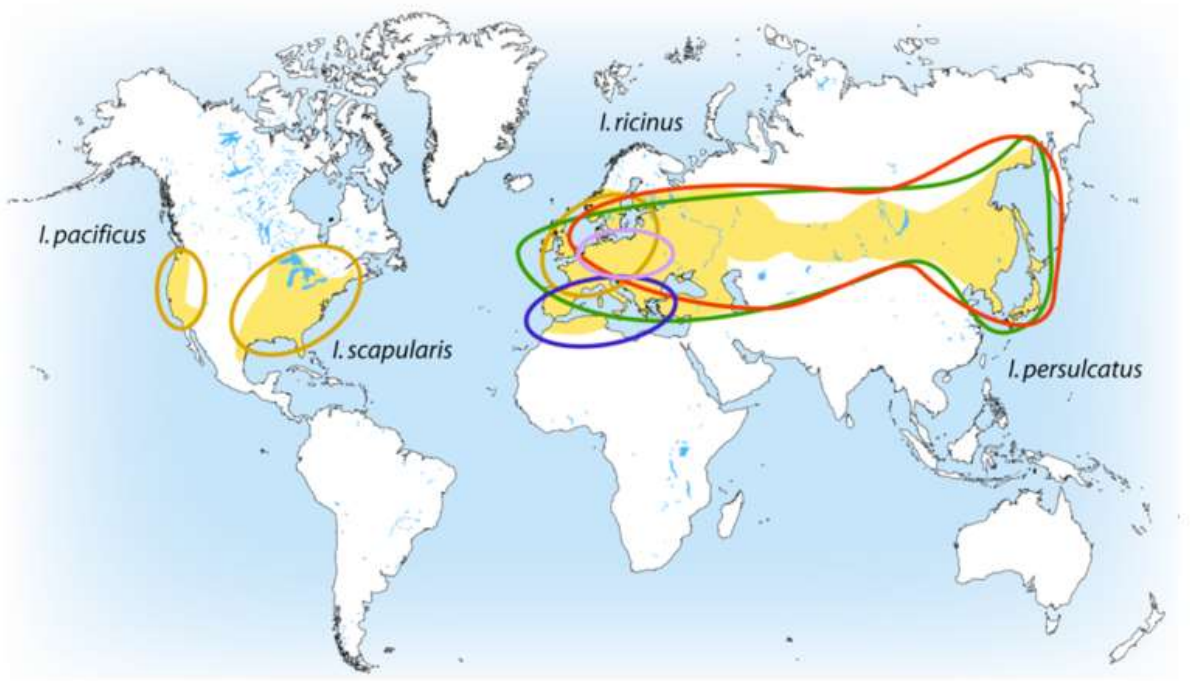

Figure 11 : Répartition mondiale de la borréliose de Lyme et de ses principaux vecteurs. En beige Aire de répartition de la maladie de Lyme. Entouré, la distribution des espèces pathogènes pour l'Homme : *B. afzelii* ; *B. garinii* ; *B. burgdorferi* ss ; *B. bavariensis*, *B. spielmanii* ; *B. lusitaniae*. (Tonetti, 2012).

A l'échelle mondiale, la répartition des espèces de *Borreliella* est variable. Aux Etats-Unis, l'espèce majoritaire, que ce soit dans les tiques collectées de l'environnement ou impliquées dans la pathologie, est *B. burgdorferi* ss alors qu'en Europe, *B. afzelii* et *B. garinii* sont les acteurs majeurs de cette pathologie. *B. burgdorferi* ss est également retrouvée en Europe mais dans une moindre mesure.

II.5 Caractéristiques physiologiques et morphologiques des *Borreliella*

Les milliers d'études concernant *B. burgdorferi* sl réalisées au cours des 40 dernières années ont permis d'obtenir de nombreuses informations concernant l'agent pathogène, sa virulence ainsi que sa circulation dans la nature. Les *Borreliella* sont des bactéries microaérophiles, hélicoïdales et de tailles variables pouvant aller jusqu'à 30 µm et d'une largeur comprise entre 0,1 et 0,4 µm. Elles sont à Gram négatives mais présentent la particularité d'être dépourvues de lipopolysaccharide et de phosphatidylethanolamine

(Barbour & Hayes, 1986; Belisle et al., 1994). Ces bactéries sont pléomorphes lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* (Meriläinen et al., 2015) (**Figure 12**). Ainsi, elles peuvent être sous leur forme hélicoïdale qui représente la forme métaboliquement active (**Figure 12a**), sous une forme arrondie apparentée à une forme kystique appelée « round-body » (**Figure 12c**) et sous une forme intermédiaire appelée « bleb » (**Figure 12b**). Enfin, ces bactéries ont également tendance à se regrouper sous forme d'agrégats (**Figure 12d**).

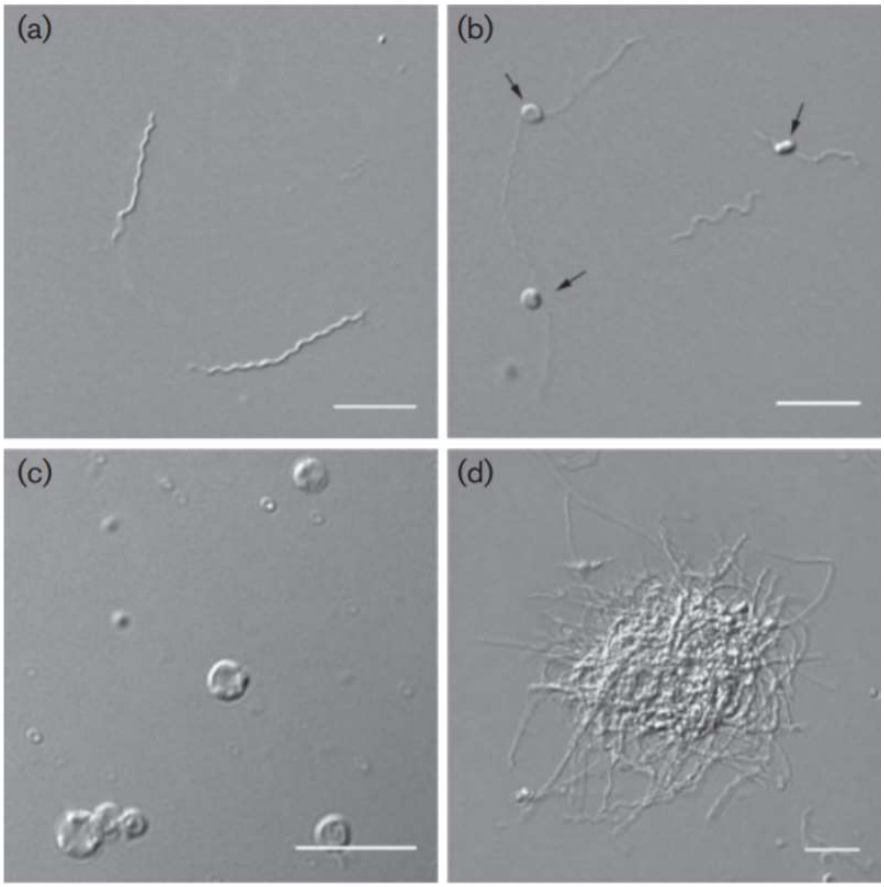

Figure 12 : Pléomorphisme chez *B. burgdorferi B31*. Les bactéries ont été observées par microscopie à contraste interférentiel différentiel. (a) forme hélicoïdale ; (b) forme « bleb » indiquées par les flèches noires ; (c) forme « round-bodies » ; (d) agrégats de *Borreliella*. Echelle : 10 µm. (Meriläinen et al., 2015).

Toutes les espèces de *Borreliella* séquencées présentent un chromosome d'environ 900 kb auquel s'ajoutent de nombreux plasmides linéaires et circulaires. Certaines espèces sont dotées de plus de vingt plasmides (Casjens et al., 2000). Une autre particularité de ces bactéries réside dans son implantation flagellaire (**Figure 13)**. Elles possèdent un nombre variable de flagelles (entre 7 et 12) situés dans l'espace périplasmique et qui sont attachés au cylindre protoplasmique (**Figure 13A**). Chaque flagelle est rattaché à un moteur flagellaire situé à proximité de protéines impliquées dans le chimiotactisme (Xu et al., 2011) (**Figure 13B**). Ces dernières sont des *methyl-accepting chemotaxis proteins* (MCP) qui vont guider le

mouvement des bactéries vers les nutriments mais également permettre d'éviter les molécules répulsives telles que l'éthanol et le butanol (Steere et al., 2016). La présence de flagelles multiples et leur organisation confère à la bactérie des mouvements donnant une impression de vibration. Cette organisation particulière lui permet d'avoir une importante motilité, même dans les milieux visqueux tels que la matrice extracellulaire, les tissus conjonctifs ou le sang (Kudryashev et al., 2009; Moriarty et al., 2008). En 2013, Sultan et collaborateurs ont étudié le rôle de la motilité dans le cycle infectieux de la bactérie et ont mis en évidence que l'incapacité de *B. burgdorferi* ss à se déplacer la rend sensible au système immunitaire de l'hôte (Sultan et al., 2013).

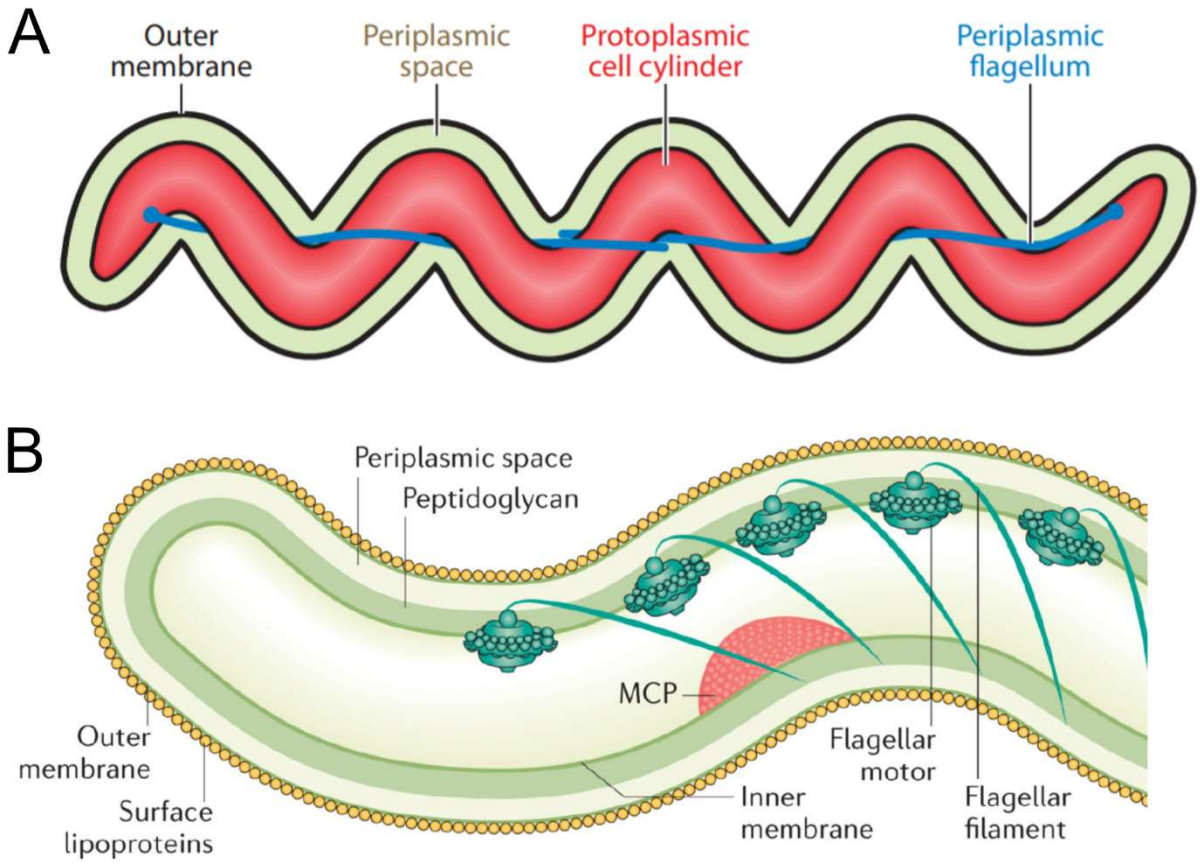

Figure 13 : Organisation flagellaire de *B. burgdorferi sl*. (A) Représentation longitudinale de *B. burgdorferi* sl et de l'implantation flagellaire. Deux flagelles se chevauchent dans l'espace périplasmique (Charon et al., 2012). (B) Le schéma a été dessiné à partir d'un modèle 3D lui-même reconstitué à partir d'une image de cryotomographie électronique. Les flagelles sont liés aux moteurs flagellaires, à proximité de protéines responsables du chimiotactisme, et insérés dans l'espace périplasmique. MCP : *Methyl-accepting chemotaxis proteins* (Steere et al., 2016).

La majorité des études sur *Borreliella* a été réalisée en utilisant *B. burgdorferi* ss comme modèle. Bien que les trois espèces principales présentent beaucoup de similarités (morphologie, organisation génétique, physiologie, etc.), elles ont également des spécificités importantes. Le chapitre suivant sera ainsi dédié à un état de l'art orienté sur la comparaison entre *B. afzelii* et *B. garinii* puisqu'elles sont les espèces majeures sur le continent Européen.

III. Comparaison entre *B. afzelii* et *B. garinii*

Après la découverte de *B. burgdorferi* ss en 1982, il fût rapidement mis en évidence que les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme différaient en Europe et aux Etats-Unis (Gerold Stanek et al., 1985). Ces différences ont mené à l'étude plus approfondie des spirochètes responsables de cette pathologie sur les deux continents. Dix ans après la découverte de *B. burgdorferi* ss, Baranton et collaborateurs ont identifiés trois espèces de *Borrelia* distincts sur la base des fragments générés suite à l'action de la nucléase S1 (Baranton et al., 1992). Ces trois espèces correspondaient à *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* et le groupe VS461, qui a plus tard été nommé *B. afzelii* (G. Stanek & Reiter, 2011). Ces trois espèces sont capables d'entraîner des manifestations cliniques variées de la borréliose de Lyme, mettant en avant la diversité des espèces de *Borreliella* capables de causer cette pathologie. De plus, les différentes manifestations cliniques qui existent entre les Etats-Unis et l'Europe soulève l'hypothèse de l'existence de mécanismes propres à chaque espèce dans l'établissement de la pathologie.

Dans ce chapitre, *B. afzelii* et *B. garinii* seront comparées sur divers aspects : caractéristiques génomiques, physiologiques, classes d'hôtes préférentielles, tropismes tissulaires chez l'Homme et leurs facteurs de virulence. Les données issues de la littérature présentées ci-après feront l'objet d'une revue qui sera soumise à publication au cours de l'année 2022. Ces comparaisons sont résumées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Caractéristiques génomiques, physiologiques et pathologiques de *B. afzelii* et *B. garinii*.

		B. afzelii	*B. garinii*	Références
Caractéristiques génomiques	Taille du chromosome	~900 kb	~900 kb	Mongodin et al., 2013
	% GC	27,7 – 28,3	27,12 – 28,4	Bontemps-Gallo et al., 2018, Glöckner et al., 2006, Kurilshikov et al., 2014, Casjens et al., 2011, Schüler et al., 2015, Jiang et al., 2012, Jiang et al., 2012, Margos et al., 2018, Brenner et al., 2012, Wu et al., 2014
	Nombre de plasmides	4 - 17	5 – 11	Bontemps-Gallo et al., 2018, Glöckner et al., 2006, Kurilshikov et al., 2014, Casjens et al., 2011, Schüler et al., 2015, Jiang et al., 2012, Margos et al., 2018, Brenner et al., 2012, Jiang et al., 2012, Wu et al., 2014, Casjens et al., 2018
	Nombre de gènes codants	727 - 1342	802 – 1085	Bontemps-Gallo et al., 2018, Glöckner et al., 2006, Kurilshikov et al., 2014, Casjens et al., 2011, Schüler et al., 2015, Jiang et al., 2012, Margos et al., 2018, Brenner et al., 2012, Jiang et al., 2012, Wu et al., 2014
Caractéristiques physiologiques	Température optimale de croissance	33 °C	33 °C	Ružić-Sabljić & Strle, 2004
	Type respiratoire	Microaérophiles	Microaérophiles	Bontemps-Gallo et al., 2018
	Temps de génération	Anaérobiose : 19h Microaérophilie : 12h	12 h	
	Motilité *in vitro*	0,725 cm/jour	0,35 cm/jour	
	Transformabilité par pBSV2	Oui	Non	
	Résistance au stress oxydatif (IC_{50})	5	2,5	
	Osmotolérance (mOsM)	350 - 450	350 – 650	
Prévalence, préférences trophiques et tissulaires	Prévalence chez les tiques *B. burgdorferi* sl positives (%)	38 – 46,6	23,8 – 33	Rauter & Hartung, 2005, Strnad et al., 2017
	Classe d'hôtes préférentiels	Rongeurs	Oiseaux	Gern, 2009, Wolcott et al., 2021
	Préférence tissulaire chez l'Homme	Cutanée	Neurologique	Stanek et al., 2012, E. Ružić-Sabljić et al.,, 2000, Strle et al., 2006, Coipan et al., 2016
Virulence	Expression des gènes de virulence majeurs	*cspA* *dbpA* *ospC* *vlsE*	*cspZ* *dbpA* *dbpB* *ospC* *vlsE*	Glöckner et al., 2006, Kraiczy & Stevenson, 2013, Hammerschmidt et al., 2014, Lin et al., 2014, Tufts et al., 2019, Lin et al., 2020, Bierwagen et al., 2021
	Capacité à former des biofilms *in vitro*	Oui	Oui	Timmaraju et al., 2015

Les données présentées ici permettent de mettre en évidence des traits communs et divergents entre *B. afzelii et B. garinii*. Plusieurs souches pour chaque espèce ont été incluses dans la comparaison lorsque cela été possible. Pour les caractéristiques génomiques, les

résultats ont été compilés à partir de la base de données du NCBI. Seules les souches ayant été totalement séquencées et annotées ont été utilisées. L'IC_{50} définie pour la résistance au stress oxydatif correspond à la concentration en hydroperoxyde de *tert*-butyle (exprimée en mM) suffisante pour obtenir 50% de mortalité. Les gènes de virulence présentés dans ce tableau codent des protéines dont l'activité a été vérifiée.

III.1 Caractéristiques génomiques

III.1.1 Caractéristiques chromosomiques

Tout comme les autres espèces composant le genre *Borreliella*, *B. afzelii* and *B. garinii* présentent un chromosome d'environ 900 kb auquel s'ajoute une importante diversité de plasmides linéaires et circulaires (Mongodin et al., 2013). Les génomes de ces espèces sont composés d'environ 27% de GC. Ce taux est identique entre les chromosomes et les plasmides avec cependant une variabilité légèrement plus importante sur les plasmides. Le pourcentage de GC sur les plasmides de *B. afzelii* varie entre 23,3% et 31,9% (Casjens et al., 2011; Schüler et al., 2015) et celui des plasmides de *B. garinii* varie entre 23,3% et 32% (Baranton et al., 1992; Brenner et al., 2012; Casjens et al., 2011; Margos et al., 2018). Il est important de souligner que ces variations vont dépendre du contenu plasmidique de chacune des souches, qui est également sujet à variations. L'alignement des séquences chromosomiques a mis en évidence une importante homologie entre ces deux espèces puisqu'elles ne présentent que 6,5% de différences nucléotidiques sur l'ensemble du chromosome (comparaison de deux souches par espèce) (Mongodin et al., 2013). Le séquençage et l'annotation du chromosome de deux souches (*B. afzelii* BO23 et *B. garinii* CIP 103362) a montré que sur un peu plus de 800 gènes codants identifiés sur les chromosomes bactériens, seulement 18 étaient propres à l'une des deux espèces (Bontemps-Gallo et al., 2018).

III.1.2 Caractéristiques plasmidiques

Les principales différences génomiques qui existent entre ces deux espèces proviennent de leur contenu plasmidique. Chacune des deux espèces de *Borreliella* présente une grande quantité et diversité de plasmides (**Tableau 2**). Les plasmides des *Borreliella* sont généralement nommés en fonction de la séquence codant la « paralogous protein family

32 (Pfam32) ParA partition proteins » (Casjens et al., 2018). Ces protéines sont responsables du positionnement des plasmides dans la cellule (Baxter & Funnell, 2014). En plus de la séquence des Pfam32, les plasmides de *B. burgdorferi* sl se distinguent également par leur taille et leur configuration circulaire ou linéaire.

Dans une étude récente (Casjens et al., 2018), le contenu plasmidique a été caractérisé chez des souches de *B. afzelii* et *B. garinii*. Deux plasmides sont conservés chez toutes les souches de *B. afzelii* et *B. garinii* étudiées (ainsi que d'autres espèces de *Borreliella* incluses dans l'étude). Il s'agît du plasmide linéaire lp54 et du plasmide circulaire cp26. La conservation de ces plasmides présente un intérêt majeur pour le cycle de vie de la bactérie, que ce soit dans la tique ou dans la survie chez l'hôte. En effet, le gène codant OspC (une lipoprotéine de surface permettant d'échapper à la phagocytose chez l'hôte (Carrasco et al., 2015)) est localisé sur le plasmide cp26. Le plasmide lp54, quant à lui, contient les gènes codant les protéines OspA, OspB et CspA. Ces trois protéines sont impliquées dans la capacité de la bactérie à échapper au système immunitaire inné de l'hôte (Hallström et al., 2013; Kurokawa et al., 2020). De plus, OspA et OspB sont également impliquées dans la formation de rafts lipidiques chez la bactérie ainsi que dans l'adhérence au système digestif du vecteur (Kurokawa et al., 2020; Toledo et al., 2014). Le rôle prépondérant de ces protéines dans la survie de la bactérie peut expliquer que ces deux plasmides soient extrêmement conservés au sein du genre.

Lors d'études *in vitro*, il a été montré que le contenu plasmidique des *Borreliella* est sujet à variations (Bišku p et al., 2011). Les cultures successives de cette bactérie vont entraîner une sélection des plasmides impliqués dans la survie et la croissance *in vitro* au détriment d'autres. Il est ainsi établi que des cultures *in vitro* successives peuvent entraîner la perte de plasmide(s) nécessaire(s) à l'infection chez l'hôte (Bišku p et al., 2011). La présence des autres plasmides, spécifiques d'une souche ou d'une espèce, pourrait expliquer les différences observables entre *B. afzelii* et *B. garinii* détaillées par la suite.

III.2 Caractéristiques physiologiques

À ce jour, plusieurs études qui comparent directement les caractéristiques physiologiques entre *B. afzelii* et *B. garinii* sont disponibles (Bontemps-Gallo et al., 2018; Casjens et al., 1995; Hubálek et al., 1998; Ružić-Sabljić & Strle, 2004; Sicklinger et al., 2003; Veinović et al., 2016; Wallich et al., 2005). L'étude par Ružić-Sabljić et Strle a mis en évidence que les deux espèces sont capables de se développer à la fois dans le milieu Barbour-Stonner-Kelly II (BSK-II, milieu de référence pour la croissance des *Borreliella*) ainsi que dans le milieu

« modified Kelly-Pettenkofer » (MKP). *B. afzelii* et *B. garinii* sont capables de se développer *in vitro* à des températures allant de 23 °C à 37 °C, avec un optimum de température de 33 °C, qui mime la température interne de la tique au moment du repas de sang (Veinović et al., 2016). L'étude par Bontemps-Gallo et collaborateurs est, quant à elle, plus développée et présente des résultats comparant différents aspects physiologiques de ces deux espèces (Bontemps-Gallo et al., 2018). En revanche, au cours de cette étude les auteurs n'ont étudié qu'une souche de chacune des espèces, il est possible que les résultats présentés ci-après varient en fonction des souches considérées. En premier lieu, les conditions d'oxygénation préférentielles ainsi que le temps de génération des deux bactéries ont été étudiés. *B. afzelii* et *B. garinii* sont toutes deux capables de se développer en conditions anaérobies et en conditions limitées en oxygène. Dans cette dernière condition, le temps de génération des deux espèces est identique (12h) alors que *B. afzelii* se développe plus lentement que *B. garinii* en condition anaérobie (19h et 12h, respectivement). Aucune de ces deux espèces n'est capable de se développer en condition aérobie. La motilité de ces deux espèces a également été mesurée, mettant en évidence que la motilité de *B. afzelii* est plus importante que celle de *B. garinii*. Cet élément pourrait s'avérer important dans le cycle de vie la bactérie, que ce soit chez le vecteur ou chez l'hôte. En effet, le gène *flaB*, un acteur majeur de la motilité chez *B. burgdorferi* ss, est exprimé de manière constitutive et joue un rôle crucial dans l'infection de l'hôte et dans le maintien de la morphologie (Motaleb et al., 2000; Motaleb et al., 2015; Sultan et al., 2013). Au sein du vecteur, la motilité est nécessaire au moment du repas de sang pour la migration au niveau du derme de l'hôte (Dunham-Ems et al., 2009) alors que chez l'hôte la motilité est nécessaire pour la dissémination et l'échappement au système immunitaire.

À l'heure actuelle, la majorité des outils moléculaires, qui ont été utilisés pour l'étude de *Borreliella,* a été développée pour l'étude de *B. burgdorferi* ss. La capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à être transformée par le vecteur pBSV2, un plasmide largement utilisé pour *B. burgdorferi* ss, a ainsi été étudiée. Seule *B. afzelii* a pu être correctement transformée par ce vecteur. Cela s'explique sans doute par l'origine de réplication utilisée sur ce vecteur qui provient originellement du plasmide cp9 de *B. burgdorferi* ss (Stewart et al., 2001). En effet, la caractérisation des plasmides présents chez les souches de *B. afzelii* et *B. garinii* utilisées dans cette étude montre que *B. afzelii* BO23 est pourvue d'un plasmide cp9, ce qui n'est pas le cas de *B. garinii* CIP 103362. Cette observation met tout de même en exergue le manque d'outils moléculaires disponibles pour l'étude de *B. afzelii* et *B. garinii*.

La sensibilité de ces deux espèces au stress oxydatif ainsi que leur osmotolérance ont également été étudiées. Leur résultats montrent que *B. afzelii* est plus résistante au stress oxydatif que *B. garinii*, ce qui peut avoir un impact sur la survie de cette dernière au moment

de la digestion du repas de sang, lors de la migration du système digestif aux glandes salivaires chez la tique ainsi que chez l'hôte vertébré (Bourret et al., 2016). En ce qui concerne l'osmotolérance, *B. garinii* semble plus tolérante aux variations d'osmolarité (de 350 à 650 mOsM) que *B. afzelii* (de 350 à 450 mOsM). Il s'agît également d'un paramètre majeur de la survie de la bactérie et de sa circulation dans l'environnement puisqu'une forte variation de l'osmolarité va avoir lieu au moment du repas de sang (Benoit & Denlinger, 2010; Lees, 1946).

La sensibilité aux antibiotiques est une caractéristique importante des bactéries pathogènes, aussi bien pour le traitement de ces pathologies, mais également pour leur manipulation génétique lors d'études en laboratoire. Par conséquent, la sensibilité *in vitro* de *B. afzelii* et *B. garinii* à différents antibiotiques a été explorée (Bontemps-Gallo et al., 2018). *B. garinii* est légèrement plus sensible que *B. afzelii* à la carbenicilline, la doxycycline et la spectinomycine *in vitro*. Cette même différence de sensibilité à la doxycycline a été observée chez d'autres souches de *B. afzelii* et *B. garinii*, bien que les différences soient faibles (Sicklinger et al., 2003).

III.3 Données épidémiologiques

Depuis la découverte de *B. burgdorferi* ss au sein des tiques en 1984, les études visant à détecter les *Borreliella* dans l'environnement se sont multipliées. À l'échelle Européenne, plusieurs centaines d'études ont été publiées et rapportent des taux d'infections d'*I. ricinus* variés. Les résultats obtenus en Europe concernant les taux d'infections mesurés entre 1984 et 2018 ont été compilés et résumés dans quatre méta-analyses (Estrada-Peña et al., 2011, 2018; Rauter & Hartung, 2005; Strnad et al., 2017) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Résumé des résultats de quatre méta-analyses étudiant l'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl. en Europe

	Période	Nombre d'articles	Nombre de nymphes	Nombre d'adultes	Taux d'infection des nymphes	Taux d'infection des adultes	Espèces majoritaires
Rauter & Hartung, 2005	1984 - 2003	110	63 298	43 390	10,1%	18,6%	*B. afzelii* & *B. garinii*
Estrada-Peña et al., 2011	1995 - 2009	88	43 393	23 928	nr	nr	*B. afzelii* et *B. garinii*
Strnad et al., 2017	2010 - 2016	101	56 401	25 377	11,8%	14,9%	*B. afzelii* & *B. garinii*
Estrada-Peña et al., 2018	2010 - 2017	195	36 894	0 *	nr	nr	*B. afzelii* & *B. garinii*

nr : non renseigné ; * : L'infection des *I. ricinus* adultes n'a pas été explorée du fait du repas de sang supplémentaire qui aurait pu fausser les analyses, expliquant que le nombre d'adultes soit de 0 (Estrada-Peña et al., 2018).

Les données analysées dans l'étude de Rauter & Hartung ainsi que celle de Strnad et collaborateurs ont toutes deux montré une prévalence de *Borreliella* sp. plus importante chez les adultes que chez les nymphes. Ceci peut être expliqué par le repas de sang supplémentaire pris pour passer de la stase nymphale à la stase adulte. Les deux études d'Estrada-Peña et collaborateurs se sont focalisées sur les nymphes uniquement, donc aucune comparaison des taux d'infections des nymphes et des adultes n'est possible sur la base de leurs données. De plus, au cours de ces études les auteurs se sont intéressés aux facteurs impactant la détection de *Borreliella* spp. chez les tiques et ne font pas mention des taux d'infection chez ces dernières. Les quatre études s'accordent sur le fait qu'en Europe, les deux espèces majoritairement retrouvées au sein des tiques en quête d'un hôte sont *B. afzelii* et *B. garinii*.

Ces deux espèces ont été détectées sur la quasi-totalité du continent Européen avec une prévalence importante en Europe centrale. *B. garinii* est l'espèce majoritairement (si ce n'est la seule) retrouvée dans les tiques en quête collectées dans les pays méditerranéens (Estrada-Peña et al. 2011).

Il est possible qu'une tique soit infectée simultanément par plusieurs espèces de *Borreliella*, on parle alors de co-infection. Les co-infections par *B. afzelii* et *B. garinii* ont été reportées dans ces méta-analyses avec des résultats contradictoires. L'étude par Rauter & Hartung indique que la co-infection *B. afzelii* et *B. garinii* est la deuxième co-infection par deux espèces de *Borreliella* la plus présente (derrière la co-infection *B. garinii* – *B. valaisiana*). Au

contraire, Strnad et collaborateurs ont indiqué qu'il existait une corrélation négative entre la présence de *B. afzelii* et *B. garinii* au sein d'une même tique, limitant ainsi la probabilité de l'existence de co-infections par ces deux espèces. Ces différences peuvent en partie être expliquées par les périodes couvertes dans ces deux méta-analyses. En effet, l'étude de Rauter & Hartung couvre la période de 1984 à 2003 alors que celle de Strnad et collaborateurs s'étend de 2010 à 2016. Dans la première, les méthodes utilisées pour la distinction entre les espèces étaient moins performantes que dans la seconde. Cela s'illustre bien par une baisse importante du nombre d'étude rapportant l'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* ss à partir des années 2010 qui peut être corrélée à l'utilisation d'outils plus performants pour la distinction des espèces (Estrada-Peña et al., 2018) De plus, de nouvelles espèces ont été découvertes au fil des années. C'est le cas par exemple de *B. bavariensis* qui a été définie comme une nouvelle espèce qu'en 2009. Avant cela elle était définie comme la souche *B. garinii* OspA sérotype 4 (Margos et al., 2009). Avant cette découverte, il est possible que les *B. garinii* détectées dans les tiques en quête d'un hôte étaient en réalité des *B. bavariensis* et donc que la prévalence de *B. garinii* était surévaluée avant l'année 2009.

Dans la littérature, *B. afzelii* et *B. garinii* sont décrites pour avoir des classes d'hôtes naturels préférentiels au sein desquels elles sont le plus souvent retrouvées : *B. afzelii* est régulièrement isolée de petits rongeurs alors que *B. garinii* est principalement retrouvée chez les oiseaux (sa présence au sein d'oiseaux migrateurs pourrait expliquer sa prévalence plus importante dans les pays méditerranéens) (Gern, 2009). Ces résultats ont été confirmés par des études mettant en évidence des différences de sensibilité *in vitro* à des sera issus de divers vertébrés (**Tableau 4**) (Bhide et al., 2005; Kraiczy, 2016b; Kurtenbach et al., 2002; Lin et al., 2020).

Tableau 4 : Sensibilité in vitro de *B. afzelii* et *B. garinii* aux sérums de divers animaux.

Espèces	*B. afzelii*	*B. garinii*
Homme	**R**	**S**
Souris	**R**	**S**
Rat	**R**	**S**
Hamster	**R**	**S**
Ecureuil	**R**	**S**
Chat	**R**	**I**
Chien	**R**	**S/I**
Mouflon	**R**	**R/I**
Lynx	**I**	**I**
Loup	**S**	**S/I**
Mouton	**S**	**S**
Cheval	**S**	**S**
Cochon	**S**	**S**
Lapin	**S**	**S**
Faisan	**S**	**R**
Merle	**S**	**R**
Chèvre	**S**	**S**
Bovins	**S**	**S**
Cerf	**S**	**S**
Bison européen	**S**	**S**
Lézard	**S**	**R**

Cases bleues : résistantes (R), cases grises : intermédiaires (I), cases jaunes : sensibles (S), cases rouges : phénotype indéterminé (S/I et R/I). Adapté de (Kraiczy, 2016b).

Cependant, au vu de la diversité de vertébrés qui peuvent être parasités par les *Ixodes* vectrices des bactéries responsables de la Borréliose de Lyme, il est difficile de tirer des conclusions sur la spécialisation des espèces de *Borreliella* envers une classe d'hôte. En effet, tous les sérums des vertébrés parasités par les *Ixodes* n'ont pas pu être étudiés pour leur potentiel anti-*Borreliella*, non seulement car d'un habitat à un autre la diversité d'hôtes peut varier grandement, mais également pour des raisons techniques. En effet, afin de conclure quant au potentiel de transmission de *Borreliella* d'un hôte à une tique, il est nécessaire de réaliser un xénodiagnostic, c'est-à-dire réaliser un repas de sang d'une tique sur un hôte infecté pour étudier ensuite la colonisation de la tique par les bactéries d'intérêt. Les équipes de recherche se heurtent alors à des limitations telles que la protection des espèces, les infrastructures nécessaires à l'étude de vertébrés de taille importante, les temps nécessaires pour la prise d'un repas de sang. Il est donc possible que *B. afzelii* et *B. garinii* ne soient pas limitées à un seul type d'hôte mais qu'elles puissent infecter et se maintenir au sein de plusieurs hôtes comme résumé dans la synthèse bibliographique de Wolcott et collaborateurs (Wolcott et al., 2021).

III.4 Tropisme différentiel de *B. afzelii* et *B. garinii* chez l'Homme

L'étude du cycle infectieux et des symptômes spécifiques des différentes espèces de *Borreliella* représente un enjeu majeur pour la compréhension de la pathologie et peut avoir d'importantes répercussions en santé humaine. *B. afzelii* et *B. garinii* vont entraîner des manifestations cliniques qui peuvent différer. Des symptômes sont communs à ces deux espèces (telle que l'apparition de l'érythème migrant), en plus des symptômes spécifiques à chaque espèce (Stanek et al., 2012). Ces données proviennent principalement d'études analysant les espèces de *Borreliella* retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien ou dans des biopsies de peau provenant de patients atteints de la Borréliose de Lyme en Europe. Ainsi, *B. afzelii* est majoritairement retrouvée dans les biopsies de peau, alors que c'est majoritairement *B. garinii* qui est isolée d'échantillons de liquide céphalo-rachidien (Coipan et al., 2016; Ružić-Sabljić et al., 2000; Strle et al., 2006). Ceci semble indiquer un tropisme préférentiel chez l'Homme différent pour chacune de ces espèces. Il est important de souligner que ces différences de tropisme n'engendrent pas d'exclusion mutuelle ; une part non négligeable des *Borreliella* isolées du liquide céphalo-rachidien des patients peuvent appartenir à l'espèce *B. afzelii* et inversement pour les biopsies de peau (Stanek & Strle, 2017). Les raisons pour lesquelles différentes espèces de *Borreliella* présentent des tropismes préférentiels chez

l'Homme sont encore inconnues. Plusieurs équipes de recherche ont tenté de répondre à cette question, émettant l'hypothèse que des différences de mécanismes de virulence entre espèces pourraient, partiellement, expliquer ces tropismes marqués.

III.5 Facteurs de virulence chez ces deux espèces

La connaissance des facteurs potentiellement impliqués dans la virulence des *Borreliella* provient, historiquement et principalement, de travaux effectués sur *B. burgdorferi* ss. L'étude de ces derniers a ensuite été réalisée chez *B. afzelii* et/ou *B. garinii*, permettant de ce fait d'investiguer des différences potentielles entre plusieurs espèces de *Borreliella* qui pourraient expliquer les tropismes différentiels détaillés précédemment. Les mécanismes et les effecteurs de la virulence de *B. afzelii* et *B. garinii* qui sont connus ont été résumés dans la **figure 14.**

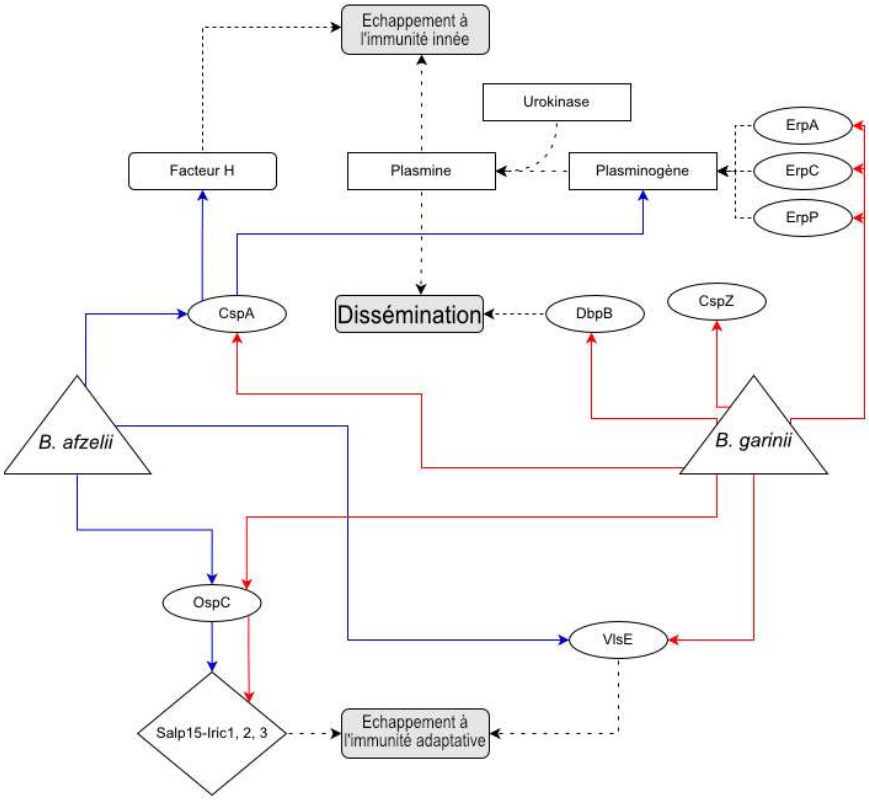

Figure 14 : Mécanismes de dissémination et d'échappement au système immunitaire de l'hôte par *B. afzelii* et *B. garinii*. La plupart des mécanismes décrits ici ont été découvert et étudiés chez *B. burgdorferi* ss. Des homologues de ces effecteurs ont alors été recherchés

chez *B. afzelii* et *B. garinii*, cependant, le rôle de ceux-ci n'a pas été systématiquement caractérisé. Les flèches bleues correspondent aux effecteurs produits par *B. afzelii*, les flèches rouges ceux produits par *B. garinii* et les flèches noires en pointillés le rôle de ces effecteurs décrits chez *B. burgdorferi* ss mais encore inconnus chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Les protéines dans les ovales sont produites par les bactéries, celles dans les rectangles sont produites par l'hôte, celle dans le losange est produite par la tique. Les rectangles arrondis et grisés correspondent aux rôles des effecteurs.

Des études comparatives ont notamment pu être menées sur les *Decorin binding proteins* (Dbp), qui sont impliquées dans l'adhérence de la bactérie aux fibres de collagène chez l'hôte. Ces protéines participent à la virulence de la bactérie, notamment en favorisant leur capacité à se disséminer au sein de l'hôte, sans pour autant être indispensable dans le processus infectieux (Shi et al., 2008; Wu et al., 2015). La protéine DbpB est fonctionnelle chez *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss alors qu'aucune adhérence médiée par cette-ci n'a été détectée chez *B. afzelii in vitro* (Salo et al., 2011). Ces protéines pourraient jouer un rôle important dans les différences de tropisme observées entre les espèces de *Borreliella* (Lin et al., 2014).

Les principaux gènes de virulence décrits chez *Borreliella* codent des protéines participant à l'échappement au système immunitaire de l'hôte. On retrouve notamment les protéines CRASPs (*Complement regulator-acquiring surface protein*). À ce jours, cinq CRASPs ont été décrites : CspA (CRASP-1), CspZ (CRASP-2), ErpP (CRASP-3), ErpC (CRASP-4) et ErpA (CRASP-5) (Tufts et al., 2019). Les CRASPs permettent d'échapper au système immunitaire de l'hôte en se liant à différents régulateurs du système du complément, notamment le facteur H qui y joue un rôle central (Kraiczy & Stevenson, 2013). Chez *B. burgdorferi* ss, les cinq CRASPs sont capables de se lier à ce dernier et vont par conséquent inhiber le système du complément de l'hôte ce qui va rendre la bactérie résistante au sérum et ainsi faciliter sa dissémination.

Les mécanismes d'échappement au système immunitaire utilisés par *B. afzelii* et *B. garinii* ne sont pas encore tout à fait élucidés. En effet, l'étude des CRASPs homologues chez ces deux espèces a mis en évidence qu'elles n'étaient pas toutes produites ou qu'elles ne se liaient pas au facteur H. *B. afzelii* produit un homologue de CspA qui va se lier au facteur H alors que *B. garinii* produit un homologue de cette protéine sans activité de liaison à ce dernier (Hart et al., 2018). La capacité d'une souche à produire une CspA capable de se lier au facteur H du complément est directement liée à sa capacité à survivre *in vitro* dans le sérum de l'hôte (Wallich et al., 2005). Cela pourrait expliquer le fait que *B. garinii* est généralement sensible au sérum humain (Kraiczy, 2016b; Kurtenbach et al., 1998). Cependant, ces résultats sont surprenants du fait de la forte prévalence de *B. garinii* dans les cas de neuroborréliose. Pour

causer de tels symptômes, la bactérie doit en effet être capable d'échapper au système immunitaire de l'hôte afin de pouvoir coloniser les tissus concernés. *B. garinii* est capable de produire une CspZ, cependant elle ne présente pas la capacité de se lier au facteur H alors que *B. afzelii* ne semble pas capable de produire cette protéine *in vitro* (Rogers & Marconi, 2007).

Au cours d'une étude *in vivo*, Bykowski et collaborateurs ont suggéré que les gènes *erpP*, *erpC* et *erpA* sont co-exprimés lorsque *B. burgdorferi* ss infecte la souris (Bykowski et al., 2007). Les paralogues des protéines Erp sont généralement regroupées sous le terme de protéine OspE. Ainsi, il n'est pas rare de retrouver ce terme dans la littérature pour désigner l'ensemble des protéines Erp. Ces dernières ne présentent qu'une capacité limitée à se lier au facteur H du complément. En revanche, chez *B. burgodrferi* ss, elles jouent un rôle important dans la virulence de la bactérie par leur capacité à se lier au plasminogène (Brissette et al., 2009) qui peut être converti en plasmine par l'urokinase de l'hôte. La plasmine est une protéase qui va permettre de dégrader la fibrine, le fibrinogène et certaines protéines de la coagulation (Castellino & Ploplis, 2005). L'utilisation de la plasmine par *B. burgodrferi* ss peut donc faciliter sa dissémination et sa progression dans divers tissus de l'hôte. En plus de ces actions, *B. burgdorferi* ss est capable de dégrader la protéine C3b, un autre effecteur du système du complément de l'Homme, par l'intermédiaire de la plasmine. (Kraiczy, 2016a). La capacité de *B. garinii* à se lier au plasminogène de l'hôte a été prouvée (Klempner et al., 1996). De plus, cette espèce est capable de produire des protéines Erp *in vitro* (Kraiczy, 2016a). Il est possible que la liaison du plasminogène se fasse par l'intermédiaire des protéine Erp situées à la surface de *B. garinii*, cependant, chez cette dernière, leur implication dans l'inhibition du système complément n'a jamais été prouvée. En ce qui concerne *B. afzelii*, aucune étude n'a actuellement démontré sa capacité à produire des protéines de la famille Erp. En revanche, elle présente une activité de liaison au plasminogène de l'hôte par l'intermédiaire de la protéine CspA (Hammerschmidt et al., 2014).

Aux CRASPs vient s'ajouter une lipoprotéine, OspC, qui est largement conservée au sein des *Borreliella*. Cette protéine se lie à un effecteur de la salive de tique (Salp15 chez *I. scapularis* ou Salp15-Iric1, 2 ou 3 chez *I. ricinus*) (Bierwagen et al., 2021; Ramamoorthi et al., 2005). L'interaction entre ces protéines permet d'empêcher la reconnaissance d'OspC par le système immunitaire de l'hôte et ainsi y échapper. L'étude par Bierwagen et collaborateurs a mis en évidence la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à produire une protéine OspC active.

Enfin, les *Borreliella* sont dotées d'un gène permettant d'échapper au système immunitaire adaptatif de l'hôte : *vlsE*. La découverte du gène *vlsE* chez *B. burgdorferi* ss remonte à 1997 (Zhang et al., 1997) et il a depuis été décrit comme indispensable dans le

processus infectieux de *B. afzelii* et *B. garinii* (Glöckner et al., 2006). La bactérie est capable de réaliser un nombre important de recombinaisons de ce gène, si bien que la lipoprotéine VlsE qui est codée présentera quasi-systématiquement des antigènes de surface différents (Norris 2014; Chaconas, Castellanos, and Verhey 2020). De cette manière, la protéine ne pourra pas être reconnue par le système immunitaire de l'hôte. Les gènes responsables de l'échappement au système immunitaire qui ont été décrits sont systématiquement situés sur des plasmides, mettant en avant le rôle prépondérant de ces derniers dans la genèse de la pathologie.

B. afzelii et *B. garinii* sont toutes deux capables de former des biofilms *in vitro* (**Figure 15**) (Timmaraju et al., 2015). Les biofilms sont des agrégats de bactéries enchâssés dans une matrice extracellulaire qu'elles produisent et qui vont adhérer à une surface (Flemming et al., 2016).

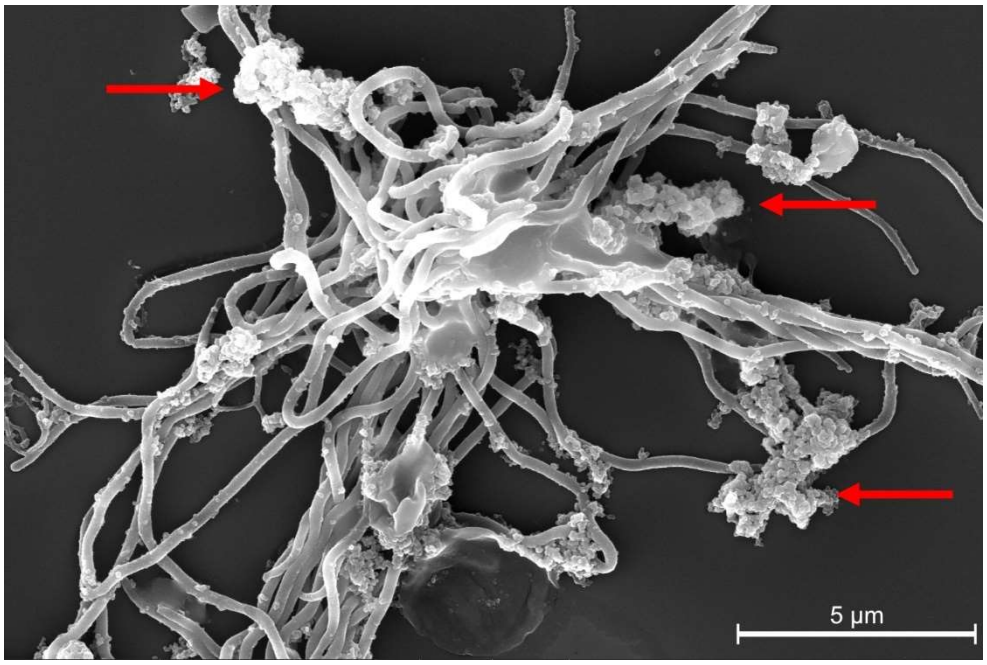

Figure 15 : Biofilm en formation par *B. garinii*. L'observation a été réalisées en microscopie électronique à balayage. Les flèches rouges indiquent la matrice extracellulaire produite par la bactérie qui, en s'accumulant, formera un biofilm. La photo a été réalisée au laboratoire EBI.

Il est aujourd'hui établi que les biofilms peuvent jouer un rôle dans la dissémination des bactéries chez l'Homme, dans leur protection contre le système immunitaire ainsi que vis-à-vis des antimicrobiens (Mirzaei et al., 2020). Des biofilms formés par *B. burgdorferi* sl ont été détectés dans des biopsies de lymphocytomes borréliens prélevés chez l'Homme, mettant en évidence la capacité de ces bactéries à produire des biofilms *in vivo* (Sapi et al., 2016).

Cependant, cette étude n'a pas exploré les espèces de *Borreliella* formant ces biofilms, il n'est donc pas possible de conclure quant à la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* de produire de tels complexes chez l'Homme. Néanmoins, si cette hypothèse s'avère vraie, cela pourrait contribuer à la virulence de la bactérie et apporter des éléments quant aux complications observées pour le traitement des phases disséminées précoce et tardive.

La capacité des bactéries à former des biofilms est régulée par une importante diversité de mécanismes qui vont agir de concert. Parmi ces mécanismes, on retrouve notamment la communication bactérienne, aussi appelée *Quorum Sensing*.

IV. Le Quorum Sensing

Le Quorum Sensing (QS) est un mode de communication largement répandu chez les bactéries. Il permet de réguler de nombreux processus comme la bioluminescence ou la conjugaison ainsi que d'autres impliqués dans la virulence tels que la formation de biofilm et la motilité, par exemple (Antunes et al., 2010; Bassler, 1999; Bassler & Losick, 2006; Solano et al., 2014). Le QS permet de synchroniser la réponse et l'expression de nombreux gènes d'une population bactérienne afin d'obtenir un effet de groupe (le terme *quorum* vient du latin et désigne le nombre de membres nécessaire et suffisant dans une assemblée pour qu'une décision soit prise). Cette communication repose sur la production constitutive, la sécrétion et la détection de molécules appelées auto-inducteurs (AI), notamment car ils contrôlent leur propre expression. À l'heure actuelle, de nombreuses molécules signalétiques impliquées dans le QS ont été décrites. Cette diversité de signaux permet aux bactéries de communiquer de façon spécifique avec les autres cellules de la même espèce mais également avec des cellules d'autres espèces ou genres bactériens (Banerji et al., 2020). Cette notion présente un intérêt majeur dans la nature où les communautés bactériennes sont souvent très diversifiées. Ainsi, la production et la détection de molécules spécifiques permet de coordonner une réponse globale d'un seul type de microorganisme, sans nécessairement impacter les autres microorganismes environnants. Le type d'AI produit va donc dépendre de l'espèce bactérienne considérée.

À ce jour, trois types de communications et leurs rôles sont principalement étudiés. On retrouve la communication induite par les *N*-acylhomosérines-lactones (AHL) chez les bactéries Gram négatives, celle liée à la production de peptides chez les bactéries Gram positives et un mode de communication plus universel, retrouvé à la fois chez les bactéries Gram positives et négatives, induit par des molécules dérivant du DPD (4,5-dihydroxy-2,3-

pentanedione) désignées sous le terme générique Auto-Inducteur 2 (AI-2). Etant donné que plusieurs molécules dérivent du DPD, il a été choisi d'utiliser l'abréviation « AI-2 » et non « l'AI-2 » qui pourrait ne désigner qu'une de ces molécules.

IV.1 Le QS chez les bactéries Gram négatives

Le premier système de communication découvert chez les bactéries Gram négatives est induit par les AHL. Ces molécules sont composées d'un noyau lactone attaché à une chaîne carbonée composée de 4 à 18 carbones, pouvant être ou non saturés. Des fonctions cétones ou alcools peuvent également être retrouvée au niveau des carbones C2 et/ou C4 (**Figure 16**) (Galloway et al., 2011). Les différences de longueur de la chaîne carbonée participent à la stabilité de ces molécules mais également à la spécificité du signal au niveau de l'espèce bactérienne et du type de réponse associée (Papenfort & Bassler, 2016).

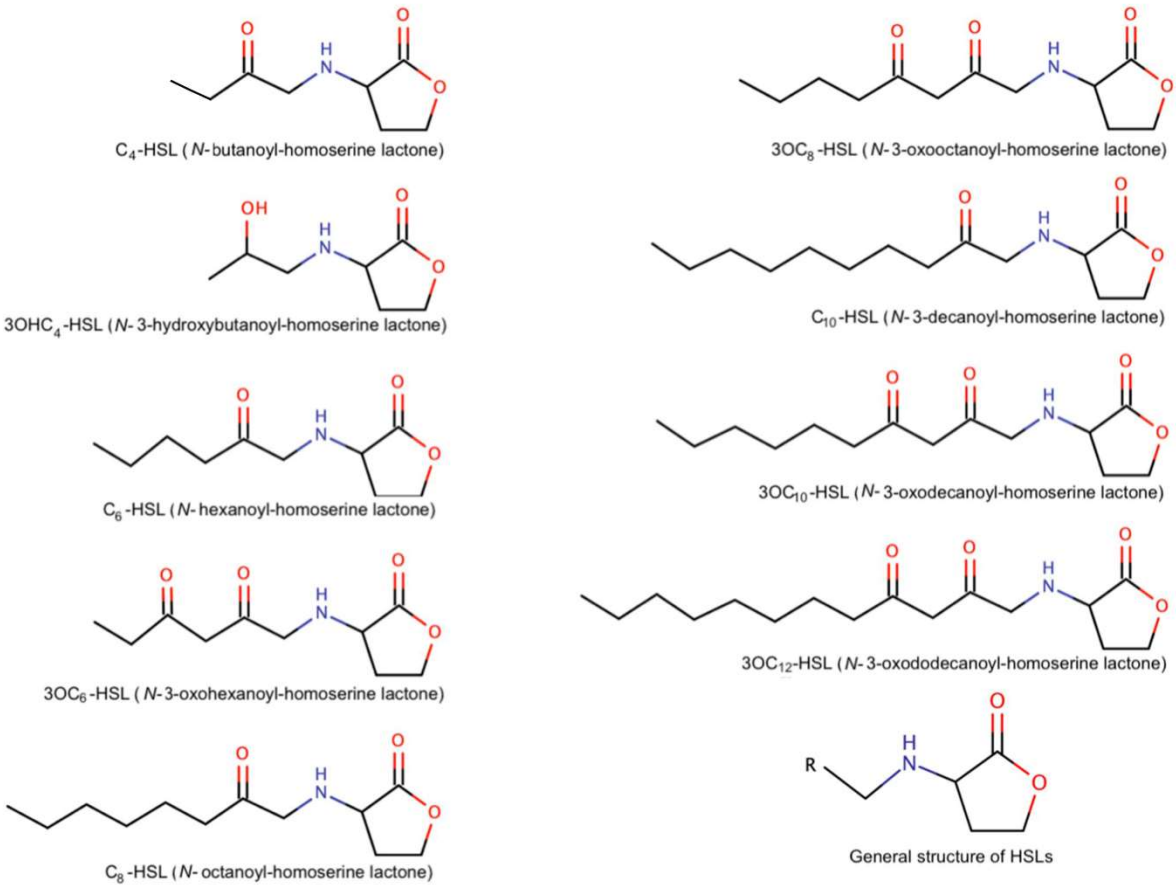

Figure 16 : Exemples d'AHLs produites par des bactéries Gram négatives. Le terme HSL est l'acronyme d'Homosérine-lactone (Acet et al., 2021).

Ce système est généralement composé de deux éléments nommés LuxI, synthase des AHLs et LuxR, le récepteur cytoplasmique des AHLs. Il existe un nombre important de bactéries exprimant des synthases de type LuxI et donc capables de produire des AHLs (Case et al., 2008). Ces dernières vont ensuite être sécrétées dans le milieu extracellulaire et s'accumuler dans le microenvironnement. Lorsque la concentration extracellulaire en AHL dépasse un seuil « critique », la molécule va alors pouvoir pénétrer dans les cellules bactériennes par diffusion et se lier au récepteur LuxR (ou l'un de ses homologues) qui va alors se dimériser. LuxR contient un motif de liaison au ligand en N-terminal ainsi qu'un motif de liaison à l'ADN à l'extrémité C-terminale (Smith et al., 2006). Ce dernier permet au récepteur, après activation par liaison à une AHL et sa dimérisation, d'entraîner la régulation de l'expression de divers gènes. Un exemple du fonctionnement du QS induit par LuxI et LuxR est présenté en **Figure 17**.

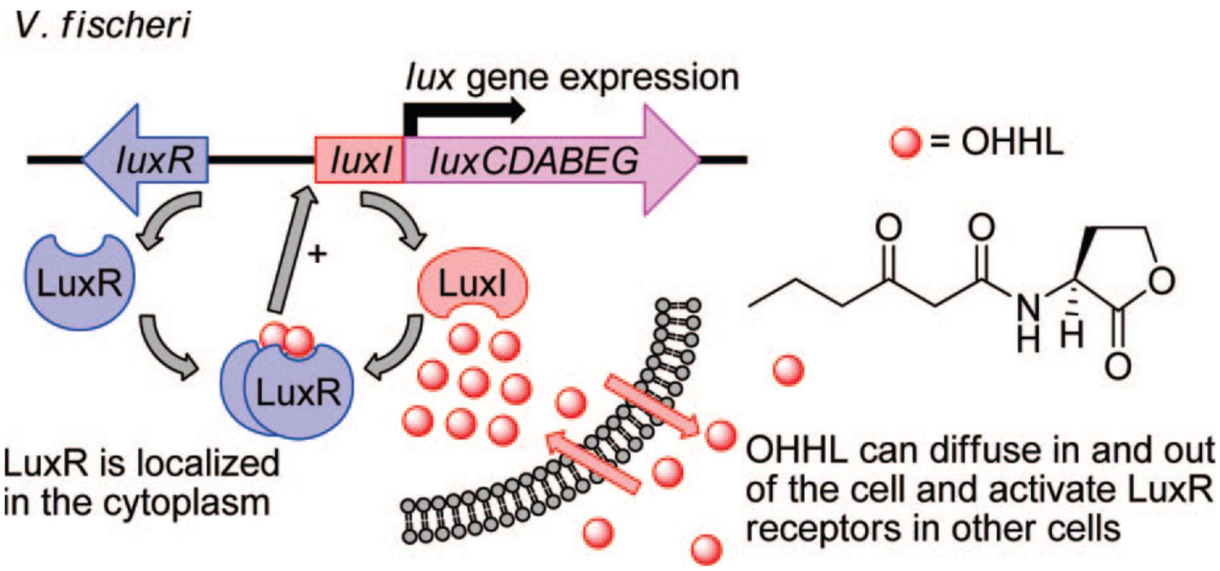

Figure 17 : Représentation schématique du système de QS LuxI/LuxR chez *Vibrio fischeri*. OHHL correspond à l'AHL *N*-3-oxohexanoylhomosérine lactone produite par *V. fischeri* (Galloway et al., 2011).

Certaines bactéries Gram négatives sont également capables de produire d'autres types d'AIs dont la structure, la synthase et le récepteur vont varier (Papenfort & Bassler, 2016). Des exemples de ces molécules sont présentées en **Figure 18**.

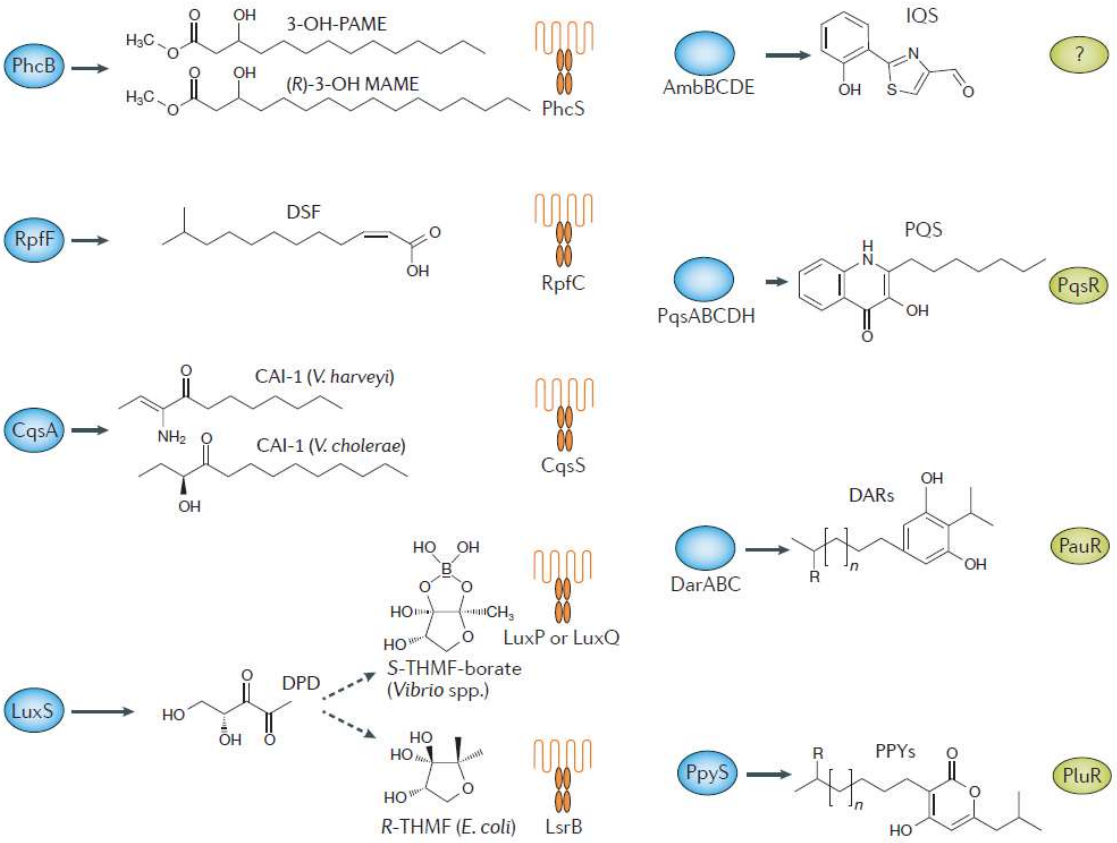

Figure 18 : Molécules de communication non-AHL produites par les bactéries Gram négatives ainsi que leur synthase et leur récepteur. Les synthases sont présentées dans les cercles bleus. Les récepteurs transmembranaires sont représentés en orange et les facteurs de transcription sont représentés par les cercles verts. Adapté de (Papenfort & Bassler, 2016).

IV.2 Le QS chez les bactéries Gram positives

Le mécanisme de communication employé par les bactéries Gram positives se base également sur la production, la sécrétion, l'accumulation puis la détection de molécules. En revanche, la nature des molécules ainsi que les effecteurs sollicités varient grandement. Les AIs produits par les bactéries Gram positives sont des oligopeptides. Ces derniers proviennent soit de courtes séquences codantes ou sont dérivés de protéines naturellement produites par la cellule (Novick, 2003; Shelburne et al., 2011). Les oligopeptides sont généralement transportés de façon active (contrairement aux AHLs qui diffusent à travers la membrane) dans le milieu extracellulaire par l'action de transporteurs de type ATP-Binding-Cassette (ABC) (Bassler, 1999). Une fois le *quorum* atteint dans le milieu extracellulaire, deux mécanismes

distincts permettent d'entraîner la cascade de régulation de gènes (**Figure 19**). Dans le premier cas de figure, les interactions ont lieu à l'extérieur de la cellule (présenté dans la partie « Extracellular pathway » en **Figure 19**). L'oligopeptide se lie avec un récepteur transmembranaire de type histidine kinase, entraînant son auto-phosphorylation. La kinase va à son tour phosphoryler une protéine régulatrice cytoplasmique qui va ainsi pouvoir se lier à l'ADN, entraînant les modifications d'expression de gènes. Dans le deuxième cas de figure, une fois la concentration seuil atteinte, l'oligopeptide va être transporté de façon active à l'intérieur de la cellule (présenté dans la partie « Intracellular pathway » en **Figure 19**). Selon les cas, l'oligopeptide va alors soit se lier directement à un régulateur transcriptionnel, entrainant la modification de l'expression de gènes, soit inhiber une aspartyl-phosphate phosphatase, ce qui va induire une modification de la phosphorylation de régulateurs transcriptionnels, et donc indirectement l'expression de gènes.

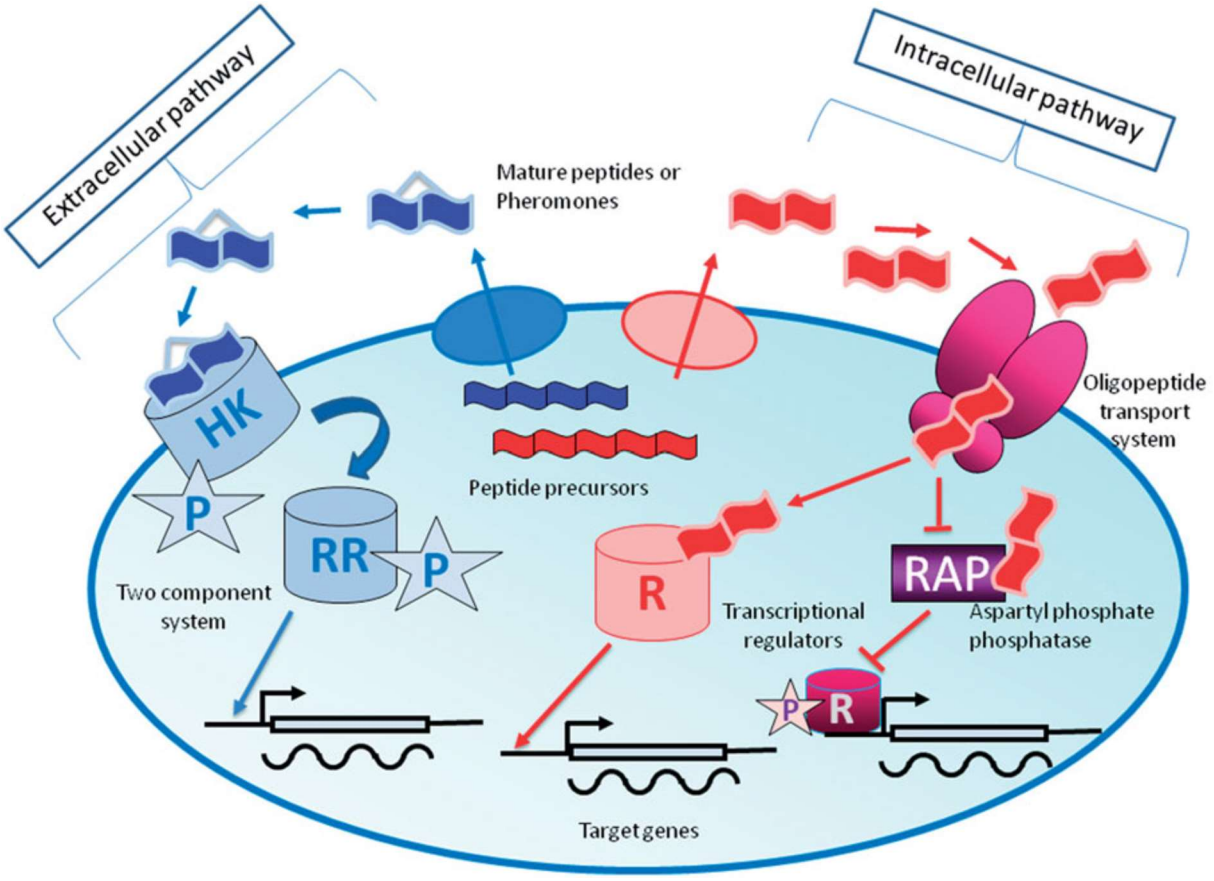

Figure 19 : Représentation schématique des deux systèmes de communication chez les bactéries Gram positives. (Monnet et al., 2014)**.**

Le QS mis en place par les bactéries Gram positives est, tout comme pour les bactéries Gram négatives, spécifique de l'espèce considérée. La spécificité de reconnaissance est liée à la production d'oligopeptides de tailles différentes et qui sont ou non modifiés lors du passage

dans le milieu extracellulaire. Une variété importante d'oligopeptides ayant des fonctions d'AIs a été décrite et est résumée dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Diversité de AIs produits par les bactéries Gram positives. Les cases colorées en bleu correspondent aux peptides impliqués dans un mécanisme extracellulaire, celles en rouge dans un mécanisme intracellulaire. Adapté de (Monnet et al., 2014).

Nom du peptide	Espèces productrices	Origine du peptide	Fonctions contrôlées
AgrD	*Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis*	Courte séquence codante	Virulence Métabolisme Adhérence
LamD	*Lactobacillus plantarum* *Clostridium acetobutylicum* *Listeria monocytogenes*	Courte séquence codante	Sporulation Virulence
Nisin	*Lactococcus lactis*	Courte séquence codante	Production de nisine
Subtilisin	*Bacillus subtilis*	Courte séquence codante	Production de subtilisine
BlpC	*Streptococcus thermophilus*	Courte séquence codante	Production de la bactériocine Blp
Plantaricins	*Lactobacillus plantarum*	Courte séquence codante	Production de la plantaricine
Sakacins	*Lactobacillus sakei*	Courte séquence codante	Production de la sakacine
Camobacteriocins	*Carnobacterium maltaromaticum* *Carnobacterium piscicola*	Courte séquence codante	Production de la carnobactériocine
ComX	*Bacillus subtilis*	Courte séquence codante	Compétence
CSP	*Streptococcus pneumoniae*	Courte séquence codante	Compétence
GBAP	*Enterococcus faecalis*	Courte séquence codante	Gélatinase
ComS	*Streptococcus thermophilus* *Streptococcus salivarius* *Streptococcus mutans* *Streptococcus infatarius*	Courte séquence codante	Compétence

	Streptococcus macedonicus		
PapR	*Bacillus cereus*	Courte séquence codante	Virulence
NprX	*Bacillus thuringiensis* *Bacillus cereus*	Courte séquence codante	Necrotrophisme
Phr	*Bacillus subtilis*	Courte séquence codante	Compétence Sporulation Production d'enzymes
Sex pheromones	*Enterococcus faecalis*	Fragment du peptide signal d'une lipoprotéine	Conjugaison
Sex pheromones inhibitors	*Enterococcus faecalis*	Courte séquence codante	Conjugaison Inhibition
Vfr fragment	*Streptococcus pyogenes*	Fragment de la protéine Vfr	Production de toxines

IV.3 La communication AI-2 dépendante

Le système de QS dépendant des molécules AI-2 est à ce jour le plus répandu au sein du domaine bactérien puisque plus de 500 espèces bactériennes ont la capacité de communiquer par cet intermédiaire (Papenfort & Bassler, 2016). Le précurseur des AI-2, le 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), est le plus souvent synthétisé par l'action de l'AI-2 synthase nommée LuxS. Cette dernière est impliquée dans la voie métabolique de la méthionine **(Figure 20**) (Rezzonico et al., 2012).

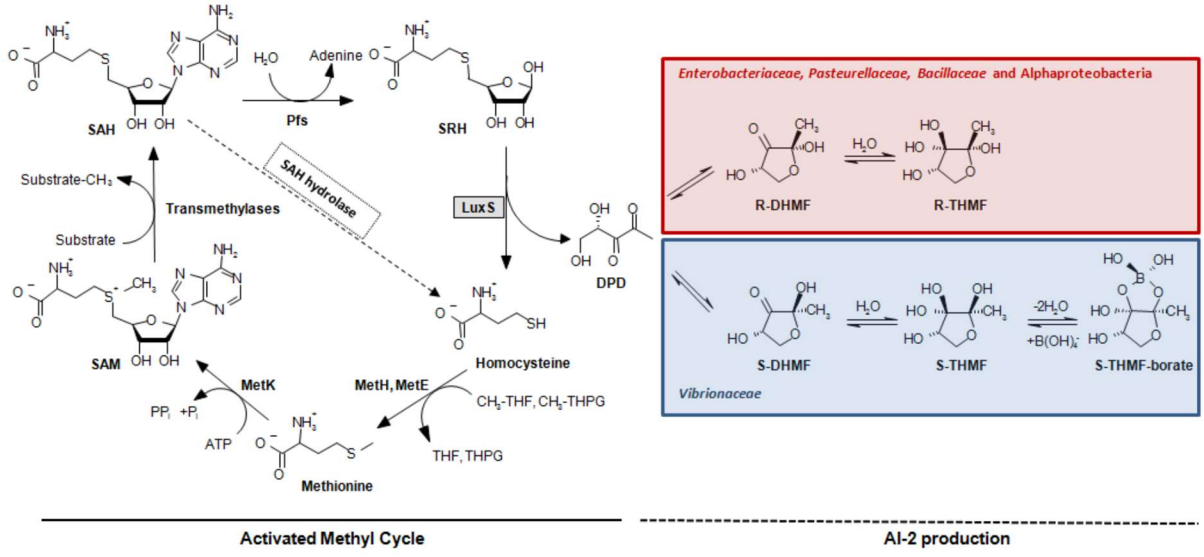

Figure 20 : Représentation de la voie métabolique de la méthionine et de la formation du DPD. SAM : *S*-adenosylméthionine ; SAH : *S*-adénosylhomocystéine ; SRH : *S*-ribosylhomocystéine ; DPD : 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione ; MetK : *S*-adénosylhomocystéine synthase ; Pfs : Adénosylhomocystéine nucléosidase. Adapté de (Rezzonico et al., 2012).

Dans ce cycle, LuxS transforme la *S*-ribosyl-homocystéine (SRH) en homocystéine et en DPD. Ce dernier va alors pouvoir spontanément évoluer sous plusieurs formes comme présenté dans la **figure 21.** Etant donné que plusieurs molécules dérivent du DPD, il a été choisi d'utiliser l'abréviation « AI-2 » et non « l'AI-2 » qui pourrait ne désigner qu'une de ces molécules. En solution, il est fréquent de retrouver un mélange des différentes formes issues du DPD, ce qui a rendu difficile l'identification des molécules responsables de la communication induite par AI-2. Néanmoins, des analyses de cristallographie réalisées au début des années 2000 ont permis de mettre en évidence les formes impliquées dans cette communication. Chez *V. harveyi* Chen et collaborateurs ont montré que le récepteur LuxP est capable de se lier au *S*-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate (*S*-THMF-borate) (Chen et al., 2002). Deux ans plus tard, Miller et collaborateurs ont mis en évidence un nouveau récepteur à AI-2, cette fois-ci chez *Salmonella enterica ssp. enterica* serovar Typhimurium (Miller et al., 2004). Ce récepteur, LsrB, se lie quant à lui au *R*-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran (*R*-THMF).

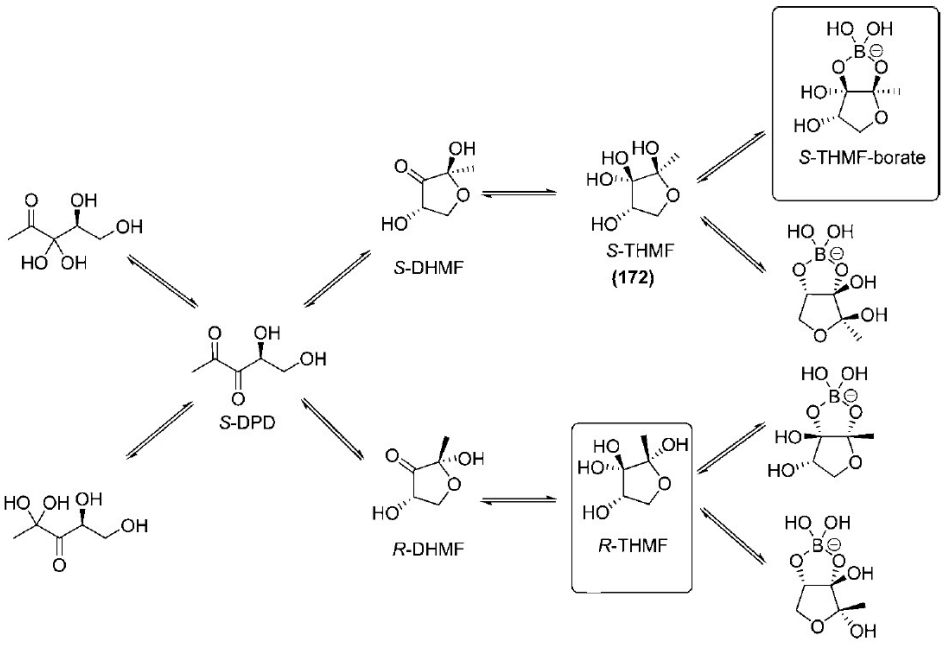

Figure 21 : Présentation des différentes conformations naturellement adoptées par le DPD. Les molécules entourées en noir correspondent aux molécules AI-2 dont l'activité de liaison à un récepteur ont été démontrées (Galloway et al., 2011).

En plus du système de synthèse de AI-2 par la voie métabolique de la méthionine, il a été établi qu'une autre voie de synthèse, indépendante de LuxS, existe (**Figure 22**) (Zhao et al., 2018). Cette dernière, découverte chez des bactéries extrêmophiles, se base sur la transformation de la *S*-adénosylhomocystéine (SAH) en adénosine et homocystéine par l'intermédiaire de la SAH hydrolase. L'adénosine est ensuite convertie en ribose-1-P puis en ribose-5-P. Pour finir, la chaleur va permettre la transformation du ribose-5-P en DPD. Cette découverte permet de penser que la communication AI-2 dépendante est encore plus universelle au sein des bactéries que précédemment imaginé puisque même certaines bactéries dépourvues du gène *luxS* sont capables de produire AI-2.

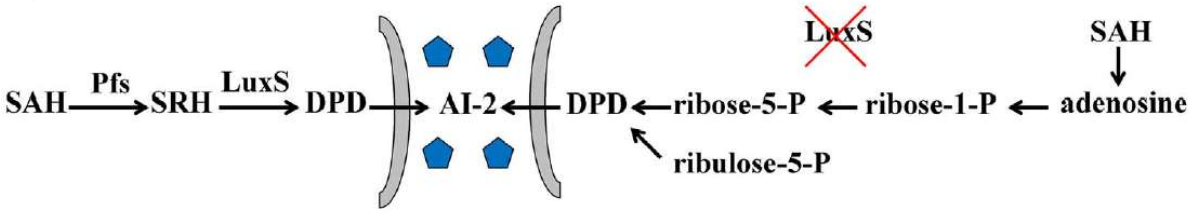

Figure 22 : Représentation des deux systèmes de synthèse d'AI-2, dépendant (à gauche) et indépendant (à droite) de LuxS. (Zhao et al., 2018).

Les effecteurs impliqués dans la réponse à AI-2 varient en fonction de la famille bactérienne considérée et donc du type de récepteur impliqué. Les cascades de transductions des deux classes de récepteurs principaux (LsrB et LuxP) sont présentées dans la **figure 23**. Chez les Enterobacteriaceae, AI-2 (sous la forme *R*-THMF) se lie au récepteur LsrB. La molécule est alors internalisée par l'intermédiaire du complexe protéique Lsr ABCD. La protéine LsrK va alors phosphoryler AI-2, formant AI-2-P qui peut se lier à LsrR. Ce dernier est un répresseur qui, lorsqu'il se lie à AI-2-P, se détache du promoteur de l'opéron *lsr*, permettant l'expression des gènes de l'opéron. De ce fait, les gènes *lsrACDBK*, tous impliqués dans la détection du signal AI-2, sont surexprimés. Par conséquent, l'entrée de AI-2 va entraîner une boucle de régulation positive qui permettra de capter plus de signaux dans le milieu extracellulaire.

Les Vibrionaceae vont, quant à elles, détecter AI-2 sous sa forme *S*-THMF-borate par l'intermédiaire du récepteur LuxP. En absence d'AI-2, la kinase LuxQ (une histidine/aspartate hybride kinase) est phosphorylée, ainsi que ses substrats : la protéine LuxU et la protéine régulatrice LuxO. Cela a pour conséquence d'activer l'expression de petits ARNs régulateurs qui vont inhiber le régulateur transcriptionnel LuxR, réprimant ainsi la transcription des gènes de l'opéron *lux*. En présence d'AI-2, LuxP convertit l'activité kinase de LuxQ en phosphatase,

inversant alors le flux de phosphate. Les petits ARNs ne sont donc plus exprimés ce qui permet l'expression de l'opéron *lux*.

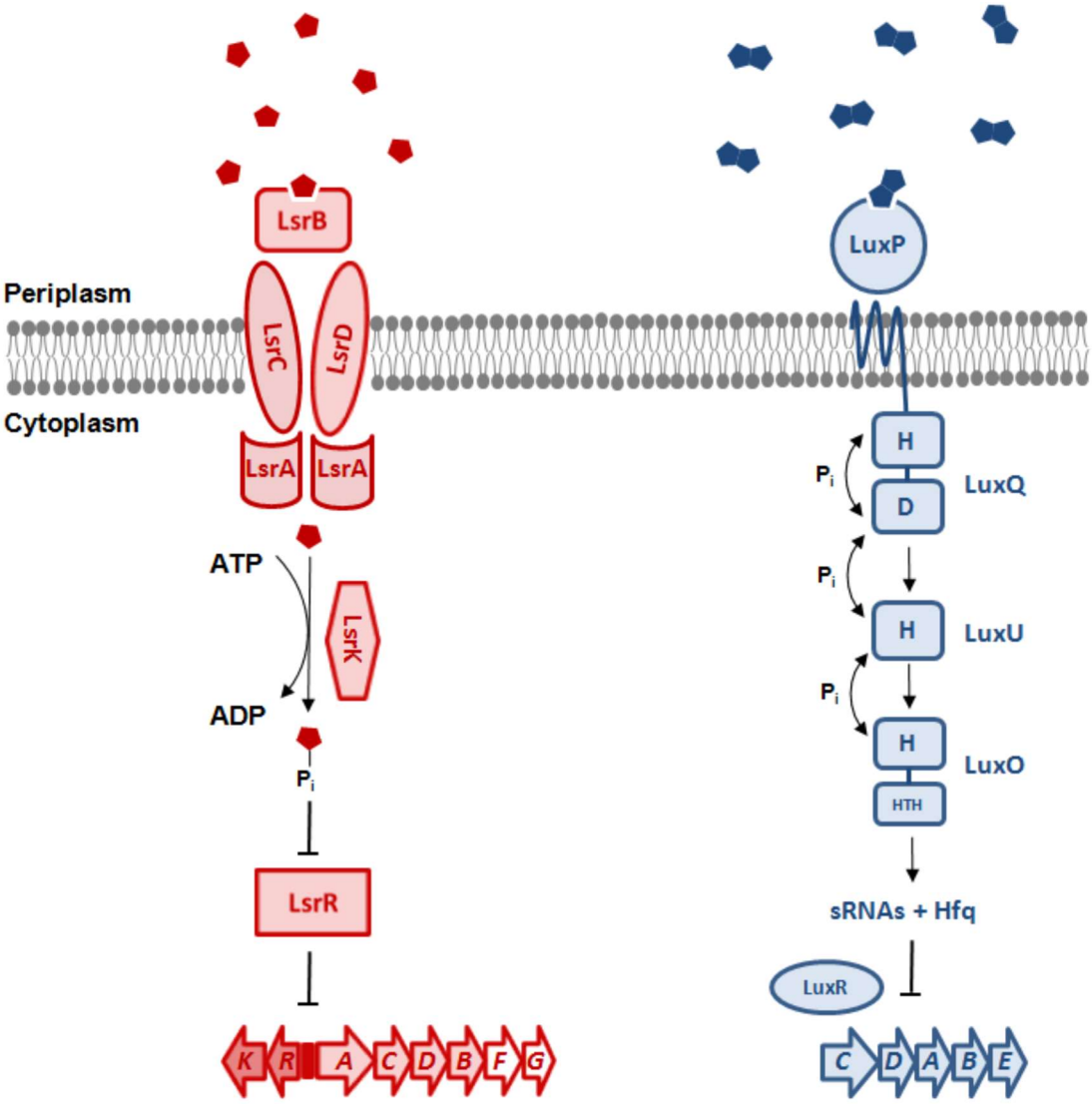

Figure 23 : Les deux principaux récepteurs à l'AI-2 et la transduction du signal associée. Le schéma présente les voies de transduction du signal chez les Enterobacteriaceae (en rouge) et chez les Vibrionaceae (en bleu) (Rezzonico et al., 2012).

Les fonctions régulées par la communication de type AI-2 sont différentes en fonction des espèces et peuvent être extrêmement variées. A titre d'exemple, pour *V. harveyi*, l'induction de LuxR entraîne une modification d'expression de près de cent gènes impliqués dans divers processus tels que l'induction de la bioluminescence, la production de métalloprotéases, le système de sécrétion de type III et d'autres (Pereira et al., 2013). Chez d'autres espèces bactériennes, la communication de type AI-2 peut modifier la virulence Miller et al., 2002), la capacité à former des biofilms (Vidal et al., 2011), la production de toxines (Zhu et al., 2002), la conjugaison (Cho et al., 2003) etc.

La communication AI-2 dépendante présente un intérêt majeur dans l'étude des communautés bactériennes. Il est aujourd'hui établi que ce type d'AI est capable d'entraîner une modification de l'expression de gènes à la fois chez son espèce productrice mais également chez d'autres espèces. Il a de plus été démontré que des espèces dépourvues de la synthase LuxS peuvent tout de même capter les signaux produits par d'autres bactéries (Duan et al., 2003).

En plus d'être impliqué dans la communication intra et inter-espèces, AI-2 permet également des interactions inter-règnes. Il a été montré que des cellules épithéliales intestinales humaines étaient capables de produire un homologue de AI-2. Celui-ci peut se lier au récepteur LuxP de *V. harveyi* et d'induire la bioluminescence de cette dernière de la même manière que lorsqu'elle est stimulée par AI-2 produit par les bactéries (Ismail et al., 2016). D'autre part, Silpe & Bassler ont mis en évidence que AI-2 produit par *V. cholerae* permettait de contrôler le cycle lytique/lysogénique de l'un de ses phages (Silpe & Bassler, 2019). D'autres exemples de ce type d'interactions existent dans la littérature, mettant en avant le rôle central que joue la communication au sein des communautés bactériennes (Mukherjee & Bassler, 2019). En effet, celle-ci permet des échanges d'informations ainsi que des modifications comportementales non seulement chez les différents microorganismes mais également chez les hôtes éventuels abritant ces communautés (Li et al., 2019).

IV.4 Le QS chez les *Borreliella*

Au cours des années 2000, une équipe américaine du Kentucky a mis en évidence la présence d'une LuxS fonctionnelle chez *B. burgdorferi* ss et donc sa capacité à communiquer à l'aide d'un système dépendant de AI-2 (Stevenson & Babb, 2002). Chez cette bactérie, le gène *luxS* est localisé sur un opéron (que l'on appellera « opéron *luxS* » par la suite) contenant 4 gènes au total : *pdeB*, *pfs*, *metK* et *luxS* (**Figure 24**) (Riley et al., 2007; Sultan et al., 2011).

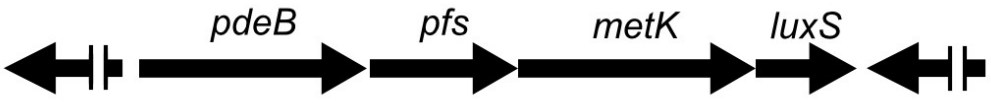

Figure 24 : Organisation génétique de la région du chromosome de *B. burgdorferi* ss contenant l'opéron *luxS*. Adapté de (Riley et al., 2007).

Parmi ces quatre gènes, trois sont impliqués dans la voie métabolique de la méthionine : *pfs*, *metK* et *luxS* (voir **Figure 20 et 25**). Le gène *pdeB* code une GMP cyclique phosphodiestérase cyclique impliquée dans la motilité de la bactérie ainsi que dans sa survie au sein de la tique (Sultan et al., 2011). L'une des particularité de *B. burgdorferi* ss est que la voie métabolique de la méthionine est incomplète, la rendant donc auxotrophe pour cet acide aminé (**Figure 25**) (von Lackum et al., 2006).

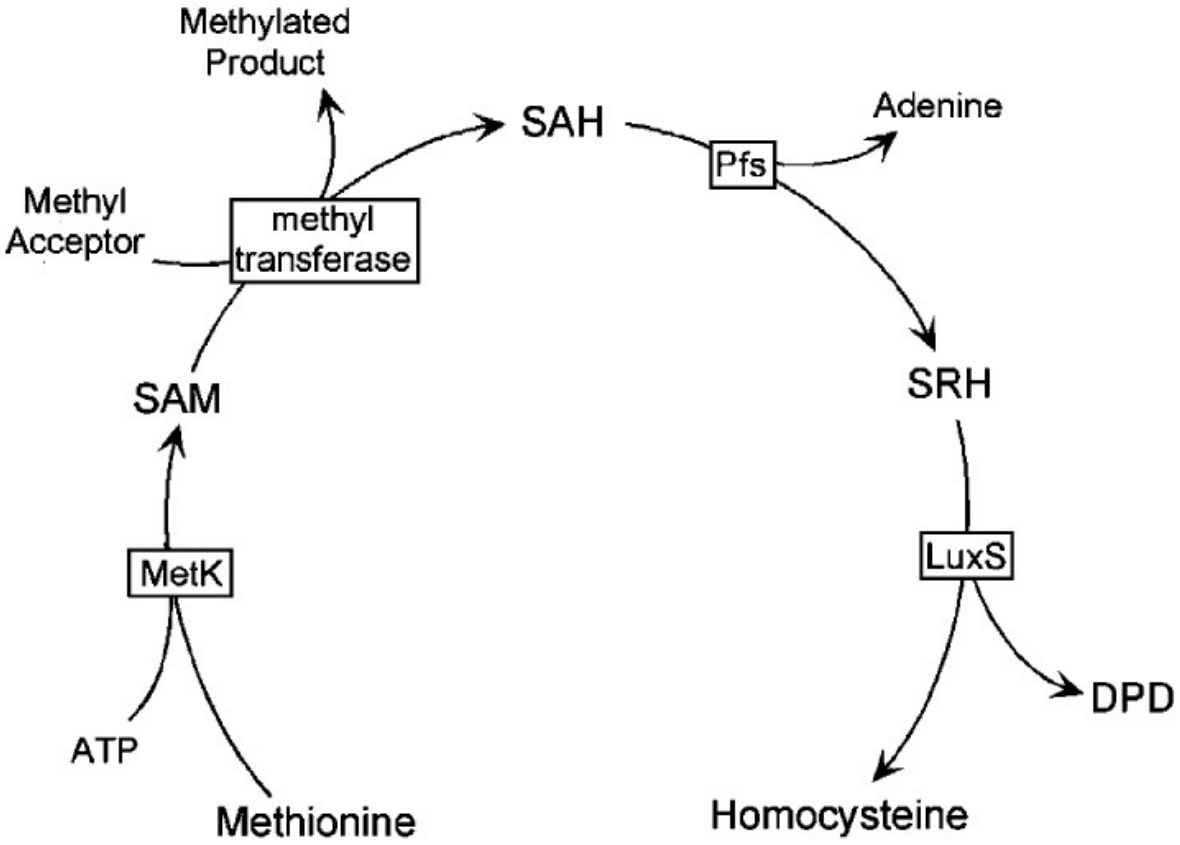

Figure 25 : Voie métabolique de la méthionine chez *B. burgdorferi* ss. (von Lackum et al., 2006)

Le rôle que joue le QS AI-2 dépendant a été exploré, notamment par des comparaisons du contenu en protéines totales par électrophorèse bi-dimensionnelle. Ces analyses ont été réalisées soit par comparaison d'une souche Δ*luxS* avec une souche sauvage, soit par ajout de DPD dans le milieu de culture. Les résultats ont mis en évidence que la communication induite par AI-2 jouait un rôle important dans l'expression de gènes de virulence, notamment *vlsE* et les paralogues des protéines Erp (Babb et al., 2005). Comme cela a été présenté dans les chapitres précédents, les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans la capacité de la bactérie à échapper au système immunitaire de l'hôte et jouent donc un rôle majeur dans sa survie. En revanche, il a également été montré que la délétion du gène *luxS* n'empêchait pas *B. burgdorferi* ss d'infecter des souris en laboratoire lorsque les spirochètes sont

transmises par l'intermédiaire d'une seringue (Hübner et al., 2003). À partir de ce résultat, deux hypothèses principales ont été posées : soit *B. burgdorferi* ss est capable de synthétiser AI-2 à la fois par LuxS et un autre mécanisme (ce qui n'a pas été exploré), soit AI-2 permet uniquement de faciliter l'infection par la bactérie (en stimulant l'expression de facteurs de virulence) sans pour autant être indispensable. Cette dernière hypothèse est appuyée par les résultats d'Arnold et collaborateurs qui ont estimé par qPCR la charge bactérienne d'une souche sauvage et d'une souche Δ*luxS* ayant simultanément infecté des souris (Arnold et al., 2015). Les différences de Ct (cycle threshold) obtenues dans cette étude entre la souche mutante et la souche sauvage varient entre 0,997 et 3,953 en fonction de l'animal et du tissu analysé. Ces résultats montrent là aussi que *luxS* n'est pas indispensable à l'infection mais confère tout de même un avantage majeur. Plus tard, le rôle du QS AI-2 dépendant a également été étudié dans la capacité de *B. burgdorferi* ss à produire des biofilms et dans sa résistance aux antibiotiques (Sapi et al., 2016). Cette étude a mis en évidence la nécessité pour la bactérie d'avoir un gène *luxS* fonctionnel pour développer des mécanismes de défense.

Actuellement, il n'y a que peu de données disponibles dans la littérature quant à la communication chez les *Borreliella*. Le seul système de QS décrit pour ce genre est un système AI-2 dépendant. Toutes les recherches sur ce sujet ont été menées sur *B. burgdorferi* ss, aucune étude n'a exploré la présence, la fonctionnalité et le rôle d'un tel système chez *B. afzelii* et *B. garinii*, bien que ces deux espèces soient majoritaires en Europe.

V. Contexte de l'étude et objectifs

Deux études récentes ont mis en évidence la co-détection d'ADN issu de pathogènes au sein d'un individu d'*Ixodes ricinus* (Moutailler et al., 2016; Raileanu et al., 2017) et ont montré que ces co-détections étaient fréquentes en Europe. Parmi celles-ci, la co-détection qui est la plus souvent reportée dans ces deux études est la présence simultanée de *B. afzelii* et *B. garinii*. Ces dernières sont co-détectées dans environ 4,2% des individus analysés. Il semble ainsi possible de détecter *B. afzelii* et *B. garinii* au sein d'une même tique et ce malgré les différences d'hôtes préférentiels et les tropismes tissulaires différents de ces deux espèces (Rauter & Hartung, 2005). Cela soulève alors l'hypothèse selon laquelle ces deux espèces peuvent co-infecter une même tique et, par conséquent, l'hypothèse selon laquelle elles peuvent être co-transmises à l'hôte suivant. En 2006, Hovius et collaborateurs ont étudié l'impact de la co-transmission de *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* sur l'évolution de la pathologie chez la souris (Hovius et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence qu'une

co-infection d'une souris par *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* aggrave les signes cliniques associés à la pathologie. De plus, à l'issue de l'infection il n'était plus possible d'isoler *B. garinii*. Par conséquent, un effet potentialisant dû à la présence simultanée des deux espèces a pu être observé, bien que *B. garinii* n'ait pas pu être détectée chez l'animal après infection.

Ces constats posent la question des mécanismes qui régissent les éventuelles co-infections de tiques par *B. afzelii* et *B. garinii* et de leur impact sur la santé humaine. En amont de ce projet de thèse, une analyse par alignement de séquence a été réalisée au sein de l'équipe MDE, afin de chercher des homologues du gène *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Cette analyse a mis en évidence que *B. afzelii* et *B. garinii* sont toutes les deux dotées d'un gène *luxS* (homologie nucléotidique d'au moins 94%). Cette observation a alors stimulé la mise en place de ce modèle d'étude au laboratoire, afin d'étudier la fonction du gène *luxS* dans l'interaction entre *B. afzelii* et *B. garinii*.

Les objectifs de cette thèse sont donc d'estimer le taux d'infection de tiques en quête par une ou plusieurs espèces de *Borreliella* mais également d'étudier la présence, la fonctionnalité et le rôle du QS chez *B. afzelii* et *B. garinii*.

Ainsi, dans un premier temps, une campagne de prélèvement de nymphes d'*I. ricinus* au sein de la région Poitou-Charentes a été réalisée afin d'analyser le microbiote bactérien interne de ces dernières par séquençage haut-débit d'amplicons du gène codant l'ARNr 16S. En effet, aucune donnée n'est actuellement disponible quant au taux d'infection des tiques par *B. burgdorferi* sl dans cette région, bien que la Borréliose de Lyme y soit présente (entre 25 et 49 cas pour 100 000 habitants). Cette méthode permet d'estimer le taux d'infections des nymphes d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl, mais également d'avoir une idée du nombre de tiques au sein desquelles plusieurs espèces de *Borreliella* peuvent être co-détectées.

Le second objectif de ces travaux a été d'étudier la fonctionnalité et le rôle des gènes *luxS* de *B. afzelii* et *B. garinii*. Pour cela, le projet a été décomposé en deux sous-parties. La première correspond à la mise en place d'outils moléculaires permettant l'étude de ces deux espèces *in vitro*. La seconde porte sur l'étude de la fonctionnalité de *luxS* et de la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à communiquer par l'intermédiaire de AI-2.

Matériels et Méthodes

I. Culture bactérienne et échantillonnage de tiques

I.1 Souches bactériennes

La liste des souches bactériennes utilisées dans cette étude est présentée dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette étude.

Souche	Caractéristiques	Origine
B. afzelii BO23	Souche sauvage	ATCC 51992
B. burgdorferi B31	Souche sauvage	ATCC 35210
B. garinii CIP103362	Souche sauvage	ATCC 51383
B. afzelii-GFP	*B. afzelii* BO23 transformée avec le plasmide pTM61 et exprimant la GFP	Cette étude
B. afzelii-mCherry	*B. afzelii* BO23 transformée avec le plasmide pBSV2G_P_{flaB}_$mCherry^{Bb}$ et exprimant la protéine mCherry	Cette étude
B. garinii-GFP	*B. garinii* CIP103362 transformée avec le plasmide pTM61 et exprimant la GFP	Cette étude
*E. coli*_AA01	*E. coli* C3030J transformée avec le plasmide pET28b pour l'expression de LsrK	Cette étude
E. coli C3030J	Souche d'*E. coli* spécialisée pour l'expression de protéines recombinantes	NEB C3030J
E. coli DH5α	Souche sauvage	ATCC PTA-1798
E. coli K12	Souche sauvage	ATCC PTA-7555
E. coli M15	Souche d'*E. coli* contenant le plasmide pREP4	Laboratoire EBI
E. coli + pBSV2G_P_{flaB}-$mCherry^{Bb}$	*E. coli* DH5α transformée par le plasmide pBSV2G_P_{flaB}-$mCherry^{Bb}$ pour la réplication du plasmide	Cette étude
E. coli + pQE30_LsrK	*E. coli* M15 transformée avec le plasmide pQE30 portant la séquence codant LsrK	Cette étude

E. coli + pQE70_LsrK	*E. coli* M15 transformée avec le plasmide pQE70 portant la séquence codant LsrK	Cette étude
E. coli + pTM61	*E. coli* DH5α transformée par le plasmide pTM61 pour la réplication du plasmide	Cette étude
E. coli + pTM63	*E. coli* DH5α transformée avec le plasmide pTM63 construit pour générer les mutants Δ*luxS* de *B. afzelii* et *B. garinii*	Cette étude
V. harveyi BB120	Souche sauvage de *V. harveyi*	ATCC BAA-1116
V. harveyi BB170	Souche dérivée de *V. harveyi* BB120 avec le génotype suivant : *luxN::tn5Kan*, empêchant la production de bioluminescence en réponse à AI-1.	ATCC BAA-1117

I.2 Milieux de cultures utilisés

I.2.1 Milieux de culture de *Borreliella*

Les *Borreliella* sont des bactéries auxotrophes pour de nombreux acides aminés et nécessitent par conséquent un milieu de culture riche. Le milieu le plus utilisé pour la culture des bactéries de ce genre est nommé BSK-II (Barbour-Stoenner-Kelly medium) dont la composition a été publiée en 1984 (Barbour, 1984). La composition pour un litre est détaillée ci-dessous :

- CMRL 1066 medium 10X, no glutamine (Gibco, Ref 21540026) : 100 mL
- Neopeptone : 5 g
- Yeastolate : 2 g
- Bovine serum albumin (BSA), Fraction V : 50 g
- HEPES : 6 g
- Glucose : 5 g
- Citrate de sodium : 0,7 g
- Bicarbonate de sodium : 2,2 g
- *N*-acétylglucosamine : 0,4 g

Le pH du milieu a été ajusté à 7,6 avec une solution de NaOH 1N avant stérilisation par filtration (0,22 µm). Après filtration, 60 mL de sérum de lapin inactivés à la chaleur ont été ajoutés au milieu afin d'obtenir une concentration finale de 6%. Le milieu est alors réparti à raison de 45

mL dans des tubes de 50 mL pour être conservé à -20°C. La répartition dans plusieurs tubes permet d'éviter les cycles de congélation/décongélation qui peuvent altérer le milieu de culture. Alternativement, le milieu BSK-H (un dérivé du BSK-II) a également été utilisé pour cultiver les *Borreliella*. La différence majeure entre le BSK-H et le BSK-II est la concentration en albumine sérique bovine (40 g/L dans le BSK-H contre 50 g/L dans le BSK-II). Les autres composés sont présents dans des concentrations similaires dans les deux milieux. Le BSK-H a été acheté chez Sigma-Aldrich sous la référence B8291.

I.2.2 Milieu de culture pour *V. harveyi*

Le milieu *Autoinducer Bioassay* (AB) a été utilisé pour la croissance de *V. harveyi* BB170, utilisé comme biosenseur pour mesurer l'activité d'AI-2 par bioluminescence (Greenberg et al., 1979). La composition pour un litre est détaillée ci-dessous :

- NaCl : 17,9 g
- $MgSO_4$, $7H_2O$: 12,3 g
- Casaminoacides : 2 g
- Glycérol 1% (v/v)

Le pH du milieu est ajusté à 7 par ajout de KOH 10 M puis autoclavé 15 min à 121°C. Les composés suivants sont ajoutés extemporanément à partir de solutions stériles :

- KH_2PO_4 : 10 mM final
- L-arginine : 1 mM final

I.2.3 Milieux de culture pour *E. coli*

Le milieu LB (*Lysogeny Broth*) a été utilisé en routine pour la croissance des souches d'*E. coli*. La composition pour un litre est détaillée ci-dessous :

- Tryptone : 10 g
- Extrait de levures : 5 g
- NaCl : 10 g

Afin d'obtenir un milieu solide, de l'agar bactériologique a été ajouté à 1,5 % final. Le milieu est stérilisé par autoclavage 15 min à 121°C. Lorsque cela était nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés après refroidissement du milieu.

Le milieu SOB (*Super Optimal Broth*) a été utilisé pour la culture d'*E. coli* lors de la préparation de cellules ultra compétentes. La composition pour un litre est détaillée ci-dessous :

- Extrait de levures : 5 g
- Tryptone : 20 g
- NaCl : 0,58 g
- KCl : 0,19 g
- $MgSO_4$: 0,95 g
- NaCl : 1,20 g

Le milieu a alors été stérilisé par autoclavage 15 min à 121°C.

I.3 Croissance d'*E. coli*

Plusieurs souches d'*E. coli* ont été utilisées durant ce projet de thèse. Ces dernières ont principalement servi à la production de plasmides ou la production hétérologue de LsrK. Sauf indication contraire, toute souche d'*E. coli* a été cultivée en milieu LB à 37°C sous agitation à 200 rotations par minutes (rpm). Le suivi de croissance de ces bactéries a été réalisé par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6320D.

I.4 Croissance de *Borreliella*

Les méthodes de culture pour *B. afzelii* et *B. garinii* sont identiques. Avant chaque inoculation, le milieu BSK-II a été décongelé et filtré sur 0,22 µm pour s'assurer de sa stérilité. Les tubes utilisés pour la cuture de *Borreliella* ont généralement été remplis à environ 85 % de leur capacité de volume maximale pour entraîner rapidement des conditions limitées en oxygène. Les cultures ont alors été incubées à 23°C (mimant la température de la tique en quête d'un hôte) ou 33°C (mimant la température interne de la tique au moment du repas de sang) sans agitation. Le suivi de croissance a été réalisé par comptage en microscopie à fond noir (Olympus CX43) sur cellule de Neubauer (Marienfield). La présence éventuelle de contaminants peut être observée par changement de couleur du milieu qui passe de l'orangé au jaune (par l'acidification du milieu) dans les phases précoces de croissance ainsi que par l'apparition d'un dépôt de cellules au fond du tube de culture.

I.4.1 Suivi de croissance de *Borreliella* en monoculture

Afin de suivre la croissance des bactéries en culture, les pré-cultures ont été incubées à 33°C jusqu'à atteindre le milieu de la phase exponentielle de croissance (~$1*10^7$ cellules/mL). Les cellules ont alors été repiquées à une concentration d'environ $2*10^5$ cellules/mL. La concentration cellulaire initiale a été mesurée par comptage. Les cultures ont ensuite été incubées à 33°C. Chaque jour, la concentration cellulaire a été mesurée par comptage et 1 mL de culture a été prélevé et centrifugé 15 min à 10 000 g. Le surnageant a alors été récupéré et filtré sur 0,22 µm. Les surnageants et les culots bactériens récupérés au cours des cinétiques de croissance ont été placés à -20°C ou -80°C jusqu'à utilisation. Les culots conservés à -20°C ont servi à la quantification bactérienne par qPCR (partie II.8 de ce chapitre), ceux conservés à -80°C ont servi au suivi de l'expression des gènes (partie II.11 de ce chapitre) et les surnageants à la mesure de l'activité AI-2 (Partie V de ce chapitre).

I.4.2 Suivi de croissance de *Borreliella* en co-cultures

Pour réaliser le suivi de croissance de *B. afzelii* et *B. garinii* en co-culture, ces deux espèces doivent se trouver initialement dans la même phase de croissance. Pour cela, des repiquages successifs de *B. afzelii* et *B. garinii* en monoculture ont été réalisés afin d'obtenir des cultures le plus synchrones possible. Afin de limiter les pertes de matériel génétique liées aux cultures successives, les bactéries n'ont jamais été repiquées plus de dix fois. Lorsque *B. afzelii* et *B. garinii* en monoculture atteignaient le milieu de la phase de croissance en même temps, elles ont été inoculées dans le même tube de culture. Pour cela, trois rapports bactériens ont été testés : 1 : 1 ; 1 : 3 (1 cellule de *B. afzelii* pour 3 cellules de *B. garinii*) et 3 : 1 (3 cellules de *B. afzelii* pour 1 cellule de *B. garinii*) pour une concentration totale en spirochètes de $4*10^5$ cellules/mL. Le suivi de croissance de ces cultures a ensuite été réalisé de la même manière que pour les cellules en monoculture (Voir I.4.1).

I.5 Préparation des bactéries *E. coli* compétentes et transformation

Au cours de cette étude, les bactéries *E. coli* ont été transformées par divers plasmides afin d'obtenir de grandes quantités de ces vecteurs. Pour cela, des *E. coli* DH5α ont été

rendues ultra compétentes à l'aide du protocole suivant, adapté de celui décrit par Inoue et collaborateurs (Inoue et al., 1990). Pour cela, une pré-culture d'*E. coli* DH5α a été réalisée sur milieu LB gélosé à 37 °C. Une dizaine de colonies ont alors été prélevées pour ensemencer 250 mL de milieu SOB dans un erlenmeyer d'1 L. La culture a été incubée à 18 °C sous agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,6. La culture est placée dans la glace pendant 10 minutes avant d'être centrifugée pendant 10 minutes à 4 000 g, 4 °C. Le culot a ensuite été repris dans 80 mL de solution TB (voir plus bas) et a été laissée sur glace pendant 10 minutes avant d'être centrifugée 10 minutes à 4 000 g, 4 °C. Enfin, le culot a été repris dans 20 mL de solution TB et 1,4 mL de DMSO ont été ajoutés. Les bactéries ont alors été aliquotées par 100 µL avant d'être stockées à -80 °C.

La composition de la solution TB, pour un litre, est la suivante :

- PIPES : 3,02 g
- KCl : 18,63 g
- $CaCl_2$: 2,2 g

Le pH a été ajusté à 6,7 par ajout de KOH 10 M (le $CaCl_2$ n'est pas soluble avant que le pH ne soit ajusté) puis 15 g de $MnCl_2$ ont été ajoutés. La solution a été stérilisée par filtration (0,22 µm) et conservée à 4°C.

Pour la transformation des *E. coli* DH5α ultra compétentes, un aliquot de cellule a été décongelé sur glace. Le volume de plasmide ou de produit de ligation souhaité a alors été ajouté et la solution a été homogénéisée par tapotement avant d'être incubée 10 minutes sur glace. A l'issue de l'incubation, 1 mL de LB préalablement chauffé à 37 °C a été ajouté et la suspension a été incubée à 37 °C pendant 1 heure. Afin de concentrer la suspension, cette dernière a été centrifugée pendant 5 minutes à 10 000 g. Environ 900 µL de surnageant ont alors été retirés et le culot a été resuspendu avec le surnageant restant. Le culot resuspendu a alors été étalé sur le milieu approprié (généralement LB supplémenté en antibiotique). Les cultures ont enfin été incubées à 37 °C.

I.6 Préparation des *Borreliella* électro-compétentes et transformation

Les protocoles de préparation des *Borreliella* électro-compétentes et de transformation de ces dernières ont été adaptés de la publication de (Bontemps-Gallo et al., 2018). Pour commencer, la préparation des cellules compétentes se fait à partir de 50 mL de culture de *B.*

afzelii ou *B. garinii* à une concentration d'environ $1*10^7$ cellules/mL. Les cultures ont alors été centrifugées à 9 600 g pendant 10 minutes à 20 °C. Le culot a ensuite été repris dans 12,5 mL d'EPS froid avant une nouvelle étape de centrifugation à 7 700 g pendant 10 minutes à 10 °C. Le culot a été repris dans 5 mL d'EPS froid avant d'être centrifugé à 7 700 g pendant 20 minutes à 10 °C. Enfin, le culot a été repris dans 125 µL d'EPS froid. Les cellules ont alors été transférées dans un microtube et utilisées directement pour une électro-transformation ou bien conservées à -80 °C, bien que l'utilisation directe soit préférable.

L'EPS (Electroporation solution) est composée de sucrose à une concentration de 93 g/l et de glycérol 15% (v/v). Cette solution est stérilisée par filtration (0,22 µm) puis conservée à 4°C.

Les *Borreliella* compétentes ont alors été transformées en mélangeant 100 µL de cellules compétentes avec 70 µg de plasmide. Ce mélange a ensuite été transféré dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie. Un choc électrique exponentiel (2 500V ; 25 µF et 200 Ω) a alors été appliqué. Dans la minute qui suit, 1 mL de BSK-II préalablement chauffé à 33 °C a été ajouté aux cellules électroporées. Cette solution a ensuite été transférée dans un tube contenant 9 mL de BSK-II avant d'être incubée 24 heures à 33 °C. Après ce temps d'incubation, l'agente de sélection a été ajouté à la concentration désirée.

I.7 Transformation de *B. afzelii* et *B. garinii* pour l'expression de protéines fluorescentes

Le protocole présenté ci-dessus (I.6) a été utilisé pour transformer *B. afzelii* et *B. garinii* avec des plasmides permettant l'expression de protéines fluorescentes. Le plasmide pTM61 nous a été gracieusement fourni par la professeur Georges Chaconas de l'Université de Calgary (Canada). Ce plasmide présente un gène d'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur de *flaB*, un promoteur fort chez *B. burgdorferi* ss. Il présente également une origine de réplication chez *E. coli* et *Borreliella* ainsi qu'un gène permettant la résistance à la gentamycine (**Figure 26**). Pour obtenir de grandes quantités de ce plasmide, *E. coli* a été transformée par ce dernier. Le plasmide produit par *E. coli* a alors servi à la transformation de *B. afzelii* et *B. garinii*. L'agent de sélection utilisé est la gentamycine à une concentration finale de 50 µg/mL.

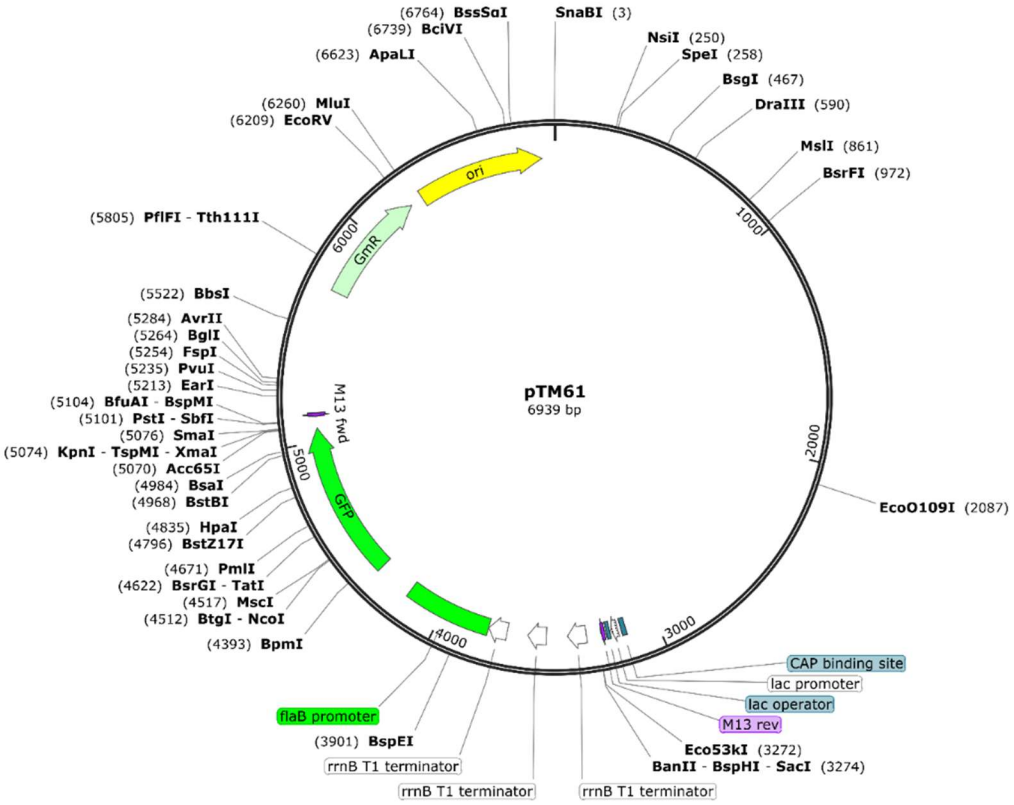

Figure 26 : Carte du plasmide pTM61. Ce plasmide permet l'expression de la GFP, sous le contrôle du promoteur du gène *flaB*, chez *B. burgdorferi* ss (Moriarty et al., 2008).

B. afzelii et *B. garinii* ont également été transformée par le plasmide pBSV2G_P_{flaB}_$mCherry^{Bb}$ Ce plasmide a été développé par Takacs et collaborateurs et permet d'obtenir une fluorescence dans le rouge par l'expression de la protéine mCherry (Takacs et al., 2018). Il contient une origine de réplication chez *E. coli* et *B. burgdorferi* ss, un gène de résistance à la gentamycine ainsi qu'un gène permettant l'expression de la mCherry sous le contrôle du promoteur du gène *flaB* (**Figure 27**). Il a été acheté à la société Addgene (Plasmid #118230).

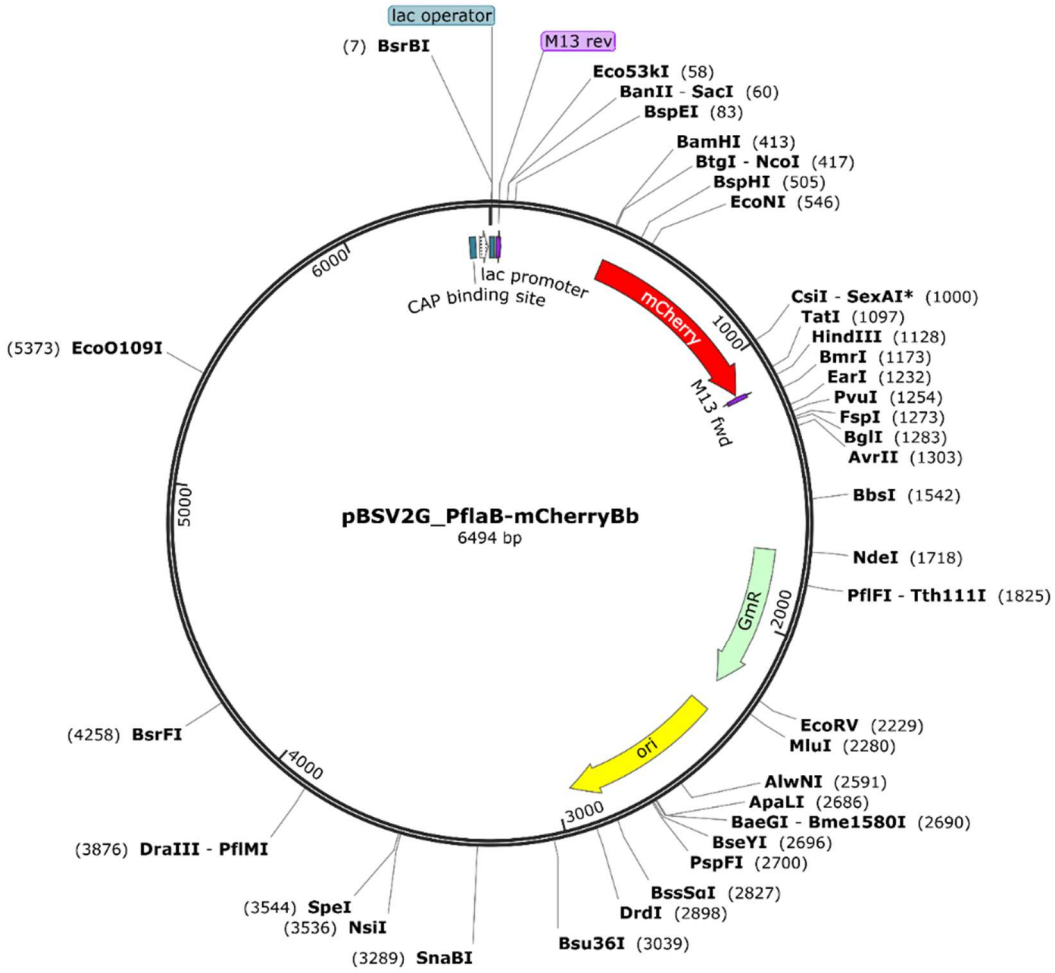

Figure 27 : Carte du plasmide pBSV2G_PflaB_mCherryBb. Ce plasmide permet l'expression de la mCherry, sous le contrôle du promoteur du gène *flaB*, chez *B. burgdorferi* ss (Takacs et al., 2018).

I.8 Echantillonnage et traitement des tiques

Des nymphes d'*I. ricinus* en quête ont été collectées en juin 2019 sur quatre sites en Poitou-Charentes (France) : Bignoux (46°36'24'' N, 0°28'14'' E), Lezay (15°57'12'' N, 0°54'12''W), Hiesse (46°2'14'' N, 0°36'17'' E) et Tonnay-Charente (15°57'12'' N, 0°54'12'' W). Tous les sites d'échantillonnage sont situés dans un rayon de 67 km. Les tiques ont été collectées par la méthode du drapeau (« *dragging* ») avec un morceau de tissu blanc d'1m² attaché à un bâton et traîné sur la végétation à l'aide d'une corde. La collecte a été réalisée à chaque lieu de prélèvement sur 20 transects de 10 m, les transects étant espacés de 10 à 15 m. Environ 100 individus ont été collectés sur chaque site, ramenés au laboratoire dans des

tubes de 50 mL stériles et gardés en vie à température ambiante. Chaque tique a été examinée sous un stéréomicroscope Wild Heerbrugg M3 (Leica) et identifiée en utilisant des critères morphologiques (Pérez-Eid, 2007) avant lavage. La faune cuticulaire, qui inclut des bactéries et de l'ADN exogène, a été éliminée en suivant un protocole basé sur l'utilisation de l'eau de javel décrit en détail dans une autre étude (Binetruy et al., 2019). Rapidement, les tiques ont été plongées individuellement pendant 30 s dans une solution d'eau de javel commerciale diluée à une concentration finale de 1%. Les tiques ont alors été rincées trois fois dans des bains d'eau ultra-pure successifs pendant 1 min. Immédiatement après le dernier bain, les tiques ont été stockées individuellement dans des tubes stériles d'1,5 mL remplis avec de l'éthanol 70% et stockées à -20°C avant l'extraction d'ADN.

II. Biologie moléculaire

II.1 Extraction d'ADN génomique

Plusieurs expérimentations au cours de la thèse ont nécessité l'extraction d'ADN génomique. Pour cela, le kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. Brièvement De cette manière, les extractions d'ADN total issu des nymphes d'*Ixodes ricinus* mais aussi des cultures de *B. afzelii* et *B. garinii* en milieu BSK-II ont été réalisées. Les ADN extraits ont été utilisés directement ou conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

II.2 Extraction d'ADN plasmidique

Les extractions de plasmides ont été réalisées à partir de cultures d'*E. coli* transformés avec divers plasmides. Tous les plasmides utilisés dans cette étude sont des plasmides à haut nombre de copies. Lorsqu'une faible quantité de plasmide était nécessaire, les plasmides présents dans 10 mL de culture ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel). Lorsque des quantités de plasmides plus importantes étaient nécessaires (pour la transformation des *Borreliella* par exemple), les plasmides ont été purifiés en utilisant le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) à partir de 250 mL de culture. La concentration des ADN plasmidiques purifiés a été mesurée par spectrophotométrie d'absorption à 260 nm

à l'aide d'un NanoDrop (Thermo Scientific). Les rapports 260/280 nm et 260/230 nm ont également été calculés afin de vérifier la qualité des extractions des acides nucléiques.

II.3 Extraction d'ARN et transcription inverse

Des extractions d'ARN ont été réalisées sur *B. afzelii* et *B. garinii* cultivées en milieu BSK-II. Pour cela, les cultures ont été centrifugées pendant 10 minutes à 10 000 g. Le surnageant a alors été éliminé et le culot a été repris dans 1 mL de TRIzol (Invitrogen). Cette suspension a ensuite été transférée dans un tube de lyse contenant des billes de verre de 0,1 mm et de 2 mm de diamètre. Une lyse mécanique a alors été réalisée à l'aide d'un FastPrep-24 (MP Biomedicals) selon le cycle suivant : 45 secondes à vitesse 6,5 suivi de 5 min sur glace. Ce cycle a été répété une seconde fois pour s'assurer d'une lyse complète des cellules. Les tubes de lyses ont été centrifugés pendant 5 minutes à 8 000 g à 4 °C. Le lysat a ensuite été transféré dans un microtube avant d'ajouter 200 µL de chloroforme. La solution a alors été agitée vigoureusement (sans utiliser de vortex) avant d'être incubée 10 min à température ambiante. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 13 000 g à 4 °C. A l'issue de la centrifugation, la phase supérieure a été récupérée, en prenant soin de ne pas toucher la phase intermédiaire, et transférée dans un microtube. 500 µL d'isopropanol ont alors été ajoutés afin de faire précipiter l'ARN. La solution a été homogénéisée par agitation avant d'être incubée 10 minutes à température ambiante. La solution a alors été centrifugée pendant 10 minutes à 13 000 g, 4 °C. Le surnageant a alors été éliminé et le culot a été lavé par 500 µL d'éthanol 70% glacé avant une nouvelle étape de centrifugation pendant 10 minutes à 13 000g, 4 °C. L'étape de lavage à l'éthanol a été répétée une seconde fois. Après le second lavage à l'éthanol, le surnageant a été éliminé et les tubes ont été laissés ouverts afin de laisser l'éthanol s'évaporer jusqu'à élimination totale. Pour finir, les culots ont été resuspendus dans 50 µL d'eau DEPC.

Pour la préparation de l'eau DEPC, de l'eau ultrapure a été traitée par du diéthylpyrocarbonate à 0,1% (v/v) final. La solution est placée en incubation à 37°C pendant une nuit avant d'être autoclavée 15 min à 121°C.

La quantité d'ARN a été mesurée par spectrophotométrie d'absorption à l'aide d'un NanoDrop (Thermo Scientific). La pureté des ARN extraits a également été mesurée en calculant les rapports d'absorbance 260/280 nm et 260/230 nm. Lorsque ces rapports étaient hors gammes (à savoir un rapport 260/280 nm inférieur à 1,8 ou supérieur 2,2 et un rapport 260/230 nm inférieur à 1,6) un protocole additionnel de repurification de l'ARN a été appliqué.

Pour cela, le volume total des échantillons élués a été complété par de l'eau DEPC à 500 µL final. A cette solution 50 µL d'acétate de sodium 3M, pH 5,5 et 500 µL d'isopropanol ont été ajoutés. La suite du protocole correspond à celui décrit ci-dessus à la différence près que toutes les étapes de centrifugation ont été réalisées à température ambiante. La quantité et la pureté des ARN repurifiés ont été mesurées comme décrit précédemment.

Les échantillons utilisés pour l'analyse de l'expression de gènes spécifiques ont subi un traitement supplémentaire pour éliminer les éventuelles traces d'ADN contaminant. Pour cela, le kit TURBO DNA-free (Invitrogen) a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. Le kit GoScript Reverse Transcriptase (Promega) a ensuite été utilisé pour réaliser la transcription inverse des ARN en ADN complémentaires (ADNc). A cette étape, la quantité d'ARN utilisée pour chaque condition a été normalisée à 50 ng. Ces échantillons ont par la suite été utilisés dans les analyses par PCR et qPCR.

II.4 Extraction d'ADN à partir d'individus d'*I. ricinus*

Quarante-cinq nymphes d'*I. ricinus* par site d'échantillonnage ont été individuellement broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Pour éviter les contaminations croisées entre échantillons, le mortier et le pilon ont été nettoyés par lavage à l'eau de javel commerciale. Après broyage, les tissus ont été transférés dans des tubes stériles pour l'extraction d'ADN. Le mortier et le pilon ont été rincés avec le premier tampon du kit d'extraction d'ADN pour limiter la perte de tissus. Des contrôles négatifs de broyage ont été réalisés en appliquant cette méthode mais sans tiques. L'ADN de tous les échantillons a ensuite été extrait en utilisant le kit DNeasy Blood&Tissue (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. Des contrôles négatifs d'extractions ont été réalisés en utilisant uniquement les réactifs du kit.

II.5 Extraction d'ARN pour l'étude du rôle de la température sur l'expression des gènes de *B. afzelii* et *B. garinii*

Au cours de cette thèse, une analyse du rôle de la température sur l'expression des gènes de *B. afzelii* et *B. garinii* a été réalisée. Pour cela, des pré-cultures de *Borreliella* ont été incubées à 23°C jusqu'à atteindre une concentration d'environ 3-5*10^7 cellules/mL, ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle/début de phase stationnaire de ces deux espèces. Une fois cette phase atteinte, les bactéries ont été ensemencées dans deux tubes de 13 mL de BSK-II à une concentration de 1*10^5 cellules/mL. Le premier tube a été incubé à 23°C tandis que l'autre a été incubé à 33°C. La croissance des *Borreliella* a été suivie quotidiennement par comptage sur cellule de Neubauer. Lorsque les bactéries ont atteint la fin de la phase exponentielle/début de phase stationnaire, l'ARN a été extrait selon le protocole décrit précédemment (voir partie II.3). Les échantillons d'ARN ont ensuite été envoyés à l'institut du cerveau et de la moëlle épinière à Paris (ICM, https://igenseq.institutducerveau-icm.org/) qui a réalisé la ribodéplétion et un séquençage en 2*150 bp par la technologie Illumina Novaseq.

II.6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La méthode de PCR a servi pour diverses applications tout au long de ces travaux de thèse. En fonction de la fidélité de la polymérase nécessaire, deux protocoles différents ont été utilisés, faisant intervenir des polymérases différentes.

II.6.1 PCR réalisée avec la polymérase GoTaq G2

La polymérase GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega) est une polymérase de fidélité standard qui permet d'amplifier à la fois des fragments de grande et de petite taille. Lors de l'utilisation de cette polymérase, le mélange pour les réactions de PCR qui a été utilisé est le suivant (pour un volume final de 25 µL) : GoTaq Flexi Buffer (Concentration finale de 1X), $MgCl_2$ (concentration finale à 4 mM), mélange de nucléotides (dNTPs, concentration finale

à 0,2 mM de chaque dNTP), amorce sens (concentration finale de 0,5 µM), amorce antisens (concentration finale de 0,5 µM), GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Concentration finale de 0,025 U), 2,5 µL d'ADN ou d'ADNc, eau ultra-pure.

Les amplifications ont été réalisées selon le programme PCR suivant : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes puis 40 cycles d'amplification comme suit : dénaturation à 94°C pendant 10 secondes, hybridation à 56°C pendant 10 secondes et élongation à 72°C pendant 1 minute. Pour finir, une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes a été réalisée. Lorsque cela a été possible, la température d'hybridation optimale des amorces utilisées dans cette thèse a été fixée à 56°C. Ainsi, dans la majorité des cas, les PCR ont été réalisées selon le protocole décrit ci-dessus. Cependant, pour certains couples d'amorces, la température d'hybridation a dû être adaptée. Les températures optimales d'hybridation des couples d'amorces seront indiquées dans la suite de ce manuscrit si elles diffèrent de 56°C

II.6.2 PCR réalisée par la polymérase Q5

La polymérase Q5 (NEB) est une polymérase haute-fidélité permettant d'amplifier l'ADN en limitant les erreurs lors de l'étape d'élongation. Elle a principalement été utilisée ici pour les expériences de clonage et pour l'étude de la diversité bactérienne des nymphes d'*I. ricinus*. Le mélange qui a été utilisé pour l'amplification à l'aide de la polymérase Q5 est constitué, pour 40 µL, de : Q5 reaction buffer (concentration finale de 1X), dNTPs (concentration finale de 0,2 mM de chaque dNTP), amorce sens (concentration finale de 0,5 µM), antisens (concentration finale de 0,5 µM), Q5 DNA polymérase (concentration finale de 0,02 U), 5 µL d'ADN et de l'eau ultra-pure.

Les amplifications ont été réalisées selon le programme PCR suivant : une étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 5 min puis 35 cycles comme suit : une étape de dénaturation à 98 °C pendant 15 secondes, une étape d'hybridation à 64°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72 °C pendant 1 minute. Enfin, une étape d'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 minutes. La température d'hybridation de 64°C a été utilisée pour l'ensemble des amplifications relatives aux clonages. Cependant, elle a été adaptée (56°C) pour le couple d'amorce U341F – Bakt_805R, ayant servi à l'étude de la diversité bactérienne d'*I. ricinus*.

II.7 Séparation des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier les amplifications obtenues après les étapes de PCR, les amplicons ont systématiquement été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour cela, des gels d'agarose ont été réalisés à 1 ou 2% d'agarose final en fonction de la taille attendue des amplicons. Plus le fragment est long, plus la concentration en agarose doit être faible. Ces solutions ont été préparées dans un tampon TBE 0,5 X (45 mM Tris, 45 mM Borate, 1 mM EDTA, pH 8,3). La dissolution de l'agarose dans le tampon TBE a été réalisée en chauffant la solution. Une fois que la totalité de l'agarose a été dissout, entre 4 et 6 µL de Midori Green (Dutscher) pour 100 mL de solution ont été ajoutés pour marquer les acides nucléiques. Le Midori Green est une alternative non-carcinogène au bromure d'éthidium. La migration a été réalisée à 100V pendant 30 à 35 minutes et les gels ont ensuite été visualisés par exposition aux ultraviolets à l'aide d'un ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

II.8 Réaction de PCR quantitative (qPCR)

La qPCR a été réalisée à l'aide du kit Takyon No ROX Probe 2X MasterMix Blue dTTP (Eurogentec) qui permet de réaliser une quantification à l'aide de Sybr Green. Pour chaque réaction de qPCR (10 µL final), le mélange est le suivant : 2 µL d'échantillon, 5 µL de MasterMix (Concentration finale de 1X), 0,3 µL d'amorce sens (concentration finale de 0,3 µM), 0,3 µL d'amorce antisens (concentration finale de 0,3 µM) et de l'eau ultra-pure. Les échantillons ont été amplifiés et analysés à l'aide d'un LightCycler 480 (Roche). Le protocole d'amplification utilisé est le suivant : Une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes puis 45 cycles d'amplification comme suit : une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 secondes, une étape d'hybridation à 56°C pendant 10 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 10 secondes au cours de laquelle l'acquisition de la fluorescence est réalisée. Pour finir, un courbe de fusion a été réalisée. Pour cela, un gradient de température (de 65°C à 94°C) a été réalisé avec une acquisition continue de la température (5 acquisitions/°C). La courbe de fusion ainsi obtenue permet de s'assurer de la présence d'un seul amplicon dans les échantillons et donc qu'il n'y ait pas d'amplification non spécifique. Les résultats de qPCR ont été analysés par la méthode de la dérivée seconde.

II.9 Amplification par PCR et séquençage haut-débit pour l'analyse de diversité bactérienne interne des nymphes d'*I. ricinus*

Un fragment de 464 pb couvrant la région variable V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S a été amplifié par PCR en utilisant les amorces U341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') (Baker et al., 2003) et Bakt_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011). Ces amorces ont été sélectionnées pour le fort taux de couverture des séquences du gène de l'ARNr 16S (Perrin et al., 2019). La PCR a été réalisée en utilisant l'ADN polymérase haute-fidélité Q5 (New England Biolabs) avec le tampon Q5 (1X final), 0,5 µM de chaque amorce, des dNTPs (0,2 mM de chaque) et 5 µL d'ADN dans une volume final de 40 µL. L'amplification a été réalisée comme suit : Une étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 5 min, puis une dénaturation à 98°C pendant 30 s, hybridation à 56 °C pendant 30 s, élongation à 72 °C pendant 30 s pour un total de 30 cycles, suivi d'une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 5 min. Pour chaque expérience d'amplification, des contrôles négatif (eau ultra-pure) et positif (ADN extrait comme décrit précédemment à partir d'une culture sur la nuit de *P. aeruginosa* PA14 cultivée dans du milieu LB à 37 °C sous agitation à 180 rpm) ont été inclus. Les produits de PCR ont été analysés par migration sur gel d'agarose 1% et purifiés à l'aide du Kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Des témoins de purification sans produits de PCR ont été réalisés comme contrôles négatifs. La quantification d'ADN a été réalisée à l'aide d'un fluoromètre Qubit 2.0 (Invitrogen). Pour tous les amplicons PCR, la librairie a été construite et séquencée par la plateforme de génotypage et de séquençage de l'institut du cerveau et de la moëlle épinière de Paris (ICM, https://igenseq.institutducerveau-icm.org/) en utilisant une technologie Illumina MiSeq single-end 1 x 500-pb. Toutes les données brutes ont été déposées sur l'archive « Sequence Read Archive » du NCBI sous le numéro « BioProject ID PRJNA727936 ».

II.10 Expression des gènes de l'opéron *luxS*

Afin de vérifier l'expression des gènes de l'opéron *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*, une RT-PCR a été réalisée. Pour cela, les échantillons d'ADNc obtenus après extraction d'ARN, traitement à la DNAse et transcription inverse (voir II.3), ont été amplifiés par PCR selon le protocole décrit dans la partie II.6.1. Pour chacune des deux espèces, les gènes *pdeB*, *pfs*, *metK* et *luxS* ont été amplifiés. De plus, la structure opéronique de ces quatre gènes a été

vérifiée en utilisant des amorces permettant l'amplification des régions intergéniques entre *pdeB* et *pfs*, entre *pfs* et *metK* et entre *metK* et *luxS*. Les amorces utilisées pour ces amplifications sont présentées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des gènes pdeB, pfs, metK et *luxS* et de leurs régions intergéniques.

	B. afzelii		*B. garinii*	
Cible	Nom	Séquences 5' –> 3'	Nom	Séquences 5' –> 3'
pdeB	PDE1_F	AGTTCTTCGTCAGTTAATGCCTC	PdeB_G_F	TAGTTTGCAGAAAGCTTGGG
	PDE2_R	AGCCCTTGGTAATGAAATGGGA	PdeB_G_R	GACATTATGCCCACTGTCAA
pfs	PFS1_F	TCATAGTATGCTGCTTGTGAGGA	PFS_G_F	GTGGCAAATTAGGGACTTGT
	PFS2_R	TCTGGAAGTTCTGGCGGAAT	PFS_G_R	TAGTGTCCTCAGAAACAGCA
metK	METK1_F	TATGCTCCTCCTCCGTGTCT	METK1_F	TGTAATTGGAGGACCTACCG
	METK2_R	TGTAATTGGCGGACCTACCG	METK3_R	TAGTTTGCAGAAAGCTTGGG
luxS	LuxS_A_F	CCCAAAAATTATTAAGTAAAAACCA	LuxS_G_F	CCCAAAAATTATTAAGTAAAAACCA
	LuxS_A_R	CACTTTGCTTAGAAATAATGAAGTTT	LuxS_G_R	CACTTTGCTTAGAAATAATGAAGTTT
pdeB à *pfs*	PPA_F	GTTGCTGCGTTAACTTTTCC	PPG_F	ACCTTTCCAATTCCTGTAGTT
	PPA_R	AGCCCAAATCTCCCATACAT	PPG_R	AGACAAAAATGAGCCTATCGT
pfs à *metK*	MPA_F	CTGGATGTCCTTCAGATACAG	MPG_F	CATCAAGGATTGCATCGGAG
	MPA_R	CAATAGCTCAAGTAGCACAC	MPG_R	GCAATAGCTCAAGTGGCAT
metK à *luxS*	LMA_F	GCTGCGTTTTCAATTATTGGT	LMG_F	AGACATATATGCCGGGGTTT
	LMA_R	TTGATTTAACTCCCAACGGT	LMG_R	CGATTTAACTCCCAACGGTA

II.11 Suivi de l'expression des gènes de l'opéron *luxS*

Afin d'estimer dans quelle phase de croissance l'expression des gènes de l'opéron *luxS* est la plus importante chez *B. afzelii* et *B. garinii*, un suivi de l'expression de ces gènes a été réalisé au cours de la croissance des bactéries. Pour cela, l'ARN de chaque espèce a été extrait à différents temps d'incubation. La quantité d'ARN a alors été normalisée à 50 ng pour chaque échantillon avant l'étape de transcription inverse. Après cette étape, les échantillons ont été dilués au demi avant d'être analysés par qPCR (voir II.8). Les couples d'amorces utilisés pour mesurer l'expression relative des gènes de l'opéron *luxS* sont donnés dans le **Tableau 7**.

Pour estimer l'expression relative des gènes de l'opéron *luxS*, le gène *flaB* a été amplifié et utilisé comme gène de référence. Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *flaB* par qPCR sont les suivantes :

B. afzelii :

- Fla 5 (Sens) : 5' – TGTTGGTTGCTGAGCTCCTT - 3'
- Fla 6 (Antisens) : 5' – TGGGAGCAAATCAAGATGAAGC – 3'

B. garinii :

- Fla 7 (Sens) : 5' – TGCTGGTTGTTGAGCTCCTT - 3'
- Fla 6 (Antisens) : 5' – TGGGAGCAAATCAAGATGAAGC – 3'

Les expressions relatives ont alors été calculées par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pour laquelle le gène de référence est *flaB* et la condition de référence est l'expression pour le temps de culture le plus précoce.

II.12 Suivi de croissance des *Borreliella* par qPCR

Afin de suivre la croissance simultanée de *B. afzelii* et *B. garinii* en culture, une méthode de qPCR permettant de discriminer les deux espèces a été mise en place.

II.12.1 Analyse *in silico* pour la génération d'amorces discriminantes

Pour chaque espèce, plusieurs gènes candidats ont d'abord été sélectionnés sur la base de l'étude de Margos et collaborateurs (G. Margos et al., 2008). Les gènes potentiels (**Tableau 8**) sont présents en une seule copie sur le génome des deux espèces. Les séquences nucléotidiques de chacun de ces gènes ont été extraites de la base de données du NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) pour *B. afzelii* BO23 et *B. garinii* CIP 103362. Les séquences nucléotidiques des gènes de chacune de ces espèces ont été alignées deux à deux à l'aide de l'algorithme MUSCLE implémenté dans le logiciel Mega-X (Edgar, 2004). Sur la base de l'alignement de ces séquences, des différences nucléotidiques ont été recherchées manuellement afin de dessiner des amorces spécifiques. La liste des amorces est donnée dans le **Tableau 8.**

Tableau 8 : Couples d'amorces utilisés pour la méthode de quantification discriminante par qPCR.

	B. afzelii		*B. garinii*	
Cible	Nom	Séquences 5' –> 3'	Nom	Séquences 5' –> 3'
clpA	CLPA_A_F	TCAGGTTATGGCAGTGAATTA	CLPA_G_F	GCCTGATTTTGACGACACTT
	CLPA_A_R	TTTGATCTGGCTTATCACGA	CLPA_G_R	CATAACAATGCAGGCTCGTA
nifS	NIFS_A_F	ATTTGCAAGATTTGCCCACGGG	NIFS_G_F	TTTTGCAAGCTTTGCCCATGGC
	NIFS_A_G	TTCTGTTGCAAACTCATTTTTTTACT	NIFS_G_R	CACCATCGCAAGCTCATTTT
ospC	OSPC_A_F	GGTCATGCAGATCTTGGC	OSPC_G_F	ACAGCGCATTGTTAGCAG
	OSPC_A_R	GACTTTCTGCTACAACAGGG	OSPC_G_R	CAAGAGAAGCACCATTCTGT
pepX	PEPX_A_F	ATCTACTAGATAATAACCCTACCCCTT	PEPX_G_F	ATCCACACAAGCAATAATAAAAA
	PEP_A_R	GTGTGCGCTTGCTATTAGAAAC	PEPX_G_R	AGATGCATATCCTGGATGAATG
pyrG	PYRG_A_F	TCCTTTTGTTCGGGAAGTAAAT	PYRG_G_F	CTAAATTTTCCTCTGTATCAGCATC
	PYRG_A_R	GAATAATATTCCCTTTCTTGGAATT	PYRG_G_R	AGGTAAAATTATTGCTATTAAATATGCTC
recA	RECA_A_F	ATCAAGCAAAGAGGAAGCTG	RECA_G_F	ATGTTTGGCAATCCAGAGAC
	RECA_A_R	TTTCTATTATGCGCCCCCTA	RECA_G_R	CTTTACGAAAAGGTGGAGCA
rpoB[1]	RPOB_A_F	CGTTTCTCCTAGACAATTAATCTCA	RPOB_G_F	TGTCTCCCCTAGGCAGCTAAT
	RPOB_A_R	GCCAGTACCAACAATTGGGG	RPOB_G_R	TGTGCCAACAATCGGGG
flaB[2]	FLA 8F	TTGGAGCAAACCAAGATGAAGC	FLA 8F	TTGGAGCAAACCAAGATGAAGC
	FLA 9R	TGCTGGCTGTTGAGCTCCTT	FLA 9R	TGCTGGCTGTTGAGCTCCTT

Le gène *rpoB* ([1]) n'était pas inclus dans l'étude de Margos et al. (2008). Le gène *flaB* ([2]) a été inclus dans le but de quantifier à la fois *B. afzelii* et *B. garinii*, notamment pour les expérimentations de co-cultures.

II.12.2 Validation expérimentale des couples d'amorces

Les couples d'amorces présentés dans le **Tableau 8** ont été utilisés pour amplifier l'ADN génomique de *B. afzelii* et *B. garinii* selon le protocole de PCR décrit dans la partie II.6.1. Les amplicons ont été analysés par migration sur gel d'agarose à 2%. Les couples d'amorces dont les résultats sur gels d'agarose ont montré une amplification spécifique ont été analysés par qPCR (Partie II.8). Pour cette étape, la matrice d'ADN utilisée était issue soit de monocultures, soit de co-cultures. La spécificité des amorces pour une espèce a été estimée par l'analyse des courbes de fusion réalisées à la fin du cycle d'amplification. Les couples d'amorces ont été considérés comme discriminants, et donc valides, si : (i) le couple d'amorce permettait une amplification de l'ADN issu de la culture pure de l'espèce d'intérêt ; (ii) le couple d'amorce ne produisait pas d'amplification sur l'ADN issu de la culture pure de l'autre espèce ;

(iii) une seule température de fusion était reportée après amplification de l'ADN issu des monocultures et des co-cultures.

II.12.3 Vérification de l'efficacité des couples d'amorces

Enfin, l'efficacité des couples d'amorces permettant une amplification spécifique a été vérifiée. Pour cela, de nouveaux couples d'amorces ont été dessinés. Ces derniers permettent l'amplification complète des gènes *clpA* de *B. afzelii* et *B. garinii*, *nifS* de *B. afzelii* et *rpoB* de *B. garinii*. Ces couples d'amorces sont présentés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification de la totalité de la séquence codante des gènes d'intérêt pour l'étude de l'efficacité.

Cible	Nom	Séquence 5' –> 3'	Taille attendue du fragment	Température d'hybridation optimale
clpA	B05 (F) B06 (R)	GAAGAGCACATTTTTTATGGG AGCTCTATACTCTGAAACCT	985 pb	50°C
nifS	NIFS_T_F NIFS_T_R	TCCGGCTCTAGTTGCTATTCC CACAAATTTGCAATTCAATCTAGC	927 pb	59°C
rpoB	RPOB_T_F RPOB_T_R	GGGACAAGGAAGAGCTGATG CTTCCCCACTTCTTTTAGCC	2006 pb	56°C

Les gènes *clpA*, *nifS* et *rpoB* de *B. afzelii* et *B. garinii* ont été amplifiés par PCR (Partie II.6.1) à l'exception de la température d'hybridation qui a été ajustée en fonction de la température d'hybridation optimale de chaque couple d'amorces. L'amplification de ces gènes a alors été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1%. Les amplicons issus de la PCR ont ensuite été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Enfin, les amplicons purifiés ont été quantifiés par fluorométrie à l'aide du Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) et du kit Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) en suivant le protocole fourni par le fabricant. Les échantillons d'ADN purifiés ont alors été dilués pour obtenir une concentration de travail de 1 ng/µL. Une série de dilutions au dixième a ensuite été réalisée à partir de ces solutions de travail pour réaliser une gamme de concentration. Afin de vérifier l'efficacité des amorces pour la quantification spécifique de *B. afzelii* et *B. garinii*, une qPCR a été réalisée en utilisant ces échantillons dilués comme matrice et les amorces présentées dans le **Tableau 8**. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe Ct = f(Concentration en ADN) comme indiqué en **Figure 28**.

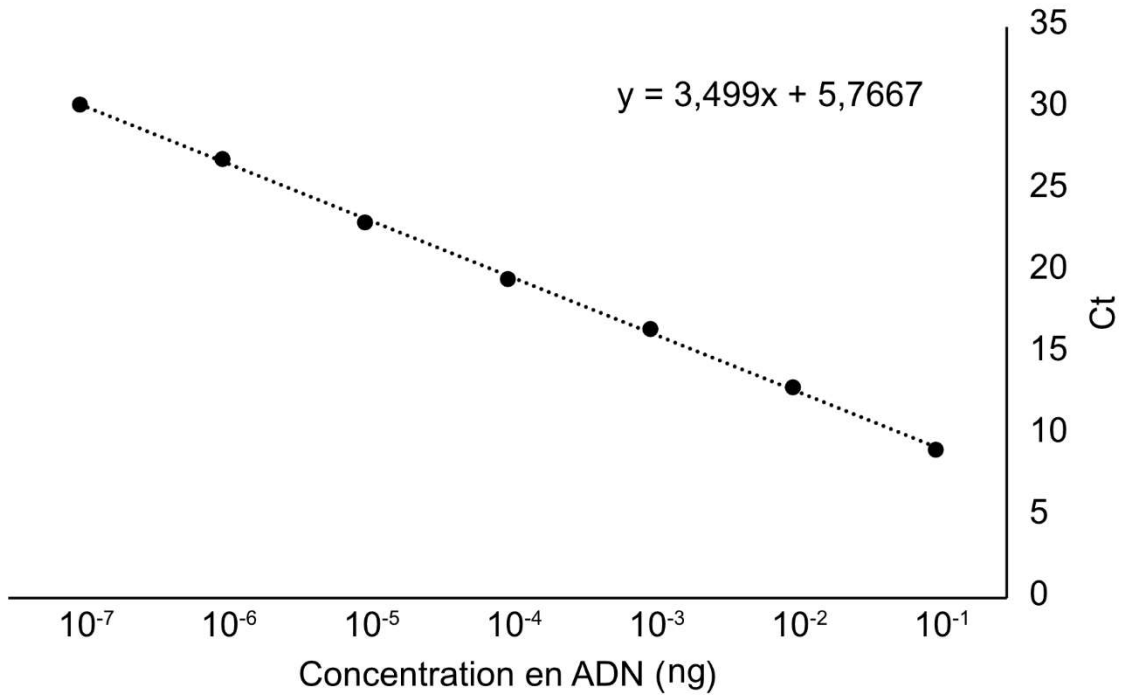

Figure 28 : Exemple de courbe obtenue après amplification des gammes de concentration par qPCR. La courbe présentée ici est un exemple de l'amplification du gène *rpoB* de *B. garinii* par la méthode de qPCR. La pente de la courbe permet de calculer l'efficacité d'amplification du couple d'amorce.

La pente déterminée à partir de cette courbe a alors permis de calculer l'efficacité des amorces à l'aide de la formule suivante :

$$E = \left((10^{\frac{-1}{P}}) - 1 \right) * 100$$

Dans cette équation, E correspond à l'efficacité, exprimée en pourcentage, et P correspond à la pente déterminée expérimentalement. Enfin, le nombre de copies par ng d'ADN a été calculé selon la formule suivante :

$$Copies/ng = \frac{Na}{X * Mbp * 1 * 10\text{^}9}$$

Où Na correspond au nombre d'Avogadro ($6{,}022*10^{23}$), X correspond à la taille du fragment d'intérêt et Mbp correspond à la masse molaire moyenne d'une paire de bases soit 660 g/mol.

II.13 Mutants de délétion du gène *luxS* de *B. afzelii* et *B. garinii*

Afin d'étudier le rôle de la communication induite par AI-2, la construction d'un plasmide permettant l'inactivation du gène *luxS* de *B. afzelii* et *B. garinii* a été réalisée. Pour cela, nous nous sommes inspirés du protocole réalisé par Hübner et collaborateurs dans lequel une cassette de résistance à un antibiotique a été insérée au milieu du gène *luxS* à l'aide de l'enzyme de restriction *Bgl*II (Hübner et al., 2003). Pour construire ce mutant, les auteurs ont utilisé un vecteur suicide qui permet d'insérer cette cassette de résistance au sein du gène *luxS* par un phénomène de recombinaison homologue et ainsi assurer une délétion stable du gène.

II.13.1 Amplification du gène *luxS* et clonage dans le plasmide pGEMT-Easy

Afin de générer les mutants Δ*luxS* de *B. afzelii* et *B. garinii*, nous avons amplifié une région de 726 paires de bases qui contient le gène *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Le couple d'amorce qui a été utilisé pour réaliser cette amplification est le suivant :

- B14 (Sens) : 5' – GATTTAACTCCCAACGGTATAATTG – 3'
- B15 (Antisens) : 5' – TTACTTTTAAATCAAATGCATAAAATAAC – 3'

Le fragment a été obtenu par PCR en utilisant la polymérase GoTaq G2 selon le protocole décrit dans la partie II.6.1. Cette polymérase a été utilisée car elle a la particularité de laisser une adénine débordante aux extrémités 3' de chaque brin d'ADN (qui seront utiles pour l'insertion dans le vecteur). La taille des amplicons a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% avant qu'ils ne soient purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). Les amplicons purifiés ont alors été quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm.

La région de 726 paires de bases contenant le gène *luxS* a ensuite été insérée dans le vecteur pGEMT-Easy (Promega) par l'action de la T4 DNA ligase (Promega). Le vecteur pGEMT-Easy présente la particularité d'être fourni sous forme linéarisée. Ce dernier ne peut pas se circulariser du fait de la présence d'une thymine débordante aux extrémités 3' de chaque brin d'ADN. Les thymines débordantes pourront s'apparier avec les adénines débordantes présentes sur le fragment amplifié par la Gotaq G2 pour faciliter la ligation.

L'étape de ligation a été réalisée avec les rapports vecteur/insert suivants : 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5 et 1 : 7 (1 vecteur pour 1, 3, 5 ou 7 inserts) à 4°C sur la nuit. Le lendemain, ces différents produits de ligation ont été utilisés pour transformer 100 µL de cellules *E. coli* DH5α ultra compétentes (partie I.5). Les bactéries ont alors été étalées sur milieu LB gélosé contenant de l'IPTG (0,5 mM), du X-gal (80 µg/mL) et de l'ampicilline (100 µg/mL) avant d'être incubées à 37°C. Le vecteur pGEMT-Easy présente un gène *lacZ* (qui code la *β*-galactosidase) qui sera exprimé uniquement si le fragment d'intérêt est inséré. Dans ce cas, la *β*-galactosidase produite dégrade le X-gal et la colonie apparaît blanche. Lorsque cette enzyme n'est pas produite, le X-gal s'accumule et la colonie apparaît alors bleue. Cela nous a permis de sélectionner les clones positifs sur la base de la couleur des colonies. La présence du gène *luxS* a ensuite été vérifiée par PCR (II.6.1) en utilisant les couples d'amorces LuxS_A_F – LuxS_A_F pour *B. afzelii* et LuxS_G_F – LuxS_G_R (**Tableau 7**) pour *B. garinii*. La présence d'amplicons a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Ainsi, deux vecteurs ont été générés. Le premier contient le gène *luxS* et les régions avoisinantes issues de *B. afzelii*. Ce plasmide a été nommé pLUXS_A. Le second contient le gène *luxS* et les régions avoisinantes issues de *B. garinii*. Ce plasmide a été nommé pLUXS_G.

II.13.2 Amplification la cassette de résistance à la kanamycine et clonage dans le plasmide pTM61

En parallèle, la cassette de résistance à la kanamycine (*km*^{r}) présente sur le plasmide pLAW330 (Wiater et al., 1994) a été amplifiée à l'aide des amorces suivantes :

- OKD 115' (Sens) : 5' – CGCTCTAGACATGAGCCATATTCAAC – 3'
- OKD 110' (Antisens) : 5' – GGCTCTAGATAGATCTGATTAGAAAAACTCATC – 3'

Le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Xba*I a été ajouté au moment de la synthèse des oligonucléotides et est souligné dans les séquences ci-dessus. Le fragment correspondant a été amplifié à l'aide la polymérase Q5 (NEB) selon le protocole décrit dans la partie II.6.2. Les amplicons ont été analysés après migration sur gel d'agarose 1% pour vérifier qu'ils étaient de la taille attendue. Ils ont alors été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel).

Afin d'obtenir une expression stable du gène conférant la résistance à la kanamycine après insertion dans la région codante du gène *luxS*, un sous-clonage dans le vecteur pTM61 pour remplacer la séquence codant la GFP a été réalisée. Pour cela, le vecteur pTM61 et les amplicons purifiés ont été traités par l'enzyme de restriction *Xba*I dans le tampon D (Promega)

à 37°C pendant 1 heure. L'action de *Xba*I a permis d'exciser la séquence codant la GFP et de générer des extrémités cohésives identiques pour le plasmide linéarisé et le fragment du gène amplifié. Le vecteur a alors ensuite été traité par de la phosphatase alcaline de crevette (Shrimp Alkaline Phosphatase, rSAP) pendant 30 min à 37 °C afin de déphosphoryler l'extrémité 5' du vecteur linéarisé, empêchant ainsi sa re-circularisation. Une ligation des amplicons du gène conférant la résistance à la kanamycine avec le vecteur pTM61 linéarisé a été réalisée par la T4 DNA ligase (Promega). Plusieurs rapports vecteur/insert ont été utilisés : 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5 et 1 : 7 (1 vecteur pour 1, 3, 5 ou 7 inserts). Après une incubation à 4 °C sur la nuit, ces différents produits de ligation ont été utilisés pour transformer 100 µL de cellules *E. coli* DH5α ultra compétentes (I.5). Les bactéries ont ensuite été étalées sur milieu LB gélosé contenant 25 µg/mL de kanamycine et 50 µg/mL de gentamycine avant d'être incubées à 37°C. La présence du gène conférant la résistance à la kanamycine chez les transformants a été vérifiée par PCR en utilisant le couple d'amorce OKD 110' – OKD 115'. Les transformants positifs ont alors été nommés *E. coli* +pTM63 (nom donné au plasmide pTM61 dans lequel la séquence codant la GFP a été remplacée par le gène conférant la résistance à la kanamycine).

II.13.3 Sous-clonage de la séquence du promoteur du gène *flaB+km*^{r} dans la séquence codante du gène *luxS*

Ensuite, l'amplification de la séquence du plasmide pTM63 allant du promoteur du gène *flaB* jusqu'à la fin du gène conférant la résistance à la kanamycine a été amplifiée en utilisant le couple d'amorces suivant :

- B13 (Sens) : 5' – AGATCTTGTCTGTCGCCTCTTGTGG – 3'
- OKD 110' (Antisens) : 5' – GGCTCTAGATAGATCTGATTAGAAAAACTCATC – 3'

Le couple d'amorces B13 - OKD 110' permet l'amplification de cette région tout en ajoutant des sites de restriction reconnus par l'enzyme *Bgl*II. Ces sites sont soulignés dans les séquences ci-dessus. Le fragment a été amplifié par PCR à l'aide de la polymérase Q5 (NEB) (voir partie II.6.2) avec pour seule modification un temps d'élongation plus long au moment des cycles plus long (2 minutes au lieu de 1 minute). La taille des amplicons a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% avant qu'ils soient purifiés à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Enfin, les fragments purifiés ainsi que les plasmides pLUXS_A et pLUXS_G ont été traités par l'enzyme *Bgl*II à 37°C pendant 1 heure. L'enzyme *Bgl*II possède un site de clivage au milieu du gène *luxS*, permettant son inactivation lors de l'insertion de la séquence contenant le promoteur du gène *flaB* et le gène conférant la résistance à la kanamycine. Une étape de traitement à la rSAP et une ligation ont alors été

réalisés dans les mêmes conditions que précédemment (Partie II.13.2). Enfin, 100 µL d'*E. coli* DH5α ultra compétentes ont été transformées avec les différents produits de ligation avant d'être étalées sur milieu LB gélosé contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 25 µg/mL de kanamycine.

Le plasmide qui aurait dû être obtenu après cette étape devait permettre d'obtenir un gène *luxS* inactivé par l'insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique. Les plasmides pLUXS_A et pLUXS_G n'ayant pas d'origine de réplication chez *Borreliella*, ils n'auraient pas pu être maintenus au moment de la réplication des bactéries. Ainsi, ils auraient dû servir de vecteurs suicide pour la génération des mutants Δ*luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Cependant, malgré de nombreuses tentatives, aucun clone positif n'a été obtenu après la dernière étape de transformation.

III. Observation des bactéries en microscopie à illumination structurée

Afin d'étudier la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à former des biofilms ainsi que leurs éventuelles interactions physiques lorsqu'elles sont cultivées simultanément, les souches transformées par des plasmides permettant l'expression de la GFP et de la mCherry (Partie I.7) ont été utilisées. Pour réaliser les observations, des pré-cultures de *B. afzelii*-mCherry et de *B. garinii*-GFP ont été réalisées en BSK-II supplémenté en gentamycine à 50 µg/mL. Les cultures ont été mises à incuber à 33°C et un suivi de croissance a été réalisé par microscopie à fond noir. Les phases de croissance de ces deux espèces ont été synchronisées par repiquages successifs (voir partie I.4.2). Une fois les cultures synchronisées, la formation de biofilms a été initiée. Pour cela, chaque espèce a été ensemencée à une concentration de $1*10^5$ cellules/mL dans des plaques 24 puits à fond en verre (Vision Plate 24 Well, 4titude). Chaque espèce a été ensemencée en monoculture mais également en co-culture avec un rapport bactérien 1 : 1 ($1*10^5$ cellules/mL de chaque espèce). Le volume total a été ajusté à 2 mL par ajout de BSK-II frais. Les plaques ont ensuite été incubées à 33°C et observées après 6, 8 et 11 jours à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence Axio Observer A1 (Zeiss) équipé d'un module ApoTome pour l'illumination structurée. Les images ont été prises avec le logiciel AxoVision (Zeiss) et traitées à l'aide du logiciel Zen (Zeiss).

IV. Production et purification de LsrK

IV.1 Production de LsrK

IV.1.1 Vecteurs utilisés

Afin de bloquer la communication médiée par AI-2, la protéine LsrK a été produite à l'aide d'un système hétérologue. Pour cela, nous avons choisi d'amplifier le gène codant LsrK à partir de la souche *E. coli* K12 afin de le cloner dans les vecteurs d'expression pQE-30 (**Figure 29**) et pQE-70 (**Figure 30**) qui possèdent une séquence codant une étiquette 6-His située respectivement du côté N-terminal et C-terminal de la protéine recombinante produite.

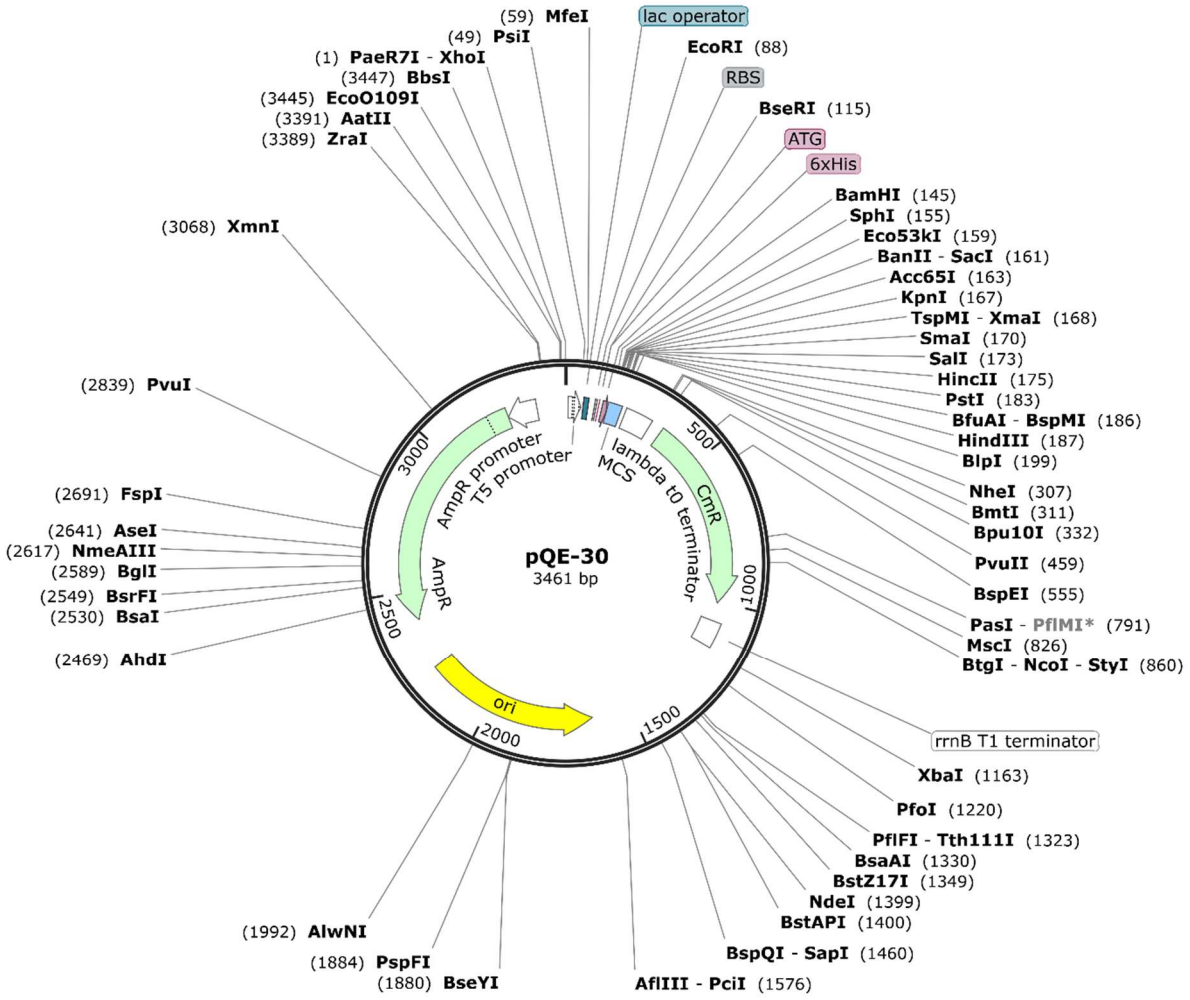

Figure 29 : Carte du plasmide pQE-30. Ce plasmide a été utilisé pour l'expression hétérologue de LsrK. Il contient une étiquette 6xHis en amont du site multiple de clonage,

permettant l'obtention d'une protéine recombinante avec une étiquette 6-His à l'extrémité N-terminale.

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *lsrK* pour l'insertion dans pQE-30 sont les suivantes :

- pQE30/70LsrKSphI (Sens) : 5' – AAGCTAGCATGCATGGCTCGACTCTTTAC – 3'
- pQE30LsrKKpnI (Antisens) : 5' – ATTGGTACCCTATAACCCAGGCGCTTTCC – 3'

L'amorce sens contient la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme de restriction *Sph*I et l'amorce antisens contient la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme de restriction *Kpn*I. Ces sites de restriction sont soulignés dans les séquences ci-dessus. Les enzymes *Sph*I et *Kpn*I ont été utilisées pour linéariser le vecteur et insérer la séquence codant LsrK.

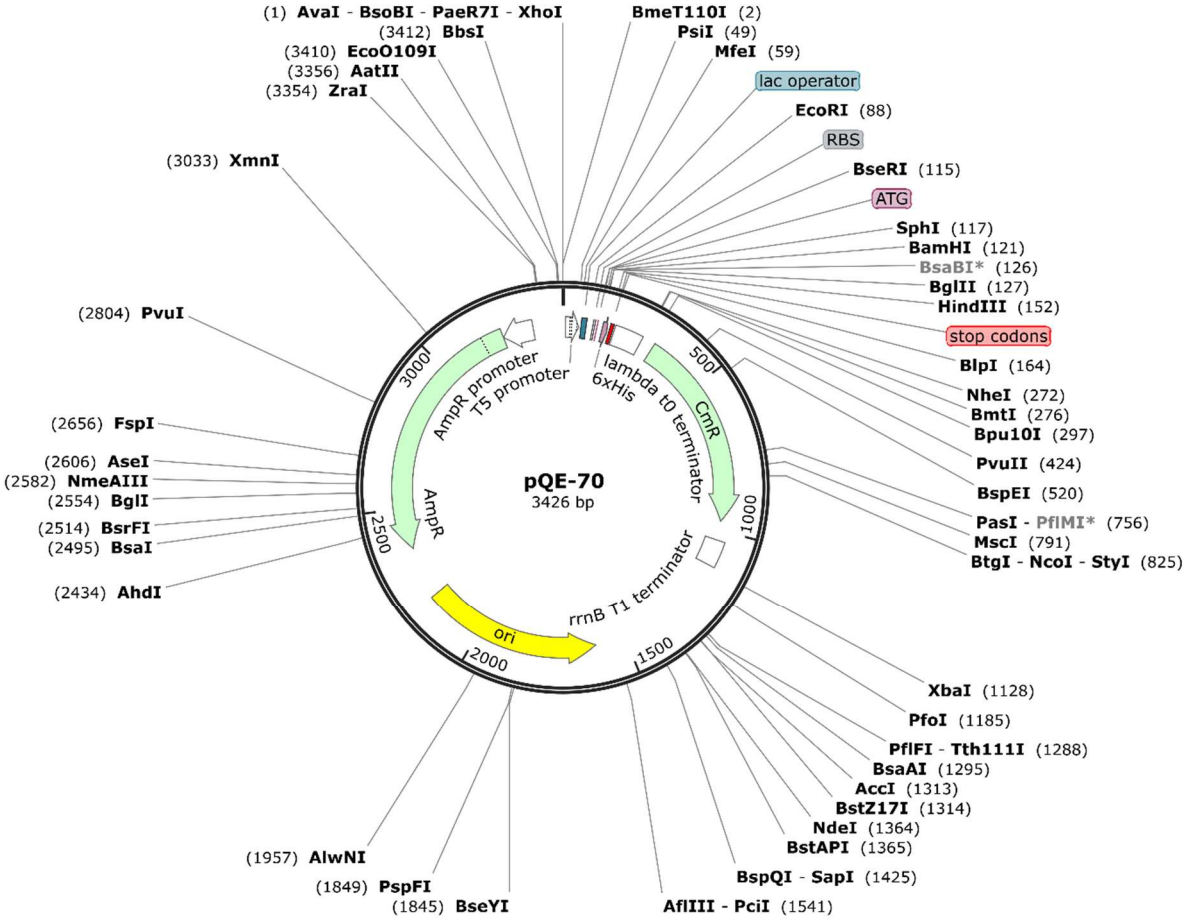

Figure 30 : Carte du plasmide pQE-70. Ce plasmide a été utilisé pour l'expression hétérologue de LsrK. Il contient une étiquette 6-His en aval du site multiple de clonage, permettant l'obtention d'une protéine recombinante avec une étiquette 6xHis à l'extrémité C-terminale.

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *lsrK* pour l'insertion dans pQE-70 sont les suivantes :

- pQE30/70LsrKSphI (Sens) : 5' – AAGCTAGCATGCATGGCTCGACTCTTTAC – 3'
- pQE70LsrKBglIISStop (Antisens) : 5' – GAGAGATCTAACCCAGGCGCTTTCCA – 3'

L'amorce sens contient la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme de restriction *Sph*I et l'amorce antisens contient la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme de restriction *Bgl*II. Les sites de restrictions sont soulignés dans les séquences ci-dessus. Ces deux enzymes de restriction ont été utilisées pour linéariser le vecteur et insérer la séquence codant LsrK. De plus, l'amorce antisens permet d'éliminer le codon stop naturel du gène *lsrK* d'*E. coli* K12 afin d'assurer la production de cette protéine dans le vecteur.

IV.1.2 Transformation d'*E. coli* pour la production de LsrK

Le gène *lsrK* d'*E. coli* K12 a été amplifié à l'aide des couples d'amorces présentés ci-dessus en utilisant la polymérase Q5 (NEB) (voir partie II.6.2) avec une température d'hybridation de 66°C et un temps d'élongation d'1 minute et 30 secondes.

Les amplicons ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% pour vérifier que le fragment amplifié était à la taille attendue. Les amplicons ont alors été purifiés à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel).

Les fragments purifiés et les vecteurs ont été traités à l'aide des enzymes de restriction correspondantes afin de former des coupures identiques et ainsi pouvoir insérer le fragment au sein du plasmide dans la bonne orientation. Pour pQE30, le plasmide et les amplicons de *lsrK* ont été digérés à l'aide des enzymes *Sph*I et *Kpn*I dans le « buffer A » de Promega. Pour pQE70, le plasmide et les amplicons de *lsrK* ont été digérés à l'aide des enzymes *Sph*I et *Bgl*II dans le « buffer B » de Promega. Dans les deux cas, les réactions de digestions enzymatiques ont été réalisée à 37 °C pendant 1 heure. Ensuite, les plasmides linéarisés ont été déphosphorylés par ajout de 1,5 µL de rSAP et incubés à 37 °C pendant 30 minutes. Les produits ont alors été quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm. Enfin, une étape de ligation a été réalisée à l'aide de la T4 ligase (Promega) avec des rapports vecteurs : inserts de 1 : 5 et 1 : 7 (1 vecteur pour 5 ou 7 inserts). L'étape de ligation a été réalisée à 4°C sur la nuit.

IV.1.3 Transformation d'*E. coli* par les plasmides pQE30+LsrK et pQE70+LsrK

Pour l'expression de protéines hétérologues par l'intermédiaire des plasmides pQE30 et pQE70, la souche *E. coli* M15 a été utilisée. Cette dernière contient le plasmide pREP4 qui permet de contrôler l'expression de la protéine d'intérêt par l'expression constitutive d'un répresseur *lac.* Ce plasmide confère également une résistance à la kanamycine. Cette souche a été cultivée en milieu LB supplémenté avec 25µg/mL de kanamycine à 37°C sous agitation à 180 rpm. Afin de préparer des cellules *E. coli* M15 compétentes, 50 mL de milieu LB + 25 µg/mL kanamycine ont été ensemencés et incubés à 37 °C avec une agitation à 180 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600nm} d'environ 0,5. La culture a alors été centrifugée pendant 5 minutes à 3 000 g. Le culot a ensuite été repris dans 45 mL d'eau ultra pure stérile glacée avant d'être centrifugé pendant 5 minutes à 3 000 g. Le culot a alors été repris dans 20 mL d'eau ultra pure stérile glacée et centrifugée pendant 5 minutes à 3 000 g. Enfin, le culot bactérien a été repris dans 200 µL de glycérol 10 % stérile. Les bactéries ont alors été transformées directement par électroporation. Pour cela, 100 µL de cellules ont été mélangés avec le produit de ligation. La solution a alors été placée dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie avant d'appliquer un choc électrique exponentiel (2 500V ; 25 µF et 200 Ω). Directement après l'électroporation, 1 mL de milieu LB préalablement chauffé à 37 °C a été ajouté. La suspension a alors été incubée pendant 1 heure à 37 °C. Enfin, 100 µL de cette suspension ont été étalés sur milieu LB gélosé contenant 25 µg/mL de kanamycine et 100 µg/mL d'ampicilline. Les cultures ont finalement été incubées à 37 °C.

Les clones obtenus après transformation par ces deux vecteurs ont été testés pour leur capacité à produire la protéine après induction à l'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Pour cette étape, les clones ont été ensemencés dans du milieu LB supplémenté avec 25 µg/mL de kanamycine et 100 µg/mL d'ampicilline à une DO_{600} de 0,05. Les cultures ont alors été incubées à 37 °C sous agitation à 180 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600} comprise entre 0,4 et 0,6. Une fois cette concentration atteinte, la production de la protéine a été induite à l'IPTG. Plusieurs conditions de concentrations d'IPTG (0,4, 1 et 2 mM), de température d'induction (20, 30 et 37 °C) et de temps d'induction (2, 4 et 20 h) ont été testées. Une agitation de 180 rpm a systématiquement été utilisée. Seules les cultures dont la température d'induction était de 20 °C ont été cultivées pendant 20 h.

Nous avons en parallèle fait appel à la société Protéogenix pour la construction d'un plasmide d'expression de LsrK. Pour cela, la séquence codant la protéine LsrK a été insérée dans le plasmide pT7 (**Figure 31**), permettant l'expression de la protéine avec une étiquette 6-His à l'extrémité N-terminale. Le plasmide pT7 + LsrK a été nommé pET28b. La carte

complète et la séquence du plasmide pET28b n'ont pas été fournies par l'entreprise et ne peuvent donc pas être présentées.

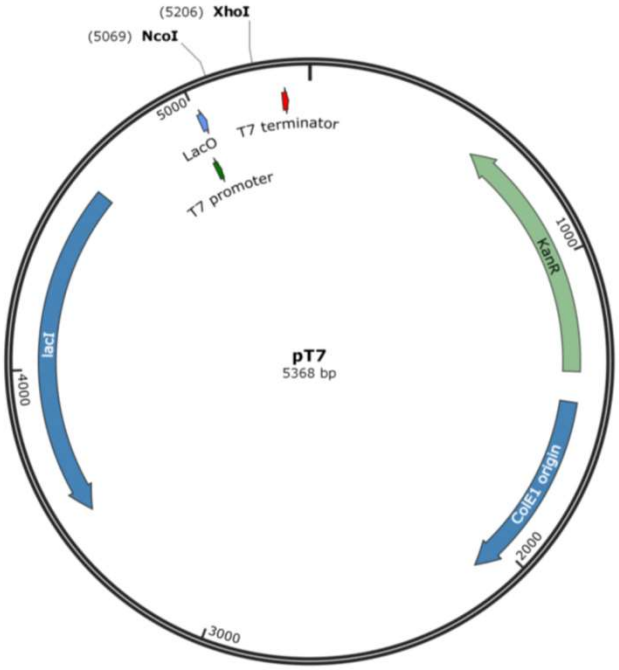

Figure 31 : Carte du plasmide pT7. Ce plasmide a été utilisé par la société Protéogenix pour la construction du plasmide pET28b. Le plasmide pT7 contient une étiquette 6xHis en amont du site multiple de clonage, permettant l'expression d'une protéine avec une étiquette 6xHis à l'extrémité N-terminale.

IV.2 Expression de LsrK par le plasmide pET28b

Afin de produire la protéine LsrK selon le protocole fourni par la société Protéogenix, la souche d'*E. coli* C3030J (NEB) a été transformée par le plasmide pET28b en suivant les recommandations du fournisseur.

Pour la production de la protéine recombinante LsrK, une culture d'*E. coli* + pET28b a été ensemencée à DO_{600nm} = 0,05 dans du milieu LB supplémenté avec 50 µg/mL de kanamycine. Cette culture a alors été mise à incuber à 30°C sous agitation à 200 rpm pendant environ 5 heures. Lorsque la DO_{600nm} de la culture était comprise entre 0,4 et 0,6, la production de la protéine a été induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Les cultures ont alors été incubées sous agitation à 200 rpm soit à 30°C pendant 2 heures, soit à 20°C

pendant 20 heures. Les bactéries ont ensuite été récupérées par centrifugation pendant 10 minutes à 8 000g, 4°C et les culots ont été stockés à -20°C avant leur utilisation.

Pour la lyse bactérienne, les culots ont été repris dans un tampon NPE (Native Protein Extract) composé de 50 mM de phosphate de sodium, 0,5 M de NaCl et 10 mM d'imidazole, pH 7,4. Les culots resuspendus ont ensuite été lysés par sonication pendant 3 à 4 minutes, par une succession des cycles de 2 secondes de pulses à 40 % de l'amplitude maximale de l'appareil suivies de 3 secondes de pause, à l'aide d'un sonicateur Vibra-cell 75115 (Bioblock Scientific) avant d'être centrifugés (10 minutes à 8 000g, 4°C). Le surnageant a été collecté et représente la fraction de protéines solubles. Le culot a alors été resuspendus dans un tampon dénaturant nommé DPE (Denatured Protein Extraction). La composition de ce dernier est identique à celle du NPE à l'exception de l'urée ajoutée à une concentration finale de 8M, permettant de dissocier, au moins en partie, les corps d'inclusion. Les culots resuspendus dans le DPE ont été mis à incuber 30 minutes à température ambiante. Une nouvelle centrifugation pendant 10 minutes à 8 000g, 4°C a finalement été réalisée et le surnageant (qui correspond cette fois à la fraction de protéines insolubles) a été collecté.

La protéine LsrK a été purifiée par chromatographie d'affinité au nickel sur la résine HisPur Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) en suivant les recommandations du fabricant. Le protocole utilisé se base sur l'application successive sur la résine, d'un tampon d'équilibration (20 mM de phosphate de sodium, 300 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole, pH 7,4), de la fraction soluble ou insoluble contenant la protéine recombinante, d'un tampon de lavage (300 mM de NaCl, 25 mM d'imidazole, pH 7,4) et d'un tampon d'élution (300 mM de NaCl, 250 mM d'imidazole, pH 7,4). Entre chaque étape, une centrifugation pendant 2 minutes à 700 g a été réalisée et les différents surnageants ont été récupérés et analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Afin de tester l'activité de cette protéine, des cultures de *B. afzelii* et *B. garinii* ont été traitées par la protéine LsrK issue des fractions d'élutions. Pour cela, la quantité de protéines dans les fractions d'élution a été déterminée par dosage de Bradford en utilisant l'albumine sérique bovine comme standard. Ensuite, LsrK a été ajoutée aux cultures à une concentration finale de 1 µM, concentration optimale pour les essais de *Quorum Quenching* déterminée dans l'étude de Roy et collaborateurs (Roy et al., 2010). Les échantillons témoins dans cette expérience correspondent aux mêmes cultures traitées par le tampon d'élution utilisé pour récupérer LsrK. Après 16 heures d'incubation, les cultures ont été centrifugées 10 minutes à 10 000 g et les surnageants ont été filtrés (0,22 µm). Ces derniers ont alors été mis en contact avec *V. harveyi* BB170 pour détecter la présence et la concentration d'AI-2 (Voir Partie V).

IV.3 Séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes

L'analyse des protéines au cours de cette étude a été réalisée par migration en del dénaturant SDS-PAGE.

La composition des gels de séparation et de concentration est détaillée ci-dessous :

Gel de séparation 12% pour 10 mL :

- Acrylamide/Bis-acrylamide : 3 mL
- Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 : 2,5 mL
- Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) 10% : 100 µL
- Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) : 5 µL
- Persulfate d'ammonium 10% : 50 µL
- H_2O : qsp 10 mL

Gel de concentration 4% pour 10 mL :

- Acrylamide/Bis-acrylamide : 1 mL
- Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 : 2,5 mL
- SDS 10% : 100 µL
- TEMED : 10 µL
- Persulfate d'ammonium 10 % : 50 µL
- H_2O : qsp 10 mL

La préparation des échantillons a été réalisée en mélangeant 3 volumes de tampon d'échantillon (4X Laemmli Sample Buffer, BioRad) avec 1 volume d'échantillon. Ce mélange a alors été chauffé pendant 5 min à 95°C avant d'être déposé sur gel (20 µL/puit). Pour chaque gel, le marqueur de taille utilisé était le « Unstained Protein Molecular Weight Marker » (Thermofisher).

La migration a été réalisée dans un tampon de migration 1X (25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 0,1 % de SDS, pH 8,3) à un voltage constant de 120 V pendant environ 1h15. Finalement, la coloration des gels a été réalisée à l'aide de la solution Readyblue Protein Gel Stain (Sigma-Aldrich).

V. Mesure de l'activité AI-2 par bioluminescence

La souche *V. harveyi* BB170 a été utilisée pour détecter et quantifier l'AI-2 produit par *B. afzelii* et *B. garinii*. *V. harveyi* BB170 produit de la bioluminescence lorsque la concentration en AI-2 dépasse une concentration seuil dans le milieu extracellulaire. Cette bioluminescence est alors quantifiable, traduisant la concentration d'AI-2.

Une pré-culture de *V. harveyi* BB170 a été réalisée à 30°C sous agitation à 160 rpm pendant environ 36 heures. La culture a alors été diluée au 1/5000ème dans du milieu AB. Ensuite, 90 µL de la suspension diluée ont été déposés dans chaque puits d'une plaque 96 puits (Greiner Bio-One). Puis, 10 µL des surnageants de culture récupérés au moment des suivis de croissance de ces deux espèces (Voir partie I.4) ou après traitement par LsrK (Voir partie IV.2) ont été ensuite ajoutés. La plaque a été mise à incuber à 30°C sous agitation à 160 rpm. Après 5 heures d'incubation, la bioluminescence de chaque puits a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque Infinite M Plex (Tecan). Une mesure de bioluminescence a ensuite été réalisée toutes les heures jusqu'à 8 heures d'incubation. *V. harveyi* BB170 produit naturellement une faible quantité de bioluminescence, c'est pourquoi la moyenne des valeurs obtenues dans 6 puits ne contenant que *V. harveyi* BB170 a été réalisée et soustraite aux valeurs expérimentales obtenues pour les surnageants de *B. afzelii* et *B. garinii*. Un surnageant issu d'une culture de *V. harveyi* BB120 de 18 heures à 30°C sous agitation à 160 rpm a été filtré (0,22 µm) et utilisé comme témoin positif.

VI. Analyses Bioinformatiques

VI.1 Analyse *in silico* du gène *luxS* et de son environnement chez les *Borrelia* et les *Borreliella*

Afin de savoir si le gène *luxS* ainsi que son environnement génomique proche sont conservés au sein des *Borrelia* et des *Borreliella*, nous avons réalisé une analyse *in silico*. Chez *B. burgdorferi* ss, les gènes *pdeB*, *pfs*, *metK* et *luxS* forment un opéron (Riley et al., 2007). Ainsi, une séquence nucléotidique d'environ 10 kb contenant les gènes de l'opéron *luxS* ainsi que les trois gènes en amont et les trois gènes en aval de cet opéron a été récupérée depuis la base de données du NCBI à partir du génome de *B. burgdorferi* B31. Cette séquence

a alors été comparée aux génomes des *Borreliaceae* par alignement de séquences à l'aide de l'outil Blast. Pour toutes les espèces de *Borrelia* et de *Borreliella* ayant une homologie avec la séquence de *B. burgdorferi* B31, la séquence correspondante a été récupérée. Lorsque plus de cinq souches d'une même espèce présentaient une homologie, seules cinq d'entre elles ont été incluses dans l'étude afin de faciliter la lecture des résultats. Toutes les séquences ainsi obtenues ont alors été alignées en utilisant le logiciel R et le package genoPlotR (Guy et al., 2011). L'arbre phylogénétique associé à la figure de l'environnement génétique a été généré par analyse du génome complet des souches d'intérêt par le logiciel OrthoFinder (Emms & Kelly, 2019). La génération d'arbres phylogénétiques est réalisée à l'aide des algorithmes STRIDE (Emms & Kelly, 2017) et STAG (Emms & Kelly, 2018) directement implémentés dans le logiciel en utilisant les paramètres par défaut.

VI.2 Traitement des données de séquençage des amplicons du gène codant l'ARNr 16S

Les résultats de séquençage ont été analysés en utilisant le logiciel QIIME 2 2017.4 (Bolyen et al., 2019). La qualité des séquences a été évaluée et filtrée en utilisant le logiciel DADA2 implémenté dans QIIME 2 (Callahan et al., 2016). Pour cela, 15 pb ont été retirées à l'extrémité 5' de tous les amplicons, la longueur de ces derniers ayant été ajustée à 400 pb. Les séquences utilisées pour l'analyse faisaient donc 385 pb. Les séquences ont été groupées en *Amplicon Sequence Variants* (ASVs) exacts en utilisant DADA2. Les affiliations taxonomiques des ASVs ont été déterminées par VSEARCH (Rognes et al., 2016), avec la base de données Silva 132 16S (https://www.arb-silva.de/ dernier accès le 04 novembre 2021) avec un seuil de similarité minimum de 90 %. Les séquences qui n'ont pas été attribuées dans le règne bactérien ont été comparées à la base de données nr/nt en utilisant l'algorithme BLAST (Agarwala et al., 2018) avec une e-value maximum de 0,0001. Les séquences assignées à des tiques ou des organismes eucaryotes ont été éliminées du jeu de données. Pour être certains d'éliminer au maximum les séquences issues de potentiels contaminants, un processus en deux étapes a été implémenté. Tout d'abord, les séquences qui proviennent probablement des réactifs des kits ont été éliminées en utilisant le package decontam dans l'environnement R (Davis et al., 2017). Ensuite, les échantillons restants et tous les contrôles ont été regroupés afin de calculer un indice de dissimilarité de Bray-Curtis (Supplementary Materials Figure S1). Les échantillons qui groupent avec les contrôles ont été intégralement exclus de toutes les analyses suivantes. Le logiciel R a été utilisé pour la création de la carte (sp, rnaturalearth et rnaturalearthdata (South, 2017), maps (Becker & Wilks, 2018)), l'analyse

de l'abondance relative (phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), tidyverse (Hadley Wickham et al., 2019)), l'analyse d'abondance en rangs (vegan (Oksanen et al., 2013), BiodiversityR (Kindt & Coe, 2005)) et l'analyse discriminante linéaire (MASS (Venables & Ripley, 2002)). Pour les figures générées sur R, le package ggplot2 (H Wickham, 2016) a été utilisé. La représentation graphique du core microbiote a été réalisée en utilisant Krona (Ondov et al., 2011) et les diagrammes de Venn ont été réalisés en utilisant InteractiVenn (Heberle et al., 2015).

VI.3 Analyse des ASVs assignés à *Borreliella*

Les ASVs assignés au genre *Borreliella* ont été individuellement comparés à la base de données nr/nt du NCBI en utilisant megablast. Les séquences des gènes codant l'ARNr 16S issu de souches de référence de *Borreliella* ont été sélectionnées et utilisées pour générer une phylogénie. Des séquences de *Ralstonia insidiosa* CCBE 1007-18 et *Treponemma* I8 : G57 ont également été incluses comme groupes externes, la dernière étant sélectionnée car *Treponema* appartient à la même famille que *Borreliella*. Toutes les séquences ont été tronquées à une longueur finale de 335 nucléotides. Les alignements ont été réalisés par l'algorithme MUSCLE implémenté dans le logiciel MEGA-X (Edgar, 2004). L'outil ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017), implémenté dans le logiciel IQ-TREE (Nguyen et al., 2015) a été utilisé pour sélectionner le meilleur modèle pour générer la phylogénie. D'après le Critère d'Information Bayésien (Bayesian Information Criterion), le modèle le plus adapté est le « Kimura Two-Parameter substitution model allowing for a proportion of invariable sites (K2P+I) ». L'arbre phylogénétique a été généré en utilisant IQ-TREE et la robustesse des nœuds a été testée en utilisant 1 000 itérations de « SH-like appoximate likelihood ratio test » (Guindon et al., 2010) et 1 000 itérations de bootstraps conventionnels. Itol v4 (Letunic & Bork, 2019) a été utilisé pour la visualisation et la modification de l'arbre.

VI.4 Analyse du rôle de la température sur l'expression des gènes de *B. afzelii* et *B. garinii*

L'ensemble des analyses des données issues du séquençage de l'ARNm a été réalisé à l'aide des outils implémentés sur le serveur galaxy (https://usegalaxy.org/). Tout d'abord, la qualité des séquences a été analysée par l'outil FastQC. L'outil Trimmomatic a alors été utilisé pour tronquer les séquences dont le score qualité était inférieur à 28. Les séquences ont alors

été cartographiées sur le génome de référence à l'aide de Bowtie2 en utilisant les paramètres par défaut. Les génomes de référence ont été récupérés sur la base de données du NCBI. Les numéros « BioProject » associés sont « PRJNA350557 » pour *B. afzelii* BO23 et « PRJNA350560 » pour *B. garinii* CIP103362. L'outil featureCounts a été utilisé pour quantifier le nombre de séquences assignées à chaque gène. Enfin, les expressions différentielles des gènes en fonction des conditions de température ont été calculées par l'outil Deseq2 en utilisant les paramètres par défaut. Cet outil sert à calculer directement les changements d'expression (Fold Change, FC) mais également la p-value et la p-value ajustée, ce qui permet d'investiguer les changements significatifs d'expression des gènes. Le calcul de la p-value ajustée est fait à l'aide d'une correction de Benjamini-Hochberg. Pour finir, les représentations en volcano plots ont été générés à l'aide de l'outil du même nom.

Résultats

I. Etude de la diversité bactérienne interne d'*Ixodes ricinus* en Poitou-Charentes

Les tiques *Ixodes ricinus* sont vectrices d'une importante variété de pathogènes pour l'Homme et l'animal en Europe. Les pathogènes transmis par les tiques représentent non seulement un enjeu sanitaire majeur mais peuvent également entraîner d'importantes pertes économiques, notamment par leurs impacts sur les élevages. L'étude de la présence et de la prévalence de ces pathogènes au sein des tiques de l'environnement permet d'évaluer les risques de mise en contact entre un pathogène et un hôte lors d'une morsure de tique. L'accumulation de telles données permet de suivre l'évolution du taux d'infection des tiques par les pathogènes et de corréler ces données à divers facteurs environnementaux afin de connaître leurs impacts sur la dynamique de transmission des microorganismes pathogènes. Cependant, des interactions entre microorganismes peuvent avoir lieu au sein de la tique ce qui peut modifier la capacité d'un pathogène à coloniser la tique et/ou à être transmis à l'hôte suivant. Afin de comprendre de manière plus précise le rôle de telles interactions, il semble important d'employer des méthodes d'analyse globale permettant de caractériser non pas les pathogènes seuls, mais le microbiote dans son ensemble. La généralisation de l'utilisation de méthodes de séquençage haut-débit permet actuellement d'obtenir ce type de données pour des coûts de plus en plus faibles.

Au sein de l'ancienne région Poitou-Charentes, l'incidence de la borréliose de Lyme est estimée entre 25 et 49 cas pour 100 000 habitants d'après les données recueillies par l'agence nationale de la santé publique (https://www.santepubliquefrance.fr/). Cependant, aucune donnée relative au taux d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl n'est disponible dans cette région, ce qui représente un manque dans l'étude de la circulation de ces pathogènes. Pour pallier ce manque, la composition du microbiote bactérien interne de nymphes d'*I. ricinus* a été étudiée par séquençage haut-débit d'amplicons du gène codant l'ARNr 16S. Les objectifs de cette étude étaient multiples. Tout d'abord, tenter de détecter les séquences assignées à *B. burgdorferi* sl et ainsi déterminer le taux d'infection des nymphes d'*I. ricinus* au sein de l'ancienne région Poitou-Charentes. Pour les échantillons positifs, les évènements éventuels de co-occurrence de plusieurs séquences d'espèces de *Borrreliella* au sein d'un même individu ont été explorés afin d'avoir des preuves indirectes soutenant de possibles co-infections. Enfin, nous souhaitions étudier le microbiote bactérien interne dans son ensemble afin d'essayer de caractériser un microbiote conservé au sein des individus collectés puisqu'il est aujourd'hui établit que les communautés microbiennes dans lesquelles les pathogènes évoluent peuvent impacter leur pouvoir pathogène. Pour cela, environ 400

nymphes d'*I. ricinus* ont été collectées sur quatre lieux de l'ancienne région Poitou-Charentes (un site par département). Les tiques ont alors été lavées individuellement par un traitement à l'eau de javel 1% permettant d'éliminer les bactéries et l'ADN cuticulaire. Ce traitement permet de limiter l'amplification de séquences issues de la flore bactérienne externe à la tique et qui ne rentrent donc pas dans la composition du microbiote bactérien interne (Binetruy et al., 2019). L'ADN de 180 individus a ensuite été extrait, amplifié, purifié, séquencé et analysé. Les données obtenues au cours de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Microorganisms* en 2021 présentée ci-après.

I.1 Publication: Exploring the Individual Bacterial Microbiota of Questing *Ixodes ricinus* Nymphs

microorganisms

MDPI

Article

Exploring the Individual Bacterial Microbiota of Questing *Ixodes ricinus* Nymphs

Aurélien Alafaci, Alexandre Crépin, Sabine Beaubert, Jean-Marc Berjeaud, Vincent Delafont † and Julien Verdon *,†

Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 9, 86073 Poitiers, France; aurelien.alafaci@univ-poitiers.fr (A.A.); alexandre.crepin@univ-poitiers.fr (A.C.); sabinebbt@gmail.com (S.B.); jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr (J.-M.B.); vincent.delafont@univ-poitiers.fr (V.D.)
* Correspondence: julien.verdon@univ-poitiers.fr (J.V.)
† Co-last authors.

Abstract: *Ixodes ricinus* is the most common hard tick species in Europe and an important vector of pathogens of human and animal health concerns. The rise of high-throughput sequencing has facilitated the identification of many tick-borne pathogens and, more globally, of various microbiota members depending on the scale of concern. In this study, we aimed to assess the bacterial diversity of individual *I. ricinus* questing nymphs collected in France using high-throughput 16S gene metabarcoding. From 180 dragging-collected nymphs, we identified more than 700 bacterial genera, of which about 20 are abundantly represented (>1% of total reads). Together with 136 other genera assigned, they constitute a core internal microbiota in this study. We also identified 20 individuals carrying *Borreliella*. The most abundant species is *B. afzelii*, known to be one of the bacteria responsible for Lyme disease in Europe. Co-detection of up to four *Borreliella* genospecies within the same individual has also been retrieved. The detection and co-detection rate of *Borreliella* in *I. ricinus* nymphs is high and raises the question of interactions between these bacteria and the communities constituting the internal microbiota.

Keywords: *Borrelia*; questing ticks; metabarcoding; microbiota; *Ixodes*; *Borreliella*

check for updates

Citation: Alafaci, A.; Crépin, A.; Beaubert, S.; Berjeaud, J.-M.; Delafont, V.; Verdon, J. Exploring the Individual Bacterial Microbiota of Questing *Ixodes ricinus* Nymphs. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1526. https://doi.org/10.3390/microorganisms9071526

Academic Editor: Nicolas Derome

Received: 31 May 2021
Accepted: 14 July 2021
Published: 17 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Ticks are blood-sucking arthropods known worldwide to be vectors of many pathogens for humans, as well as for domestic and wild animals [1]. Ticks ingestion of blood is completed by biting at each developmental stage to induce the moult [2]. During these meals, ticks can take up pathogens by feeding on an infected host or by co-feeding [3,4]. While feeding, an infected tick can also transmit pathogens with its saliva to a new host. Tick-borne pathogens (TBPs) are an integral part of the tick microbiome, along with commensals and symbiotic viruses, archaea, bacteria and eukaryotes [5]. However, until the beginning of 2011, this microbiome was largely unknown [6]. Over the last decade, many studies have focused on its description in several tick species throughout the world, at different stages of the life cycle, during questing or during interactions with various hosts [7–14]. The increasing amount of available data allows us to gain a clearer insight into the different microbial communities associated with ticks. However, a current lack of harmonization at the level of collection and/or analysis conditions still limits our understanding of both the composition of these communities and the relationships between these microorganisms [15].

The role played by the microbiome in the establishment and transmission of pathogens, as well as on tick biology, has received increasing attention in recent years [16,17]. Numerous maternally inherited bacteria have been described in ticks, although their functional roles are largely unknown [18]. Nonetheless, one (*Francisella* F-Om) has been shown to

supply B vitamins and cofactors, counterbalancing the deficiency induced by a blood-only diet [19]. As obligate endosymbionts in most tick species, *Coxiella*-like are also suspected to be nutritional symbionts of ticks [20]. TBPs include viruses, bacteria and parasites responsible for several infections. Their presence may impact their host microbiome in the same way as others factors such as temperature [21], tick species, developmental stage, geographical origin [13,22], anatomical region and sex [23–25]. Although less studied, multiple and complex interactions between microorganisms take place, influencing the ability of TBPs to colonize the gut and their ability to be transmitted to a new host [26–29]. The composition of the microbiome is also a driver of gene expression and proteins production in ticks. It promotes the establishment of certain microorganisms such as the Lyme disease (LD)-causing spirochete *Borreliella burgdorferi* [30]. Interestingly, differences in the relative abundance of certain taxa were linked to the presence/absence of *B. burgdorferi*, whereas the spirochete load seems poorly affected by the internal bacterial composition [11]. Furthermore, DNA of several TBPs have regularly been detected within the same tick suggesting their possible coexistence and, in some cases, a proven co-infection [31–35]. These studies highlight the complexity of interactions among microbial populations within ticks that do not only involve pathogenic members. To date, the impact of those interactions between TBPs on human infections remains poorly understood [36,37]. Numerous factors modulate these interactions, one of those factors being the impact of co-infections in human health, raising difficulties to perform a diagnosis and to offer therapeutic solutions [38,39].

Most TBPs are transmitted during feeding by the bite of ticks belonging to the *Ixodidae* family [39]. Among the genera composing this family are the ticks of the genus *Ixodes* that vectorize *B. burgdorferi*, the LD spirochete. In the Northern Hemisphere, LD is the most common vector-borne disease, with approximately 30,000 cases reported to the Center for Disease Control and Prevention (this number does not reflect all cases of LD; recent estimates suggest that approximately 476,000 people may contract LD each year in the United States) and around 200,000 new cases in Western Europe [40,41]. In the Eastern United States, *B. burgdorferi* is primarily vectored by *I. scapularis*, while *I. pacificus* is the prime vector to humans on the Western coast [42]. In Western Europe, the principal tick vector is *I. ricinus*, while *I. persulcatus* predominates in the Eastern part of the continent and in Asia [43]. Within the *Borreliaceae* family, species responsible for LD are referred to as *B. burgdorferi sensu lato* and are not evenly distributed around the world. The global distribution is mainly dependent on the considered continent [44,45]. The most pathogenic species for humans in Northern America is *B. burgdorferi sensu stricto* (ss), whereas in Europe, *B. afzelii* and *B. garinii* are the main pathogenic species, even though cases associated with *B. burgdorferi* ss, *B. spielmanii* and *B. bavariensis* have been reported [45–48].

In this study, we aimed to unravel the bacterial diversity of individual *I. ricinus*. Questing nymphs were collected at four different sites in the former region Poitou-Charentes in France. The bacterial microbiota of individual nymphs was assessed using high throughput sequencing of the 16S rRNA coding gene sequence with a focus on TBPs, including *Borreliella* genospecies. We also investigated the existence of several pathogens in the microbiota of each collected tick.

2. Materials and Methods

2.1. Tick Sampling and Processing

Questing nymphs of *I. ricinus* were collected in June 2019 at four locations in Poitou-Charentes (France): Bignoux (46°36′24″ N, 0°28′14″ E), Lezay (46°14′40″ N, 0°3′30″ E), Hiesse (46°2′14″ N, 0°36′17″ E) and Tonnay-Charente (15°57′12″ N, 0°54′12″ W). All sampling sites are located within a radius of 67 km. Ticks were collected by a dragging protocol with a 1 m^2 piece of white linen attached to a stick connected to a rope. Dragging on vegetation was carried out at each of the four sites on 20 transects of 10 m, each spaced from 10 to 15 m. Approximately 100 individuals were collected at each site, brought back to the laboratory in sterile 50 mL tubes and kept alive at room temperature. Each tick was examined under a Wild Heerbrugg M3 (Leica, Wetzlar, Germany) stereomicroscope using

morphological identification criteria [49] before washing. Cuticular fauna, including bacteria and exogenous DNA, were eliminated following the bleach-based protocol described in detail in another study [50]. Briefly, ticks were bathed individually for 30 s in a commercial bleach solution diluted to a final concentration of 1%. Ticks were then rinsed three times in successive DNA-free water baths for 1 min. Immediately after the last bath, ticks were individually stored in sterile 1.5 mL tubes filled with 70% ethanol and stored at −20 °C prior to DNA extraction.

2.2. DNA Extraction

Forty-five *I. ricinus* nymphs per sampling site were individually crushed in liquid nitrogen using a mortar and pestle. To avoid cross-contamination between samples, the mortar and pestle were sterilized by washing with commercial bleach. After crushing, the tissues were transferred to sterile tubes for DNA extraction. The mortar and pestle were then rinsed with the first buffer of the DNA extraction kit to limit the loss of tissues. Negative crushing controls were carried out without ticks. DNA from all samples was then extracted using the DNeasy® Blood&Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Negative DNA extraction controls were carried out using only kit reagents.

2.3. PCR Amplification and High-Throughput Sequencing

A 464-bp fragment covering variable regions V3–V4 of the bacterial 16S rRNA gene was PCR-amplified using the U341F (5′-CCTACGGGRSGCAGCAG-3′) [51] and Bakt_805R (5′-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3′) [52] primer pair. These primers were selected for their high coverage on 16S rRNA gene sequences [53]. The PCR was performed using Q5, high-fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Evry, France) together with Q5 reaction buffer (1X final), 0.5 µM of each primer, dNTP (0.2 mM each) and 5 µL of DNA in a final volume of 40 µL. The amplification was carried out as follows: an initial denaturation step at 98 °C for 5 min then denaturation at 98 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 30 s for a total of 30 cycles, followed by a final elongation step at 72 °C for 5 min. For each PCR run, negative (DNA-free water) and positive (DNA extracted as previously described from an overnight culture of *P. aeruginosa* PA14 cultured in LB medium at 37 °C with shaking at 180 rpm) template controls were included. The PCR products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis and further purified using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kits (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA). Mock purifications were carried out as negative controls for further analysis. DNA quantification was carried out using a Qubit® 2.0 fluorometer (Invitrogen, Waltham, MA, USA). For all PCR amplicons, the library was constructed and sequenced by the genotyping and sequencing platform of the Paris Brain Institute (Paris, France; https://icm-institute.org/fr/ accessed on 30 November 2019) using Illumina MiSeq single-end 1 × 500-bp technology. All raw data were deposited in the Sequence Read Archive of the NCBI under the BioProject ID PRJNA727936.

2.4. Sequencing Data Processing

Sequencing results were analyzed using the QIIME 2 2017.4 software package [54]. The quality of reads was assessed and filtered using the DADA2 software implemented in QIIME 2 [55]. To do this, 15 bp were removed at the 5′ side of all amplicons and truncated at 400 bp. The final reads used for analysis were 385-bp long. Reads were grouped into exact Amplicon Sequence Variants (ASVs) using DADA2. ASVs taxonomic affiliations were determined using VSEARCH [56], along with the Silva 132 16S database (https://www.arb-silva.de/ accessed on 10 February 2020) with a minimum similarity threshold of 90%. Reads that failed to be classified within the bacteria kingdom were further characterized by comparison with the nr/nt database, using the BLAST algorithm [57] with a maximum e-value cutoff of 0.0001. Reads assigned to ticks or eukaryotic organisms were eliminated from the dataset. To ensure efficient dealing with potential contaminant sequences, a

two-step process was implemented. Firstly, sequences that likely originated from kit contamination were filtered out using the decontam package in the R environment [58]. Then, filtered samples and all controls were clustered, along with all controls, using the Bray–Curtis dissimilarity index (Supplementary Materials Figure S1). Samples grouping with controls were completely excluded from all downstream analyses. The R software was used for the map creation (sp [59], rnaturalearth and rnaturalearthdata [60], maps [61]), relative abundance analysis (phyloseq [62], tidyverse [63]) and ranked abundance analysis (vegan [64], BiodiversityR [65]), LDA analysis (MASS [66]). For figures generated in R, the ggplot2 [67] package was used. Core microbiota graphical representations were achieved using Krona [68], and Venn diagrams were drawn using InteractiVenn [69].

2.5. Borreliella Amplicon Sequence Variants Analysis

Amplicon Sequence Variants assigned to the *Borreliella* genus were individually compared to the NCBI nr/nt database using megablast. 16S rRNA coding gene sequences from *Borreliella* reference strains were selected and used to construct a phylogeny. Reads from *Ralstonia insidiosa* CCBE 1007-18 and *Treponema* I8:G57 were also included as outgroups, the latest being selected because *Treponema* belongs to the same family as *Borreliella*. All reads were truncated to a final length of 335 nucleotides. Alignments were realized using the MUSCLE algorithm implemented in MEGA-X software [70]. Model Finder [71], implemented in the IQ-TREE software [72], was used to select the best phylogeny construction model. According to the Bayesian Information Criterion, the best fit model was the Kimura Two-Parameter substitution model allowing for a proportion of invariable sites (K2P+I). The phylogenetic tree was generated using IQ-TREE, and the node robustness was assessed using 1000 iterations of SH-like approximate likelihood ratio test [73] and 1000 iterations of conventional bootstraps. Itol v4 [74] was used for tree representation and formatting.

3. Results

3.1. Collection of Questing Ticks

A total of 370 questing ticks were collected from four sites (Bignoux, Hiesse, Lezay and Tonnay-Charente) using a dragging protocol (Figure 1). Out of these 370 ticks, 93.0% (344/370) belonged to the species *Ixodes ricinus*, and 7.0% (26/370, only nymphs) belonged to the genus *Haemaphysalis* sp. Only *I. ricinus* ticks were considered in this study. Out of the 344 *I. ricinus* individuals, 315 were nymphs, and 29 were adults with 11 females and 18 males.

3.2. Sequencing of the Internal Bacterial Microbiota of Ticks

Sequencing was carried out on 180 randomly selected bleach-treated nymphs of *I. ricinus* (45 per sampling area) and 12 negative controls (four crushing controls, four DNA extraction controls and four purification controls). A total of 826,697 raw reads were generated, from which 370,095 high-quality reads were retained for further analyses. Out of these, 60,149 reads were assigned to ticks or eukaryotic organisms and were further discarded. As nymphal ticks are low biomass arthropods [75,76], the number of generated reads may be low on average, and variations in the read numbers can thus exist among samples. Moreover, such low biomass samples can be critically impacted by contamination originating from the various kits used to produce amplicons [77]. After potential contaminants sequences exclusion, five samples were excluded from the dataset, leaving 203,857 reads distributed among 175 individual nymphs. Alpha rarefaction analyses suggested that the sequencing effort was sufficient to capture most of the bacterial diversity of individual nymphs' microbiota (Supplementary Materials Figure S2). To estimate the bacterial diversity present in the dataset, alpha diversity indexes (Shannon diversity index and Shannon evenness index), as well as ASVs diversity, were calculated for each sampling site (Table 1, Supplementary Materials Figure S3).

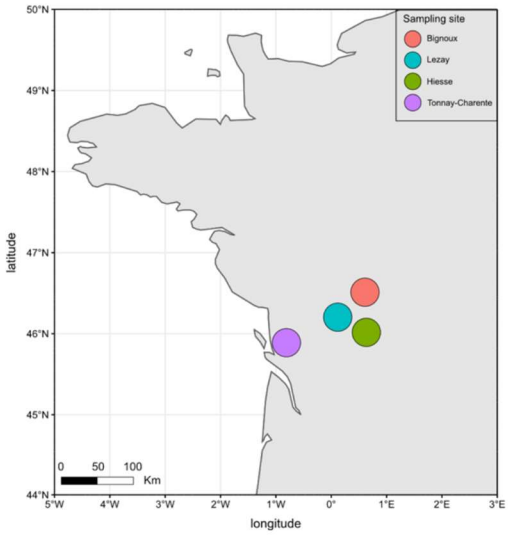

Figure 1. The sampling areas in Western France.

Table 1. Diversity index calculated for each sampling site. Calculations were carried out after probable contaminant reads removal. An uneven number of individuals is due to samples exclusion based on the Bray-Curtis dissimilarity index calculation.

Sampling Site	Number of Individuals	Average Reads per Tick	Shannon H Index (±SD [1])	Shannon E Index (±SD [1])	Observed ASVs
Bignoux	45	1055	2.83 (±0.81)	0.77 (±0.15)	1079
Lezay	43	1167	3.25 (±0.71)	0.76 (±0.13)	1371
Hiesse	43	1043	2.90 (±0.78)	0.73 (±0.14)	1019
Tonnay-Charente	44	1394	3.21 (±0.80)	0.75 (±0.15)	1433

[1] SD: Standard Deviation.

In terms of richness and diversity, the Shannon diversity index (H) highlighted the presence of many taxa with well-balanced abundances for each sampling site. When comparing sampling sites, the H index did not differ drastically, indicating few discrepancies in richness between samples retrieved from these sites. Concerning the bacterial taxa repartition at each site, the Shannon evenness index (E) indicated a fairly even abundance of all taxa rather than a strong dominance of certain taxa. The sampling site, therefore, had little impact on the degree of bacterial diversity hosted by *I. ricinus* nymphs.

3.3. Taxonomic Diversity in Nymphs

For further analyses, all ASVs were grouped together according to their taxonomy. All samples were also visualized according to their sampling site. The twenty most abundant taxa found in the dataset were first selected. They represent 73.27% of all reads (149,385/203,857 reads), and their abundance range from 13.17% for *Ralstonia* to 1.02% for *Methylobacterium* (Supplementary Materials Table S1). Their relative abundance per site was represented as a bar plot (Figure 2).

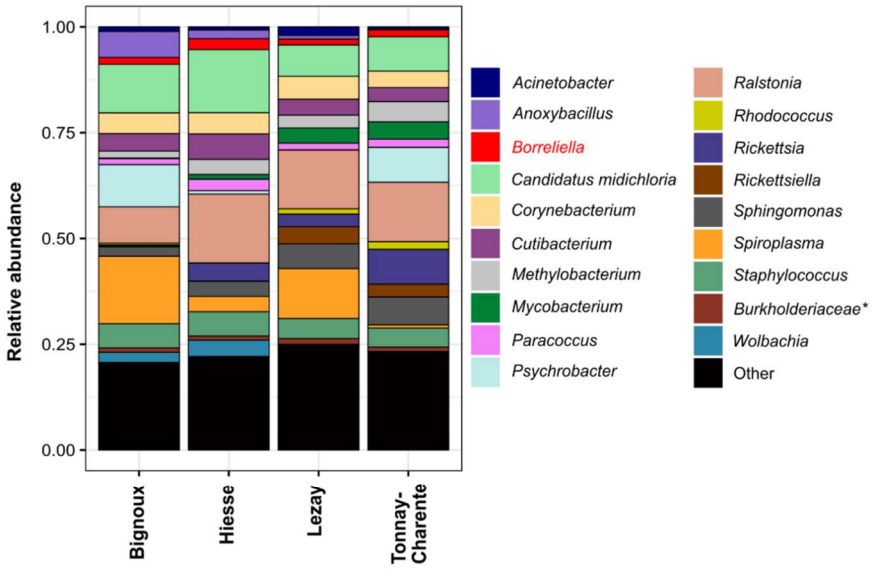

Figure 2. Relative abundance bar plot of the 20 most commonly detected taxonomic units grouped by sampling site. Taxa were classified at the genus level whenever possible. Each column represents grouped samples from a sampling site. Genera were represented depending on the overall reads number. The category « other » contains all taxa that do not belong to the 20 most abundant. *Borreliella* is in red because a focus on this genus is made later in the article. *: Assignment at the family level only because it was not feasible to have a more detailed assignment.

Of these genera, the two most abundant were *Ralstonia* (26,761 reads) and *Candidatus midichloria* (20,638 reads). They were found in ticks from all sampling sites, although their relative abundance varied slightly. Important differences can be observed for *Spiroplasma*, which was highly abundant in Bignoux and Lezay (7629 and 5991 reads, respectively), but drastically reduced in Hiesse (1538 reads) and Tonnay-Charente (447 reads). *Psychrobacter* was well represented in Bignoux and Tonnay-Charente but almost absent in Hiesse and Lezay (350 and 10 reads, respectively). According to our data, the sampling origin also impacted the relative abundance for *Anoxybacillus* and *Wolbachia*, which were well represented in Bignoux and Hiesse but only yielded few reads in Lezay and Tonnay-Charente. In contrast, *Mycobacterium*, *Rickettsiella* and *Rhodococcus* were present in Lezay and Tonnay-Charente but only scarcely detected in Bignoux and Hiesse. *Rickettsia* (4.19%) and *Borreliella* (1.76%), known to contain pathogenic species, were found at all sampling sites, although in low abundance (Figure 2). In our dataset, 48/175 (27.43%) individuals were positive for *Rickettsia*. The reads grouped in the category "other" represent between 20.70% (Bignoux) and 24.80% (Lezay) of all reads for each sampling site. This category includes 584 bacterial genera unambiguously assigned but detected in low abundance compared to the most present genera (Supplementary Materials Table S1). Among those, the dataset was enriched by the phylum Proteobacteria (33.90%) followed by Actinobacteria (19.80%) and Firmicutes (18.30%). On a geographical scale, significant variations in the abundance of bacterial genera have been highlighted, indicating that the location of the ticks influences their internal microbiota.

3.4. Site-Dependent Intra-Tick Diversity

The differences in the relative abundance of genera found according to the sampling sites raised the question of whether there is a significant difference or not when comparing

the overall diversity. In an attempt to answer this question, a linear discriminant analysis was performed, and the results are shown in Figure 3a.

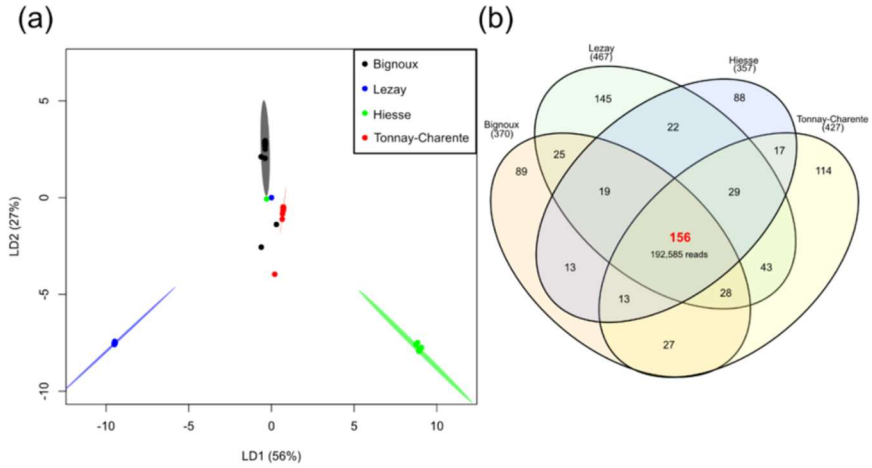

Figure 3. Intra-tick bacterial diversity for each site. (**a**) Site-dependent linear discriminant analysis. Each individual is represented by a single dot. Confidence ellipses were drawn with a confidence of 0.95. These axes were chosen as they depict the best separation between sampling sites; (**b**) Venn diagram of all the taxa identified. Sampling sites Bignoux, Lezay, Hiesse and Tonnay-Charente presented 370, 467, 357 and 427 different taxa, respectively.

Almost all individuals from each sampling site clustered together, indicating a homogenous bacterial diversity in our collection. Clusters are well separated, underlining a difference in internal bacterial diversity depending on the sampling collection site. The most important difference in intra-tick bacterial diversity is observed between samples collected in Hiesse (green) and Lezay (blue), the two geographically closest sampling sites (Figure 1). Clusters for Bignoux (black) and Tonnay-Charente (red), although geographically distant, are close to each other. This indicates only little variation in the overall bacterial composition in nymphs from these two sites. Thus, the geographical distance might not be the only parameter to consider when explaining intra-tick bacterial diversity.

3.5. Individual Nymph Internal Core Microbiota

In an attempt to determine how many taxa were present in all geographical sites and to define a potential internal core microbiota, a Venn diagram was generated (Figure 3b). A total of 156 taxa (including the twenty most abundant) were present in at least one individual from each sampling site. These taxa represented almost all the reads, i.e., 94.47% (192,585/203,857 reads). The taxa composing this core microbiota and their relative abundance in the dataset are presented as a Krona chart (Supplementary Materials Figure S4). To go further, a core microbiota at the individual level was defined using the core-features function implemented in QIIME 2. The number of taxa present in 50–100% of the individuals was calculated (Figure 4a). Twenty-one taxa were present in at least 50% of nymphs studied; this number dropped to eight taxa when considering 75% of nymphs, and only one taxon (*Ralstonia* spp.) was present in at least 95% of the individuals. None of our taxa were present in 100% of the collected nymphs. The twenty-one taxa present in 50% of the nymphs accounted for 52.67% of all reads (107,369/203,857). Of these twenty-one taxa, twelve were part of the twenty most abundant taxa (Figure 4b). Others (*Anoxybacillus*, *Borreliella*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Rickettsia*, *Rickettsiella*, *Spiroplasma* and *Wolbachia*) were present in high abundance but not evenly represented among samples. This was due to a high relative abundance of these bacteria in only some *I. ricinus* nymphs. These results

highlighted the bacterial heterogeneity that can occur at the individual scale, especially regarding genera containing pathogenic species (*Borreliella* and *Rickettsia*).

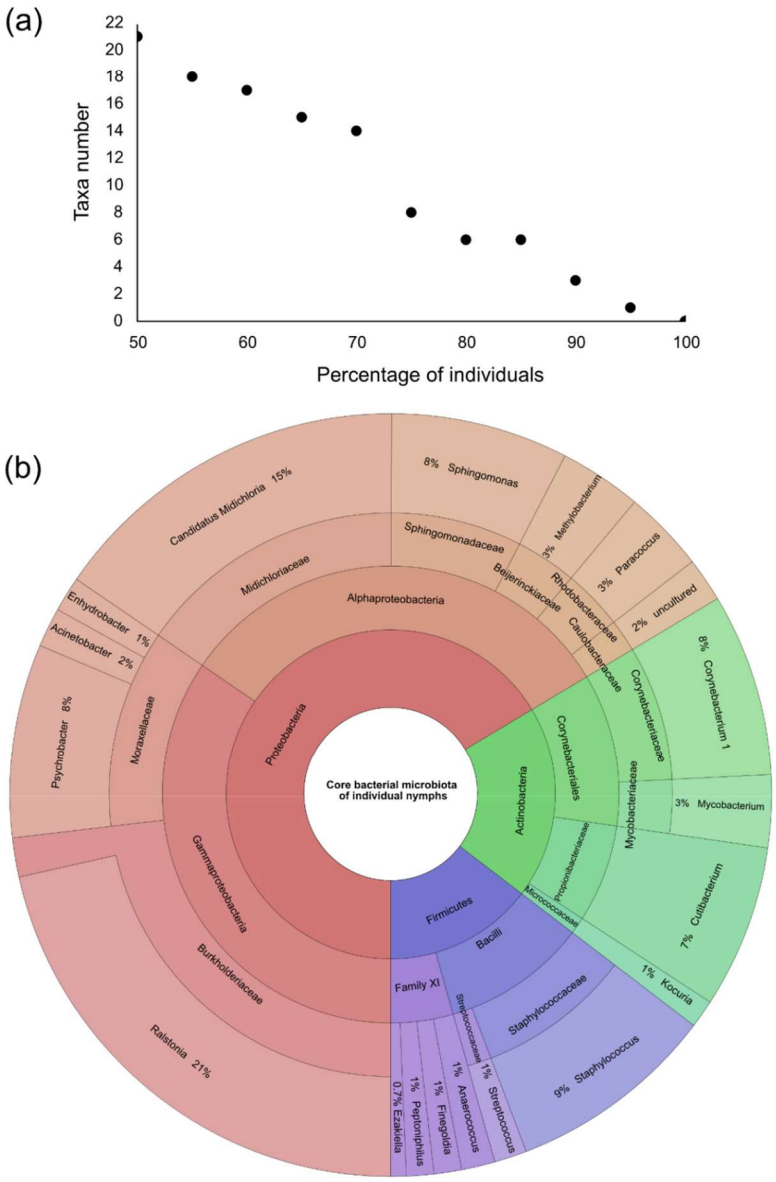

Figure 4. Core internal bacterial microbiota of individual nymphs. (**a**) The number of taxa present in nymphs. Each black dot represents the number of taxa present in the corresponding percentage of individuals. Twenty-one taxa were present in at least 50% of the collected individuals; (**b**) Krona chart representation showing the twenty-one taxa present in at least 50% of collected nymphs. These taxa represent the internal core microbiota at the individual level.

3.6. Borreliella Prevalence and Diversity

Among what could be defined as a core internal microbiota in this study, some bacterial genera containing TBPs were found. Out of the TBPs that can be transmitted by the bite of *I. ricinus* nymphs, bacteria of the genus *Borreliella* remain the most monitored. In our dataset, this genus was part of the most represented genera (see Figure 2), with 3582/203,857 (1.76%) reads obtained. The reads were recovered from ticks sampled at all sites, and the total number of reads differed only slightly between sites (from 702 reads in Lezay to 1094 reads in Hiesse). To further explore the taxonomic affiliation of *Borreliella* ASV, a phylogenetic analysis was carried out to assess if ASVs could be assigned to a single species. Four clusters, including one or two *Borreliella* genospecies, have emerged (Figure 5). These clusters were composed of the following genospecies: *B. spielmanii* and *B. valaisiana* (in blue), *B. afzelii* (in green), *B. garinii* and *B. lusitaniae* (in red), *B. burgdorferi* and *B. bissetti* (in grey). Only *B. garinii* CIP103362 did not group correctly with other *B. garinii* partial 16S sequences. Even if this method did not allow us to accurately predict to which species an ASV belonged, differences were sufficient to assign our ASVs to one of the four clusters previously described. Thus, assumptions can be made regarding the presence and relative abundance of each *Borreliella* genospecies as well as co-detection depending on the sampling site.

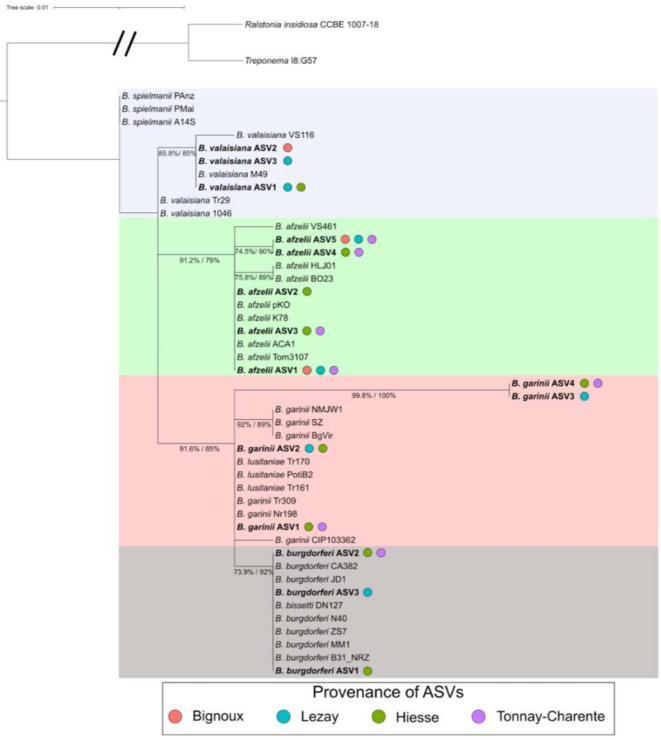

Figure 5. Phylogenetic tree of the *Borreliella* assigned ASVs. The tree was generated using a Kimura Two-Parameter substitution model, allowing for a proportion of invariable sites (K2P + I) model. Arbitrary colors were added to separate the four clades generated from this analysis. Colored circles indicate in which sampling sites each ASVs was found. Percentages indicate the results from the SH-like approximate likelihood ratio test and bootstraps, respectively.

Overall, 11.4% (20/175) of the *I. ricinus* questing nymphs yielded 10 or more reads assigned to *Borreliella*. The most prevalent genospecies detected in our dataset was *B. afzelii*, with 15 infected nymphs and a total of 2140 reads (Figure 6a). Others genospecies clusters had fewer read counts with 561, 593 and 515 reads for *B. burgdorferi ss/B. bissetti*, *B. garinii/B. lusitaniae* and *B. spielmanii/B. valaisiana*, respectively.

(a)

	Bignoux	Lezay	Hiesse	Tonnay-Charente	Total
B. spielmanii / B. valaisiana	1	1	1	0	3
B. afzelii	5	1	4	5	15
B. garinii / B. lusitaniae	0	1	4	3	8
B. burgdorferi ss / B. bissetti	0	1	2	2	5

(b)

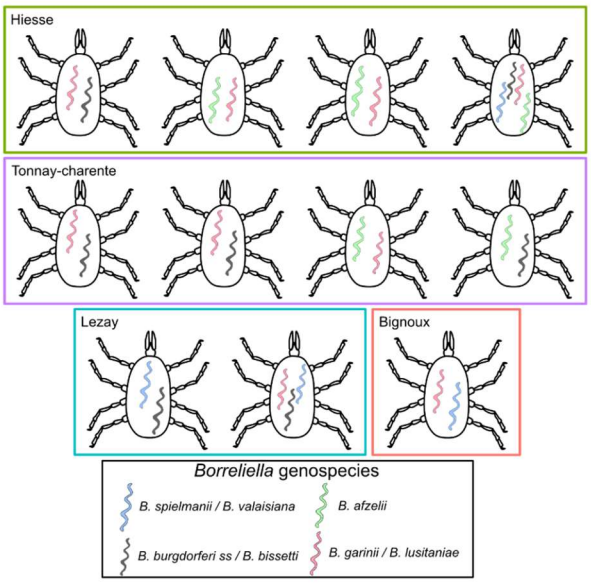

Figure 6. The presence of *Borreliella* in *I. ricinus* nymphs at the individual level. (**a**) The number of samples infected by *Borreliella* genospecies for each sampling site. A sample was considered positive if at least 10 reads for a genospecies were detected. Positive samples presented here can be co-infected by two or more genospecies; (**b**). Schematic representation of the different *Borrelellia* clusters found within the same infected nymph.

As sequencing of individual nymph bacterial microbiota can yield several distinctive *Borreliella* ASVs, the term co-detection will presently be used when ASVs from at least two different genospecies were retrieved in a single individual. Out of the 20 nymphs positive

for *Borreliella*, 11 exhibited a co-detection of at least two genospecies (Figure 6b). The most frequent co-detection was between *B. afzelii* and *B. garinii/B. lusitaniae* (3/11) together with *B. burgdorferi ss/B. bissetti* and *B. garinii/B. lusitaniae* (3/11). Other co-detections were between *B. afzelii* and *B. spielmanii/B. valaisiana* (Bignoux), *B. burgdorferi ss/B. bissetti* and *B. spielmanii/B. valaisiana* (Lezay) and *B. afzelii* and *B. burgdorferi ss/B. bissetti* (Tonnay-Charente). One case of triple detection was identified in Lezay: *B. spielmanii/B.* valaisiana, *B. garinii/B. lusitaniae* and *B. burgdorferi ss/B. bissetti*. Similarly, the four genospecies were detected in a single individual in Hiesse (Figure 6b).

Two or more *Borreliella* genospecies were present in 55% of *Borreliella* positive samples, and 6.3% of all the samples studied.

4. Discussion

Ticks are blood-sucking arthropods known to host a wide microbial diversity, including symbionts and pathogens. In this study, a focus was made on *I. ricinus*, which is the primary vector of *Borreliella*, the bacteria responsible for LD [40,43]. These bacteria could be acquired through feeding on infected wild animals between each developmental stage or through co-feeding [3,4]. They then integrate the internal microbiota composed of commensals and symbiotic microorganisms as well as other pathogens potentially [5,17].

Almost all collected ticks were identified as *I. ricinus*, which is in good agreement with previous studies conducted in France [32,34,78]. The number of adult ticks (n = 29) represented 9.2% of our overall collection which was much lower than the number of nymphs collected (n = 315). This is in line with other studies that have employed a dragging protocol to collect questing ticks [78–80]. We chose to study *I. ricinus* nymphs only for three main reasons. Firstly, when collecting questing ticks using dragging, which is one of the most commonly used methods, the number of nymphs collected has always been reported higher than the number of adults [78,81,82]. Secondly, even though depending on many factors, researchers pointed that there are more chances to get bitten by *I. ricinus* nymphs rather than by adults at recreational sites [83]. Finally, nymphs were also described to be the principal vectors that transmit *Borreliella* to humans in Europe [84]. This analysis was performed at the individual level to also determine the importance of inter-individual variations and to investigate whether it is possible to define a core microbiota. Studies regarding the total microbial composition in ticks are scarce. In particular, many studies have focused on the detection of pathogens by molecular methods such as PCR and qPCR [32,33,78,85]. These methods, while robust, do not detect total bacterial diversity inside ticks. With the expansion and improvement of sequencing methods at lower costs, systematic sequencing of samples might be an alternative to study the total microbiota rather than focusing on pathogens only. This is especially important since numerous microbial interactions have been proven to occur inside the tick gut [5,17].

To access the internal microbiota of these ticks by metabarcoding 16S, several elements had to be taken into consideration. Intra-nymph microbiota analysis is challenging due to the low biomass of the samples. In such samples, contaminants can account for a large portion of all sequences if not treated carefully [86]. It is also necessary to get rid of the contamination introduced by all the elements associated with the cuticle, such as external flora and DNA. A recent bleach-based cuticular disinfection was shown to be efficient in removing cuticular bacterial DNA without impacting the internal bacterial diversity hosted by ticks [50]. The number of sequences for each sample is also drastically reduced when compared to ethanol-based disinfection as only internal microbiota is kept. As recently underlined, all this information raises questions about the real intra-tick bacterial diversity [28,86].

From 826,697 reads from 180 individuals, we dropped to 203,857 (175 individuals) after quality analysis, which is an average of 1165 reads per individual. It is important to point out that ticks are arthropods harboring not only bacteria but also protists and parasitoids that can themselves be infected by bacteria. It has been shown that genera such as *Wolbachia* and *Arsenophonus* detected in ticks arise most likely from parasitoid infection

rather than belonging to the tick microbiota itself [87,88]. In this study, reads assigned to *Wolbachia* and *Arsenophonus* represent 1.40% and 0.76% of the total, respectively.

A core microbiota was defined at the sampling site scale. It was composed of 156 taxa and accounted for 192,585/203,857 reads (94.47%). In this core microbiota, an important number of reads (149,385) were assigned to only twenty taxa, of which the most abundant is *Ralstonia* spp. The presence of *Ralstonia* spp. in ticks has already been documented but remains scarce in literature [21,89,90]. This genus contains species omnipresent in soils and humid environments [91]. Therefore, they can be in contact with ticks during their natural cycle. However, it is surprising to find them at such a high abundance within our samples, given that the bleach-based cuticle disinfection protocol allows the removal of external bacteria and DNA. *Candidatus Midichloria mitochondrii* is the second most prevalent genera identified in our samples. It has been described as an intramitochondrial endosymbiont infecting *I. ricinus* females [92]. This bacterium is vertically transmitted to the offspring [93], which explains the high abundance found in individual nymphs. The roles played by this bacterium are still unknown, yet several hypotheses are considered [28,94]. In 2018, a study highlighted the role of *C. Midichloria mitochondrii* in the growth of *Rickettsia parkeri* (a pathogenic species of *Rickettsia*) in *Amblyomma maculatum* [95]. It must be noted that *C. Midichloria mitochondrii* is not as prevalent in *A. maculatum* as it is in *I. ricinus*. Both *Ralstonia* spp. and *C. Midichloria mitochondrii* are also members of the individual core bacterial microbiota defined in this study. This internal core microbiota is composed of twenty-one taxa present in at least 50% of nymphs. However, it is challenging to define a universal core bacterial microbiota in ticks since its composition relies on numerous factors.

Among the sequences assigned to the most abundant genera, high percentages of sequences were assigned to *Borreliella* (1.76%) and *Rickettsia* (4.19%), bacterial genera known to contain pathogenic species. A total of 603 bacterial genera were unambiguously identified in the dataset, indicating that the *I. ricinus* internal microbiota contains a few abundant bacterial genera associated with a highly diverse but poorly represented bacterial community. Interestingly, reads assigned to the genus *Legionella* were also retrieved in low abundance (0.06%). Only a couple of studies have observed the presence of reads belonging to this genus in tick samples. One is a metagenomic analysis of the pathobiome of *Haemaphysalis longicornis* (adults, nymphs and larvae) collected on Staten Island in the United States [96], and the other is a pyrosequencing analysis of the microbiota of *Hyalomma* [97]. This is of interest since several species are known to be pathogenic to humans [98]. Moreover, these bacteria and their natural vectors (phagotrophic protists) are ubiquitous in humid soils and thus can share a common habitat with ticks that are sensitive to desiccation and require an important hygrometry [99]. It is not yet possible to tell whether ticks are able to vectorize the protist and/or *Legionella* or not. In our study, 27.43% of individuals were positive for *Rickettsia*. Prevalence rates of *Rickettsia* positive ticks reported in the literature are variable. Overall, the rate retrieved in our study seems higher than the prevalence reported in other studies [100,101]. In general, *Rickettsia* detection is carried out using specific molecular amplification by PCR and qPCR. Such targeted methods can limit the detection of certain species of *Rickettsia*, resulting in a lower prevalence rate. On the contrary, using global amplification as conducted in this study can induce false positives (especially for individuals harboring few reads assigned to *Rickettsia*) and thus overestimating the prevalence rate.

In this study, a specific focus was made on *Borreliella* since LD is the most widespread vector-borne disease in the Northern Hemisphere. Here, 20 nymphs (11.4%) were positive for *Borreliella*. A phylogenetic analysis, including all 16S rRNA coding gene reads from reference strains of *Borreliella*, allowed the assignment of ASVs to one of the four clusters consisting of one or two genospecies. The most prevalent genospecies found in this study was *B. afzelii*, with 15 infected nymphs (8.57%). *B. burgdorferi ss/B. bissetti*, *B. garinii/B. lusitaniae* and *B. spielmanii/B. valaisiana* were the others genospecies identified but in lower abundance. Numerous studies about *I. ricinus* infected by *Borreliella* have been carried out over the last decades, generating hundreds of scientific articles on the matter

with thousands of ticks analyzed. Several meta-analysis studies have been published, compiling published data over a 34 years period (1984–2017) [48,102–104]. It clearly appears that the infection rate of ticks depends on the life stage considered. For nymphs, the infection rate was between 10.8% [104] and 11.8% [48], which is consistent with the infection rate found in our study. Our data are also in agreement with previous studies highlighting a *B. afzelii* infection rate of around 9% in field-collected *I. ricinus* (both adults and nymphs) [32,33]. Moreover, the most prevalent genospecies in Europe are *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. valaisiana* [102], three of the four genera retrieved in our dataset. Co-infection of *I. ricinus* with several bacteria, whether they are pathogenic or not, is a field of growing interest since the emergence of the pathobiome concept [105]. Ticks harbor a wide diversity of microorganisms, legitimating the fact that they can vectorize several pathogens at the same time. This could represent health concerns in the context of co-transmissions to humans. Here, reads assigned to at least two different *Borreliella* clusters were found in 11 individuals (11/20; 55%). *B. afzelii* and *B. garinii*/*B. lusitaniae* together with *B. burgdorferi ss*/*B. bissetti* and *B. garinii*/*B. lusitaniae* were the most co-detected partners (3/11 each). In addition, one case of triple co-detection and one case of quadruple co-detection were observed. Few studies focusing on pathogens detection in *I. ricinus* have found high rates of co-infection with at least two pathogens [32,33]. Among them, co-infections with at least two species of *Borreliella* were the most prevalent, especially between *B. afzelii* and *B. garinii*. It should be stressed that adult ticks were included in both studies, so they have an extra blood meal and therefore more chances to carry pathogens. This could be an explanation for the higher co-infection prevalence they describe. However, co-detections of several *Borreliella* genospecies in nymphs are intriguing. Studies about *Borreliella* infection in animals have previously highlighted preferential hosts depending on the genospecies [106,107]. *B. garinii* is commonly found in birds, whereas *B. afzelii* is more commonly detected in rodents. However, co-infections by two or more *Borreliella* in nymphs are contradictory to these results. Since questing nymphs only had one blood meal, if co-infections are detected at this life stage, they most likely arise from a co-infection in the host on which the blood meal was taken or by co-feeding. The latest has been proven to be a direct tick-to-tick mode of bacterial transmission [4]. If larvae feed alongside already infected ticks, they can be infected with multiple pathogens during a single blood meal, resulting in co-infections in the nymphal stage.

5. Conclusions

To conclude, this study, carried out on nearly 200 nymphs collected at different locations, allowed us to describe the internal bacterial microbiota of each individual and also to define a core microbiota of 156 taxa. The inter-individual variations observed depend only slightly on the sampling site. Finally, one nymph out of ten collected carried *Borreliella* sp. At least two *Borreliella* genospecies were also co-detected in 55% of infected nymphs, which raises the question of interactions between these bacteria but also of their potential co-transmission to a host. To go further, studies characterizing intra-tick tissue tropism of the co-detected *Borreliella* strains should be carried out.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9071526/s1, Figure S1. Dendrogram drawn based on the Bray-Curtis dissimilarity index. Bacterial diversity in samples written in red most likely arise from experimental contaminants. These samples were removed from the dataset for further analysis; Figure S2. Rarefaction curves of all individuals based on (a) number of observed ASVs; (b) Shannon H index. All samples are represented as a single bar and colored based on the sampling site. All curves reached a plateau for sequencing depths higher than 2500 reads; Figure S3. Violin plot of alpha diversity metrics. (a) Shannon H index; (b) Shannon evenness index; (c) Number of observed ASVs. All individuals from each sampling site were included to generate the violin plots; Figure S4. Krona chart of the core microbiota defined in this study. The diagram was generated using the 156 taxa found at least once at each sampling site. The relative abundance of each taxa was calculated by

dividing the number of reads affiliated to each taxon by the total number of reads (203,857) and are presented as percentages.

Author Contributions: Conceptualization, A.A., A.C., J.-M.B., V.D. and J.V.; methodology, A.A., A.C., S.B., V.D. and J.V.; software, A.A. and V.D.; formal analysis; A.A., V.D. and J.V.; writing—original draft preparation: A.A. and J.V.; writing—review and editing: A.A., A.C., J.-M.B., V.D. and J.V.; supervision: V.D. and J.V., project administration: J.V.; funding acquisition: J.-M.B. and J.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the 2015–2020 State-Region Planning Contract and European Regional Development Fund, and intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers. A.A. was supported by a PhD fellowship from the French Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data analyzed in this study are publicly available in the Sequence Read archive of the NCBI under the BioProject ID PRJNA727936.

Acknowledgments: We thank Arnaud Lheureux (UMR CNRS 5805) for his help on the analyses carried out on the R software. We thank Arnaud Lheureux and Laurine Dieudonné for the proofreading.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Anderson, J.F.; Magnarelli, L.A. Biology of Ticks. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2008**, *22*, 195–215. [CrossRef] [PubMed]
2. Boulanger, N.; Boyer, P.; Talagrand-Reboul, E.; Hansmann, Y. Ticks and Tick-Borne Diseases. *Med. Mal. Infect.* **2019**, *49*, 87–97. [CrossRef] [PubMed]
3. Kurokawa, C.; Lynn, G.E.; Pedra, J.H.F.; Pal, U.; Narasimhan, S.; Fikrig, E. Interactions between Borrelia Burgdorferi and Ticks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 587–600. [CrossRef] [PubMed]
4. Voordouw, M.J. Co-Feeding Transmission in Lyme Disease Pathogens. *Parasitology* **2015**, *142*, 290–302. [CrossRef]
5. Greay, T.L.; Gofton, A.W.; Paparini, A.; Ryan, U.M.; Oskam, C.L.; Irwin, P.J. Recent Insights into the Tick Microbiome Gained through Next-Generation Sequencing. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 12. [CrossRef] [PubMed]
6. Andreotti, R.; De León, A.A.P.; Dowd, S.E.; Guerrero, F.D.; Bendele, K.G.; Scoles, G.A. Assessment of Bacterial Diversity in the Cattle Tick Rhipicephalus (Boophilus) Microplus through Tag-Encoded Pyrosequencing. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 6. [CrossRef] [PubMed]
7. Díaz-Sánchez, S.; Estrada-Peña, A.; Cabezas-Cruz, A.; de la Fuente, J. Evolutionary Insights into the Tick Hologenome. *Trends Parasitol.* **2019**, *35*, 725–737. [CrossRef] [PubMed]
8. Díaz-Sánchez, S.; Fernández, A.M.; Habela, M.A.; Calero-Bernal, R.; de Mera, I.G.F.; de la Fuente, J. Microbial Community of Hyalomma Lusitanicum Is Dominated by Francisella-like Endosymbiont. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2021**, *12*, 101624. [CrossRef]
9. Binetruy, F.; Buysse, M.; Lejarre, Q.; Barosi, R.; Villa, M.; Rahola, N.; Paupy, C.; Ayala, D.; Duron, O. Microbial Community Structure Reveals Instability of Nutritional Symbiosis during the Evolutionary Radiation of Amblyomma Ticks. *Mol. Ecol.* **2020**, *29*, 1016–1029. [CrossRef]
10. Gomard, Y.; Flores, O.; Vittecoq, M.; Blanchon, T.; Toty, C.; Duron, O.; Mavingui, P.; Tortosa, P.; McCoy, K.D. Changes in Bacterial Diversity, Composition and Interactions During the Development of the Seabird Tick Ornithodoros Maritimus (Argasidae). *Microb. Ecol.* **2021**, *81*, 770–783. [CrossRef]
11. Landesman, W.J.; Mulder, K.; Page Fredericks, L.; Allan, B.F. Cross-Kingdom Analysis of Nymphal-Stage Ixodes Scapularis Microbial Communities in Relation to Borrelia Burgdorferi Infection and Load. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2019**, *95*, fiz167. [CrossRef] [PubMed]
12. Perveen, N.; Muzaffar, S.B.; Vijayan, R.; Al-Deeb, M.A. Microbial Communities Associated with the Camel Tick, Hyalomma Dromedarii: 16S RRNA Gene-Based Analysis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17035. [CrossRef] [PubMed]
13. van Treuren, W.; Ponnusamy, L.; Brinkerhoff, R.J.; Gonzalez, A.; Parobek, C.M.; Juliano, J.J.; Andreadis, T.G.; Falco, R.C.; Ziegler, L.B.; Hathaway, N.; et al. Variation in the Microbiota of Ixodes Ticks with Regard to Geography, Species, and Sex. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 6200–6209. [CrossRef]
14. Zhang, R.; Yu, G.; Huang, Z.; Zhang, Z. Microbiota Assessment across Different Developmental Stages of Dermacentor Silvarum (Acari: Ixodidae) Revealed Stage-Specific Signatures. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2020**, *11*, 101321. [CrossRef] [PubMed]
15. Pollet, T.; Sprong, H.; Lejal, E.; Krawczyk, A.I.; Moutailler, S.; Cosson, J.F.; Vayssier-Taussat, M.; Estrada-Peña, A. The Scale Affects Our View on the Identification and Distribution of Microbial Communities in Ticks. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 36. [CrossRef]
16. Narasimhan, S.; Fikrig, E. Tick Microbiome: The Force Within. *Trends Parasitol.* **2015**, *31*, 315–323. [CrossRef]

17. Bonnet, S.I.; Binetruy, F.; Hernández-Jarguín, A.M.; Duron, O. The Tick Microbiome: Why Non-Pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 236. [CrossRef] [PubMed]
18. Duron, O.; Binetruy, F.; Noël, V.; Cremaschi, J.; McCoy, K.D.; Arnathau, C.; Plantard, O.; Goolsby, J.; Pérez de León, A.A.; Heylen, D.J.A.; et al. Evolutionary Changes in Symbiont Community Structure in Ticks. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 2905–2921. [CrossRef] [PubMed]
19. Duron, O.; Morel, O.; Noël, V.; Buysse, M.; Binetruy, F.; Lancelot, R.; Loire, E.; Ménard, C.; Bouchez, O.; Vavre, F.; et al. Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 1896–1902. [CrossRef]
20. Smith, T.A.; Driscoll, T.; Gillespie, J.J.; Raghavan, R. A Coxiella-like Endosymbiontis a Potential Vitamin Source for the Lone Star Tick. *Genome Biol. Evol.* **2015**, *7*, 831–838. [CrossRef]
21. Thapa, S.; Zhang, Y.; Allen, M.S. Effects of Temperature on Bacterial Microbiome Composition in Ixodes Scapularis Ticks. *Microbiologyopen* **2018**, *8*, e719. [CrossRef] [PubMed]
22. Brinkerhoff, R.J.; Clark, C.; Ocasio, K.; Gauthier, D.T.; Hynes, W.L. Factors Affecting the Microbiome of Ixodes Scapularis and Amblyomma Americanum. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232398. [CrossRef]
23. Hawlena, H.; Rynkiewicz, E.; Toh, E.; Alfred, A.; Durden, L.A.; Hastriter, M.W.; Nelson, D.E.; Rong, R.; Munro, D.; Dong, Q.; et al. The Arthropod, but Not the Vertebrate Host or Its Environment, Dictates Bacterial Community Composition of Fleas and Ticks. *ISME J.* **2013**, *7*, 221–223. [CrossRef] [PubMed]
24. Zolnik, C.P.; Prill, R.J.; Falco, R.C.; Daniels, T.J.; Kolokotronis, S.O. Microbiome Changes through Ontogeny of a Tick Pathogen Vector. *Mol. Ecol.* **2016**, *25*, 4963–4977. [CrossRef]
25. Obregón, D.; Bard, E.; Abrial, D.; Estrada-Peña, A.; Cabezas-Cruz, A. Sex-Specific Linkages Between Taxonomic and Functional Profiles of Tick Gut Microbiomes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 298. [CrossRef] [PubMed]
26. Aivelo, T.; Norberg, A.; Tschirren, B. Bacterial Microbiota Composition of Ixodes Ricinus Ticks: The Role of Environmental Variation, Tick Characteristics and Microbial Interactions. *PeerJ* **2019**, *2019*, e8217. [CrossRef] [PubMed]
27. Abraham, N.M.; Liu, L.; Jutras, B.L.; Yadav, A.K.; Narasimhan, S.; Gopalakrishnan, V.; Ansari, J.M.; Jefferson, K.K.; Cava, F.; Jacobs-Wagner, C.; et al. Pathogen-Mediated Manipulation of Arthropod Microbiota to Promote Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E781–E790. [CrossRef]
28. Bonnet, S.I.; Pollet, T. Update on the Intricate Tango between Tick Microbiomes and Tick-Borne Pathogens. *Parasite Immunol.* **2021**, *43*, e12813. [CrossRef]
29. Narasimhan, S.; Nallakkandi, R.; Liu, L.; Zhao, Y.O.; Heisig, J.; Pan, J.; Eppler-Epstein, R.; DePonte, K.; Fish, D.; Fikrig, E. Gut Microbiota of the Tick Vector Ixodes Scapularis Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 58–71. [CrossRef]
30. Narasimhan, S.; Schuijt, T.J.; Abraham, N.M.; Rajeevan, N.; Coumou, J.; Graham, M.; Robson, A.; Wu, M.J.; Daffre, S.; Hovius, J.W.; et al. Modulation of the Tick Gut Milieu by a Secreted Tick Protein Favors Borrelia Burgdorferi Colonization. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 184. [CrossRef]
31. Dunn, J.M.; Krause, P.J.; Davis, S.; Vannier, E.G.; Fitzpatrick, M.C.; Rollend, L.; Belperron, A.A.; States, S.L.; Stacey, A.; Bockenstedt, L.K.; et al. Borrelia Burgdorferi Promotes the Establishment of Babesia Microti in the Northeastern United States. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115494. [CrossRef]
32. Moutailler, S.; Valiente Moro, C.; Vaumourin, E.; Michelet, L.; Tran, F.H.; Devillers, E.; Cosson, J.F.; Gasqui, P.; Van, V.T.; Mavingui, P.; et al. Co-Infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004539. [CrossRef]
33. Raileanu, C.; Moutailler, S.; Pavel, I.; Porea, D.; Mihalca, A.D.; Savuta, G.; Vayssier-Taussat, M. Borrelia Diversity and Co-Infection with Other Tick Borne Pathogens in Ticks. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 36. [CrossRef]
34. Cosson, J.F.; Michelet, L.; Chotte, J.; Le Naour, E.; Cote, M.; Devillers, E.; Poulle, M.L.; Huet, D.; Galan, M.; Geller, J.; et al. Genetic Characterization of the Human Relapsing Fever Spirochete Borrelia Miyamotoi in Vectors and Animal Reservoirs of Lyme Disease Spirochetes in France. *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 233. [CrossRef] [PubMed]
35. Tokarz, R.; Tagliafierro, T.; Sameroff, S.; Cucura, D.M.; Oleynik, A.; Che, X.; Jain, K.; Lipkin, W.I. Microbiome Analysis of Ixodes Scapularis Ticks from New York and Connecticut. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2019**, *10*, 894–900. [CrossRef] [PubMed]
36. Jahfari, S.; Hofhuis, A.; Fonville, M.; van der Giessen, J.; van Pelt, W.; Sprong, H. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Humans with Tick Bites and Erythema Migrans, in the Netherlands. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005042. [CrossRef] [PubMed]
37. Parveen, N.; Bhanot, P. Babesia Microti-Borrelia Burgdorferi. *Pathogens* **2019**, *8*, 117. [CrossRef]
38. Cabezas-Cruz, A.; Vayssier-Taussat, M.; Greub, G. Tick-Borne Pathogen Detection: What's New? *Microbes Infect.* **2018**, *20*, 441–444. [CrossRef]
39. Cutler, S.J.; Vayssier-Taussat, M.; Estrada-Peña, A.; Potkonjak, A.; Mihalca, A.D.; Zeller, H. Tick-Borne Diseases and Co-Infection: Current Considerations. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2021**, *12*, 101607. [CrossRef]
40. Sykes, R.A.; Makiello, P. An Estimate of Lyme Borreliosis Incidence InWestern Europe. *J. Public Heal.* **2017**, *39*, 74–81. [CrossRef]
41. Centers for Disease Control and Prevention Lyme Disease Data and Surveillance. Available online: https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/recent-surveillance-data.html (accessed on 12 May 2021).
42. Eisen, R.J.; Eisen, L.; Beard, C.B. County-Scale Distribution of Ixodes Scapularis and Ixodes Pacificus (Acari: Ixodidae) in the Continental United States. *J. Med. Entomol.* **2016**, *53*, 349–386. [CrossRef]

43. Steere, A.C.; Strle, F.; Wormser, G.P.; Hu, L.T.; Branda, J.A.; Hovius, J.W.; Li, X.; Mead, P.S. Lyme Borreliosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 16090. [CrossRef]
44. Barbour, A.G.; Adeolu, M.; Gupta, R.S. Division of the Genus Borrelia into Two Genera (Corresponding to Lyme Disease and Relapsing Fever Groups) Reflects Their Genetic and Phenotypic Distinctiveness and Will Lead to a Better Understanding of These Two Groups of Microbes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 2058–2067. [CrossRef] [PubMed]
45. Pritt, B.S.; Respicio-Kingry, L.B.; Sloan, L.M.; Schriefer, M.E.; Replogle, A.J.; Bjork, J.; Liu, G.; Kingry, L.C.; Mead, P.S.; Neitzel, D.F.; et al. Borrelia Mayonii Sp. Nov., a Member of the Borrelia Burgdorferi Sensu Lato Complex, Detected in Patients and Ticks in the Upper Midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 4878–4880. [CrossRef]
46. Stanek, G.; Fingerle, V.; Hunfeld, K.-P.; Jaulhac, B.; Kaiser, R.; Krause, A.; Kristoferitsch, W.; O'Connell, S.; Ornstein, K.; Strle, F.; et al. Lyme Borreliosis: Clinical Case Definitions for Diagnosis and Management in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 69–79. [CrossRef]
47. Stanek, G.; Wormser, G.P.; Gray, J.; Strle, F. Lyme Borreliosis. *Lancet* **2012**, *379*, 461–473. [CrossRef]
48. Strnad, M.; Hönig, V.; Ruužek, D.; Grubhoffer, L.; Rego, R.O. Europe-Wide Meta-Analysis of Borrelia Burgdorferi Sensu Lato Prevalence in Questing Ixodes Ricinus Ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e00609-17. [CrossRef] [PubMed]
49. Pérez-Eid, C. *Les Tiques: Identification, Biologie, Importance Médicale et Vétérinaire*; Tec & Doc Lavoisier, Ed.; Lavoisier: Paris, France, 2007.
50. Binetruy, F.; Dupraz, M.; Buysse, M.; Duron, O. Surface Sterilization Methods Impact Measures of Internal Microbial Diversity in Ticks. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 268. [CrossRef]
51. Baker, G.C.; Smith, J.J.; Cowan, D.A. Review and Re-Analysis of Domain-Specific 16S Primers. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *55*, 541–555. [CrossRef] [PubMed]
52. Herlemann, D.P.R.; Labrenz, M.; Jürgens, K.; Bertilsson, S.; Waniek, J.J.; Andersson, A.F. Transitions in Bacterial Communities along the 2000 Km Salinity Gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* **2011**, *5*, 1571–1579. [CrossRef]
53. Perrin, Y.; Bouchon, D.; Delafont, V.; Moulin, L.; Héchard, Y. Microbiome of Drinking Water: A Full-Scale Spatio-Temporal Study to Monitor Water Quality in the Paris Distribution System. *Water Res.* **2019**, *149*, 375–385. [CrossRef]
54. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [CrossRef]
55. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [CrossRef]
56. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584. [CrossRef]
57. Barrett, T.; Beck, J.; Benson, D.A.; Bollin, C.; Bolton, E.; Bourexis, D.; Brister, J.R.; Bryant, S.H.; Canese, K.; Clark, K.; et al. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D6–D17. [CrossRef]
58. Davis, N.M.; Proctor, D.M.; Holmes, S.P.; Relman, D.A.; Callahan, B.J. Simple Statistical Identification and Removal of Contaminant Sequences in Marker-Gene and Metagenomics Data. *BioRxiv* **2018**, 1–39. [CrossRef] [PubMed]
59. Pebesma, E.; Bivand, R.S. Classes and Methods for Spatial Data in R. *R News* **2005**, *5*, 9–13.
60. South, A. Rnaturalearth: World Map Data from Natural Earth. 2017. Available online: https://CRAN-R-project.org/package=rnaturalearth (accessed on 13 April 2021).
61. Becker, R.A.; Wilks, A.R. Maps: Draw Geographical Maps. 2018. Available online: https://CRAN-R-project.org/package=maps (accessed on 13 April 2021).
62. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef] [PubMed]
63. Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.; François, R.; Grolemund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J.; et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **2019**, *4*, 1686. [CrossRef]
64. Oksanen, A.J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; Mcglinn, D.; Minchin, P.R.; Hara, R.B.O.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; et al. *Vegan: Community Ecology Package*; 2020. Available online: https://Cran-R-project.org/package=vegan (accessed on 11 January 2021).
65. Kindt, R.; Coe, R. *Tree Diversity Analysis; A Manual and Software for Common Statistical Methods for Ecological and Biodiversity Studies*; 2005. Available online: https://www.worldagroforestry.org/iutput/tree-diversity-analysis (accessed on 11 January 2021).
66. Venables, W.; Ripley, B. *Modern Applied Statistics with S.*, 4th ed.; Springer: New York, NY, USA, 2002; ISBN 0-387-95457-0.
67. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: New York, NY, USA, 2016; ISBN 978-3-319-24277-4.
68. Ondov, B.D.; Bergman, N.H.; Phillippy, A.M. Interactive Metagenomic Visualization in a Web Browser. *BMC Bioinform.* **2011**, *12*, 385. [CrossRef] [PubMed]
69. Heberle, H.; Meirelles, V.G.; da Silva, F.R.; Telles, G.P.; Minghim, R. InteractiVenn: A Web-Based Tool for the Analysis of Sets through Venn Diagrams. *BMC Bioinform.* **2015**, *16*, 169. [CrossRef]
70. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [CrossRef] [PubMed]
71. Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B.Q.; Wong, T.K.F.; Von Haeseler, A.; Jermiin, L.S. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 587–589. [CrossRef]

72. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; Von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2014**, *32*, 268–274. [CrossRef] [PubMed]
73. Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [CrossRef] [PubMed]
74. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (ITOL) v4: Recent Updates and New Developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 256–259. [CrossRef] [PubMed]
75. Gil, J.C.; Helal, Z.H.; Risatti, G.; Hird, S.M. Ixodes Scapularis Microbiome Correlates with Life Stage, Not the Presence of Human Pathogens, in Ticks Submitted for Diagnostic Testing. *PeerJ* **2020**, *8*, e10424. [CrossRef]
76. Erb-Downward, J.R.; Falkowski, N.R.; D'souza, J.C.; McCloskey, L.M.; McDonald, R.A.; Brown, C.A.; Shedden, K.; Dickson, R.P.; Freeman, C.M.; Stringer, K.A.; et al. Critical Relevance of Stochastic Effects on Low-Bacterialbiomass 16s Rrna Gene Analysis. *MBio* **2020**, *11*, e00258-20. [CrossRef]
77. Salter, S.J.; Cox, M.J.; Turek, E.M.; Calus, S.T.; Cookson, W.O.; Moffatt, M.F.; Turner, P.; Parkhill, J.; Loman, N.J.; Walker, A.W. Reagent and Laboratory Contamination Can Critically Impact Sequence-Based Microbiome Analyses. *BMC Biol.* **2014**, *12*, 87. [CrossRef]
78. Akl, T.; Bourgoin, G.; Souq, M.L.; Appolinaire, J.; Poirel, M.T.; Gibert, P.; Abi Rizk, G.; Garel, M.; Zenner, L. Detection of Tick-Borne Pathogens in Questing Ixodes Ricinus in the French Pyrenees and First Identification of Rickettsia Monacensis in France. *Parasite* **2019**, *26*, 20. [CrossRef]
79. Hvidsten, D.; Frafjord, K.; Gray, J.S.; Henningsson, A.J.; Jenkins, A.; Kristiansen, B.E.; Lager, M.; Rognerud, B.; Slåtsve, A.M.; Stordal, F.; et al. The Distribution Limit of the Common Tick, Ixodes Ricinus, and Some Associated Pathogens in North-Western Europe. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2020**, *11*, 101388. [CrossRef] [PubMed]
80. Kjellander, P.L.; Aronsson, M.; Bergvall, U.A.; Carrasco, J.L.; Christensson, M.; Lindgren, P.E.; Åkesson, M.; Kjellander, P. Validating a Common Tick Survey Method: Cloth-Dragging and Line Transects. *Exp. Appl. Acarol.* **2021**, *83*, 131–146. [CrossRef] [PubMed]
81. Rulison, E.L.; Kuczaj, I.; Pang, G.; Hickling, G.J.; Tsao, J.I.; Ginsberg, H.S. Flagging versus Dragging as Sampling Methods for Nymphal Ixodes Scapularis (Acari: Ixodidae). *J. Vector Ecol.* **2013**, *38*, 163–167. [CrossRef] [PubMed]
82. Blazejak, K.; Janecek, E.; Strube, C. A 10-Year Surveillance of Rickettsiales (Rickettsia Spp. and Anaplasma Phagocytophilum) in the City of Hanover, Germany, Reveals Rickettsia Spp. as Emerging Pathogens in Ticks. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 588. [CrossRef]
83. Dobson, A.D.M.; Taylor, J.L.; Randolph, S.E. Tick (Ixodes Ricinus) Abundance and Seasonality at Recreational Sites in the UK: Hazards in Relation to Fine-Scale Habitat Types Revealed by Complementary Sampling Methods. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2011**, *2*, 67–74. [CrossRef]
84. Matuschka, F.-R.; Fischer, P.; Heiler, M.; Blümcke, S.; Spielman, A. Stage-Associated Risk of Transmission of the Lyme Disease Spirochete by European Ixodes Ticks*. *Parasitol. Res.* **1992**, *78*, 695–698. [CrossRef]
85. Grech-Angelini, S.; Stachurski, F.; Vayssier-Taussat, M.; Devillers, E.; Casabianca, F.; Lancelot, R.; Uilenberg, G.; Moutailler, S. Tick-Borne Pathogens in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected from Various Domestic and Wild Hosts in Corsica (France), a Mediterranean Island Environment. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 745–757. [CrossRef]
86. Lejal, E.; Estrada-Peña, A.; Marsot, M.; Cosson, J.F.; Rué, O.; Mariadassou, M.; Midoux, C.; Vayssier-Taussat, M.; Pollet, T. Taxon Appearance From Extraction and Amplification Steps Demonstrates the Value of Multiple Controls in Tick Microbiota Analysis. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1093. [CrossRef]
87. Plantard, O.; Bouju-Albert, A.; Malard, M.A.; Hermouet, A.; Capron, G.; Verheyden, H. Detection of Wolbachia in the Tick Ixodes Ricinus Is Due to the Presence of the Hymenoptera Endoparasitoid Ixodiphagus Hookeri. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30692. [CrossRef]
88. Bohacsova, M.; Mediannikov, O.; Kazimirova, M.; Raoult, D.; Sekeyova, Z. Arsenophonus Nasoniae and Rickettsiae Infection of Ixodes Ricinus Due to Parasitic Wasp Ixodiphagus Hookeri. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149950. [CrossRef]
89. Karim, S.; Budachetri, K.; Mukherjee, N.; Williams, J.; Kausar, A.; Hassan, M.J.; Adamson, S.; Dowd, S.E.; Apanskevich, D.; Arijo, A.; et al. A Study of Ticks and Tick-Borne Livestock Pathogens in Pakistan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005681. [CrossRef]
90. Moreno, C.X.; Moy, F.; Daniels, T.J.; Godfrey, H.P.; Cabello, F.C. Molecular Analysis of Microbial Communities Identified in Different Developmental Stages of Ixodes Scapularis Ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 761–772. [CrossRef]
91. Peeters, N.; Guidot, A.; Vailleau, F.; Valls, M. Ralstonia Solanacearum, a Widespread Bacterial Plant Pathogen in the Post-Genomic Era. *Mol. Plant Pathol.* **2013**, *14*, 651–662. [CrossRef]
92. Sassera, D.; Beninati, T.; Bandi, C.; Bouman, E.A.P.; Sacchi, L.; Fabbi, M.; Lo, N. Candidatus Midichloria Mitochondrii', an Endosymbiont of the Ixodes Ricinus with a Unique Intramitochondrial Lifestyle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 2535–2540. [CrossRef]
93. Lo, N.; Beninati, T.; Sassera, D.; Bouman, E.A.P.; Santagati, S.; Gern, L.; Sambri, V.; Masuzawa, T.; Gray, J.S.; Jaenson, T.G.T.; et al. Widespread Distribution and High Prevalence of an Alpha-Proteobacterial Symbiont in the Tick Ixodes Ricinus. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 1280–1287. [CrossRef]
94. Stavru, F.; Riemer, J.; Jex, A.; Sassera, D. When Bacteria Meet Mitochondria: The Strange Case of the Tick Symbiont Midichloria Mitochondrii†. *Cell. Microbiol.* **2020**, *22*, e13189. [CrossRef]

95. Budachetri, K.; Kumar, D.; Crispell, G.; Beck, C.; Dasch, G.; Karim, S. The Tick Endosymbiont Candidatus Midichloria Mitochondrii and Selenoproteins Are Essential for the Growth of Rickettsia Parkeri in the Gulf Coast Tick Vector. *Microbiome* **2018**, *6*, 1–15. [CrossRef]
96. Tufts, D.M.; Sameroff, S.; Tagliafierro, T.; Jain, K.; Oleynik, A.; VanAcker, M.C.; Diuk-Wasser, M.A.; Lipkin, W.I.; Tokarz, R. A Metagenomic Examination of the Pathobiome of the Invasive Tick Species, Haemaphysalis Longicornis, Collected from a New York City Borough, USA. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2020**, *11*, 101516. [CrossRef]
97. Keskin, A.; Bursali, A.; Snow, D.E.; Dowd, S.E.; Tekin, S. Assessment of Bacterial Diversity in Hyalomma Aegyptium, H. Marginatum and H. Excavatum Ticks through Tag-Encoded Pyrosequencing. *Exp. Appl. Acarol.* **2017**, *73*, 461–475. [CrossRef] [PubMed]
98. Chauhan, D.; Shames, S.R. Pathogenicity and Virulence of Legionella: Intracellular Replication and Host Response. *Virulence* **2021**, *12*, 1122–1144. [CrossRef]
99. Casati, S.; Gioria-Martinoni, A.; Gaia, V. Commercial Potting Soils as an Alternative Infection Source of Legionella Pneumophila and Other Legionella Species in Switzerland. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 571–575. [CrossRef]
100. Remesar, S.; Díaz, P.; Portillo, A.; Santibáñez, S.; Prieto, A.; Díaz-Cao, J.M.; López, C.M.; Panadero, R.; Fernández, G.; Díez-Baños, P.; et al. Prevalence and Molecular Characterization of Rickettsia Spp. in Questing Ticks from North-Western Spain. *Exp. Appl. Acarol.* **2019**, *79*, 267–278. [CrossRef]
101. Katargina, O.; Geller, J.; Ivanova, A.; Värv, K.; Tefanova, V.; Vene, S.; Lundkvist, Å.; Golovljova, I. Detection and Identification of Rickettsia Species in Ixodes Tick Populations from Estonia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2015**, *6*, 689–694. [CrossRef]
102. Estrada-Peña, A.; Cutler, S.; Potkonjak, A.; Vassier-Tussaut, M.; Bortel, W.; Zeller, H.; Fernández-Ruiz, N.; Mihalca, A.D. An Updated Meta-Analysis of the Distribution and Prevalence of Borrelia Burgdorferi s.l. in Ticks in Europe. *Int. J. Health Geogr.* **2018**, *17*, 41. [CrossRef]
103. Estrada-Peña, A.; Ortega, C.; Sánchez, N.; DeSimone, L.; Sudre, B.; Suk, J.E.; Semenza, J.C. Correlation of Borrelia Burgdorferi Sensu Lato Prevalence in Questing Ixodes Ricinus Ticks with Specific Abiotic Traits in the Western Palearctic. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3838–3845. [CrossRef]
104. Rauter, C.; Hartung, T. Prevalence of Borrelia Burgdorferi Sensu Lato Genospecies in Ixodes Ricinus Ticks in Europe: A Metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7203–7216. [CrossRef] [PubMed]
105. Vayssier-Taussat, M.; Kazimirova, M.; Hubalek, Z.; Hornok, S.; Farkas, R.; Cosson, J.F.; Bonnet, S.; Vourc'h, G.; Gasqui, P.; Mihalca, A.D.; et al. Emerging Horizons for Understanding Tick-Borne Pathogens Threat: Shifting from the "One Pathogen-One Disease" Vision to the Pathobiome Paradigm. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 2033–2043. [CrossRef] [PubMed]
106. Franke, J.; Moldenhauer, A.; Hildebrandt, A.; Dorn, W. Are Birds Reservoir Hosts for Borrelia Afzelii? *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2010**, *1*, 109–112. [CrossRef] [PubMed]
107. Gern, L. Borrelia Burgdorferi Sensu Lato, the Agent of Lyme Borreliosis: Life in the Wilds. *Parasite* **2008**, *15*, 244–247. [CrossRef]

Figures supplémentaires

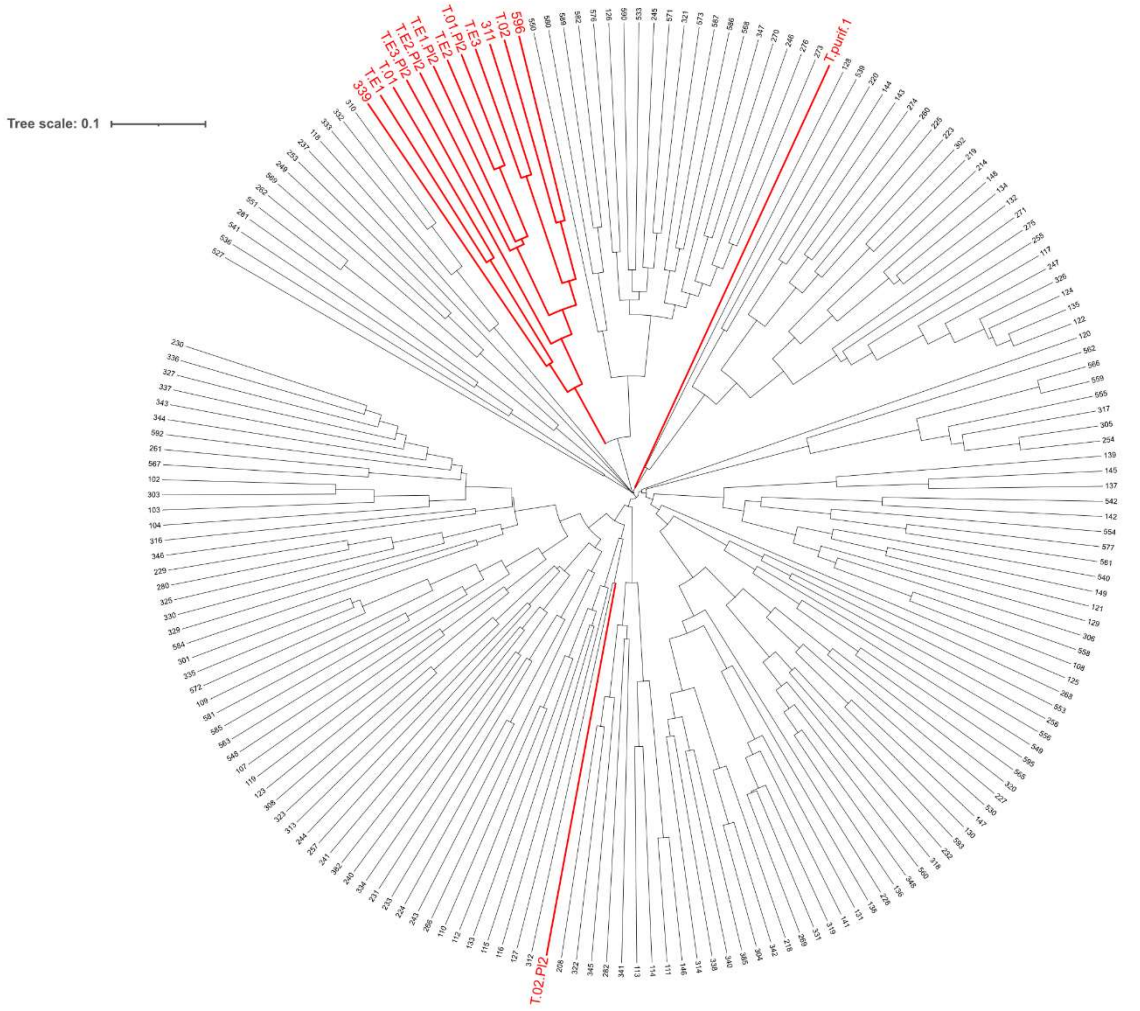

Figure S1. Dendrogram drawn based on the Bray-Curtis dissimilarity index. Bacterial diversity in samples written in red most likely arise from experimental contaminants. These samples were removed from the dataset for further analysis.

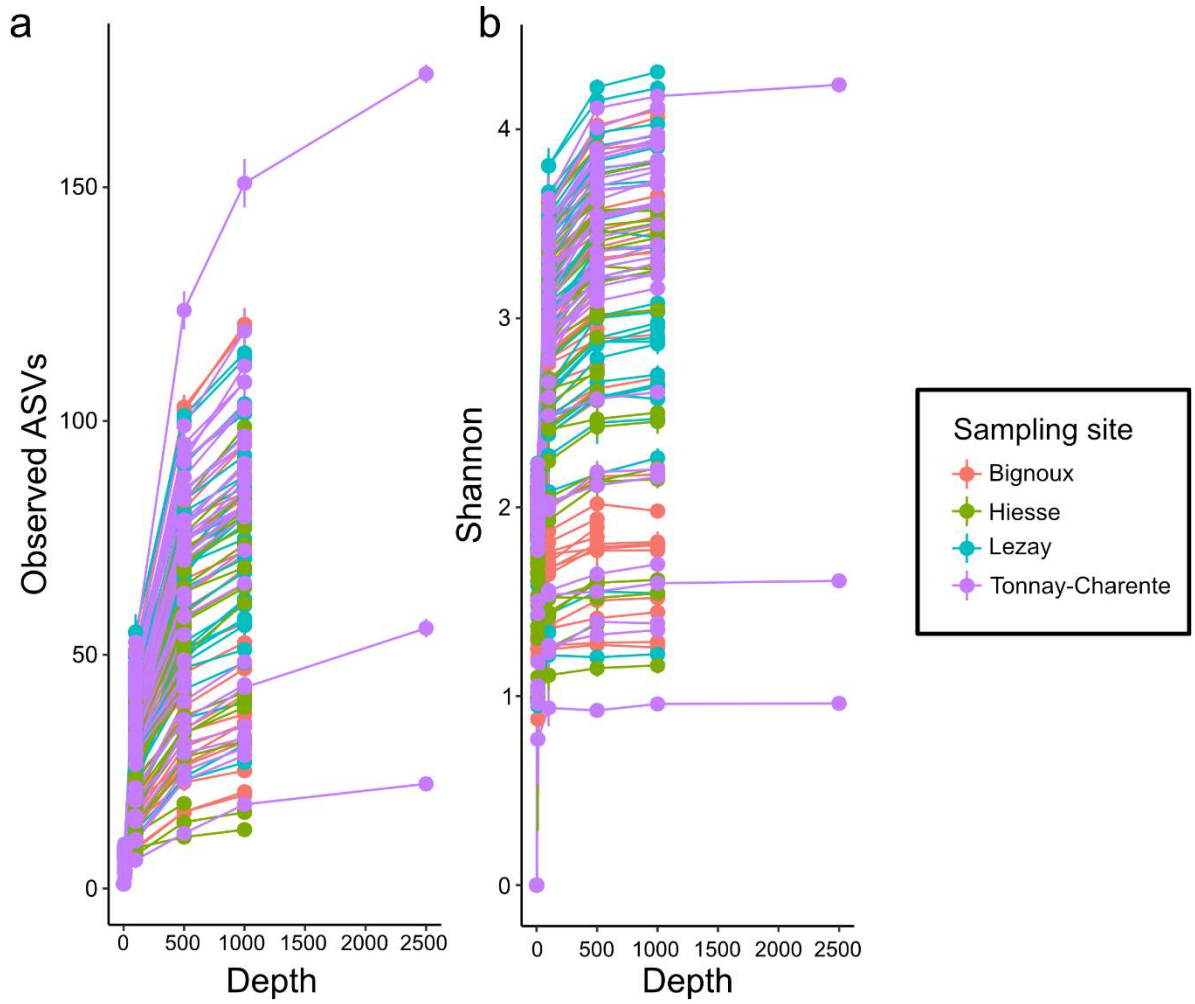

Figure S2. Rarefaction curves of all individuals based on (a) number of observed ASVs; (b) Shannon H index. All samples are represented as a single bar and colored based on the sampling site. All curves reached a plateau for sequencing depths higher than 2500 reads.

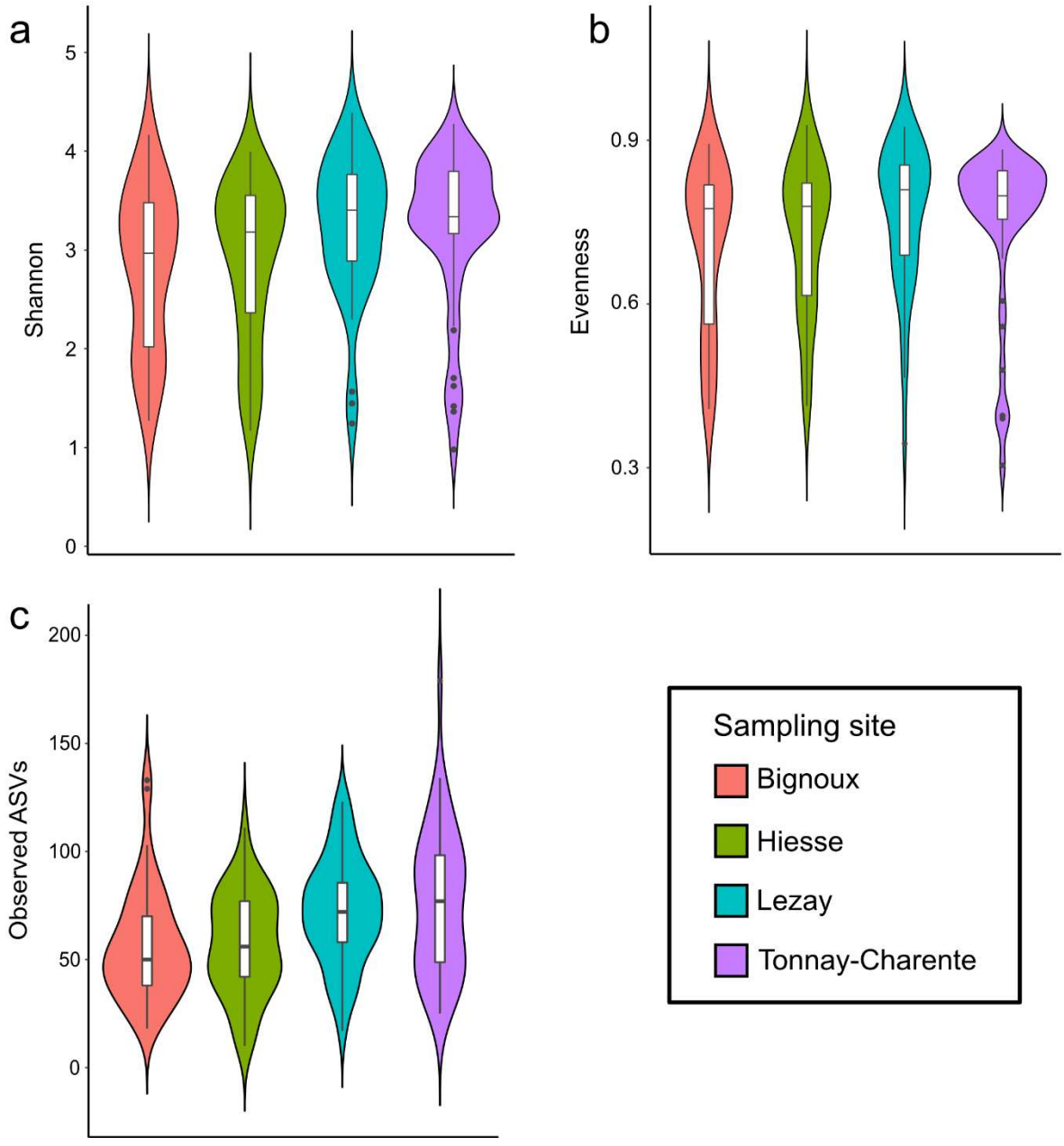

Figure S3. Violin plot of alpha diversity metrics. (a) Shannon H index; (b) Shannon evenness index; (c) Number of observed ASVs. All individuals from each sampling site were included to generate the violin plots.

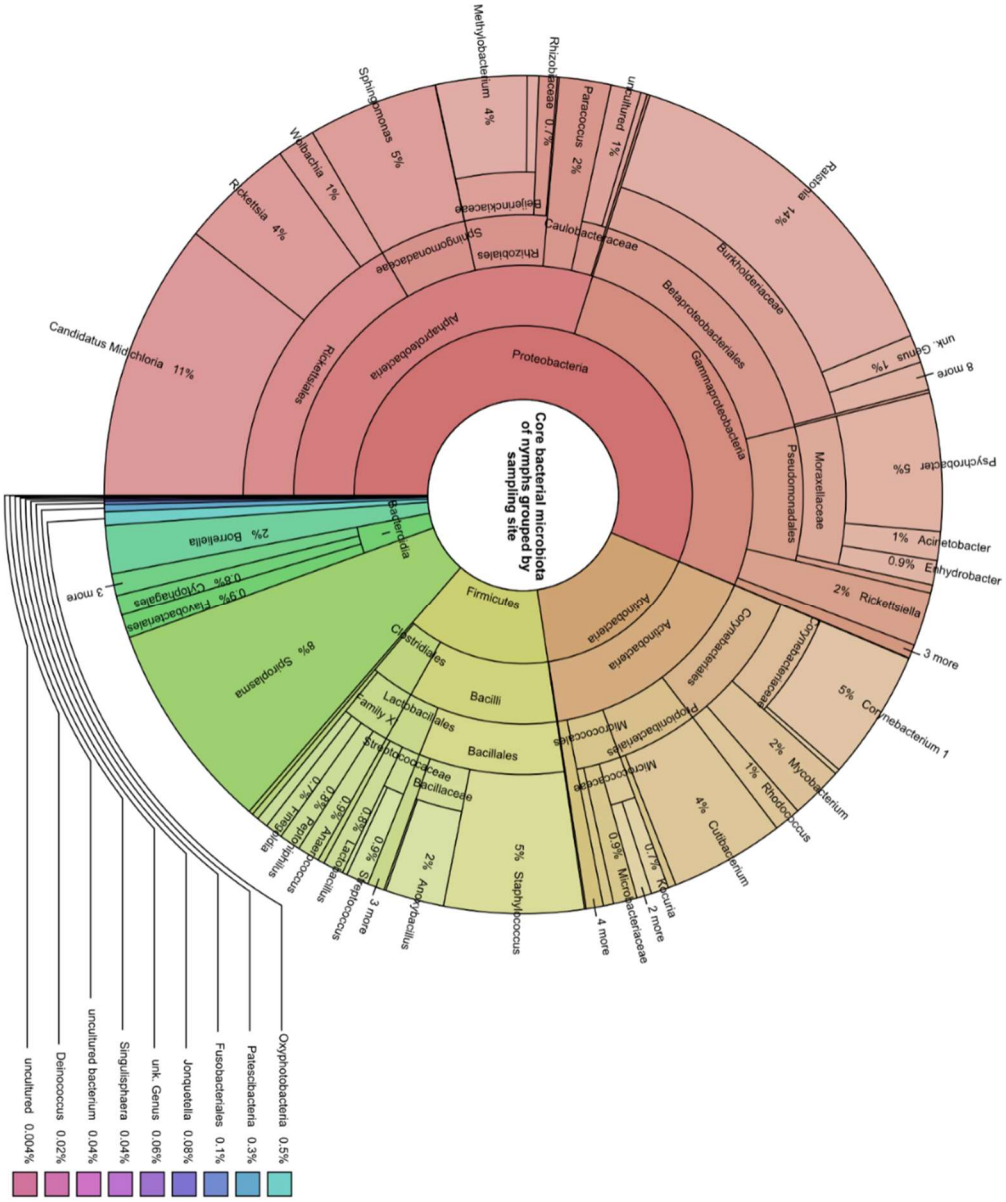

Figure S4. Krona chart of the core microbiota defined in this study. The diagram was generated using the 156 taxa found at least once at each sampling site. The relative abundance of each taxa was calculated by dividing the number of reads affiliated to each taxa by the total number of reads (203,857) and are presented as percentages.

I.2 Données complémentaires

Lorsque les tiques sont traitées à l'eau de javel afin d'éliminer les microorganismes et l'ADN cuticulaire, le nombre et la diversité d'OTU mesurés sont drastiquement réduits par rapport à une désinfection à l'éthanol (Binetruy et al., 2019), bien que ce dernier protocole soit le plus répandu dans la littérature. Afin de compléter les résultats décrits précédemment, des nymphes d'*I. ricinus* ont été observées par microscopie électronique à balayage pour comparer l'impact de ces deux traitements (**Figure 32**). Les traitements réalisés sont les suivants : les individus sont plongés soit dans l'éthanol 70%, soit dans l'eau de javel 1 % pendant 30 secondes. Par la suite, les tiques sont rincées dans des bains d'eau ultra-pure pendant 1 minute. Trois rinçages successifs sont réalisés. Un total de 20 nymphrs d'*I. ricinus* issues du même lieu de prélèvement ont été analysées : dix pour le traitement à l'éthanol et dix autres pour le traitement à l'eau de javel. Cela nous a permis d'observer directement les effets du traitement à l'éthanol (**Figure 32 A, B, C, D**) et de celui à l'eau de javel (**Figure 32 E, F, G, H**) sur la tique entière.

Lorsque le traitement à l'éthanol est appliqué, des structures qui peuvent s'apparenter à des biofilms ou de la matrice extracellulaire bactérienne à la surface de la cuticule ont été observées. Le traitement à l'eau de javel quant à lui semble dégrader, au moins en partie, ces structures (**Figure 32 D, H**). Par conséquent, ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Binetruy et collaborateurs indiquant que le traitement à l'eau de javel permet une meilleure élimination des structures microbiennes à la surface de la tique et donc d'étudier de façon plus spécifique le microbiote interne des tiques (Binetruy et al., 2019)

En revanche, l'action de l'eau de javel semble impacter l'intégrité de la cuticule de la tique. Cette dernière semble plus fragmentée lorsque le traitement à la javel est appliqué par rapport au traitement à l'éthanol (**Figure 32 C, G**). Si l'intégrité de la cuticule est compromise, cela pourrait entraîner un biais dans l'étude de la diversité microbienne interne si l'eau de javel peut entrer à l'intérieur de la tique et ainsi éliminer, au moins en partie, des microorganismes résidents.

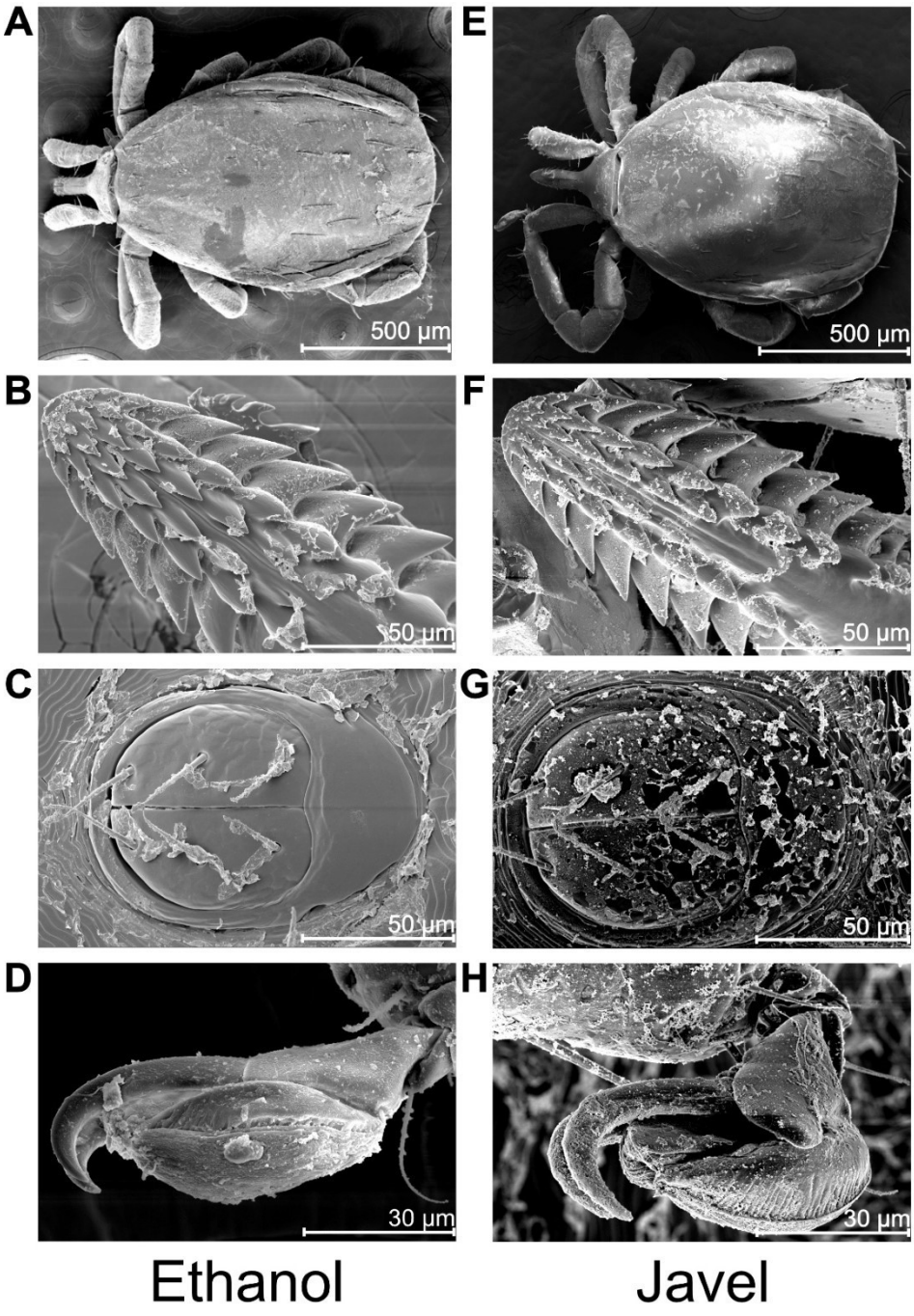

Figure 32 : Comparaison des traitements à l'éthanol et à l'eau de javel sur l'intégrité de la cuticule d'*I. ricinus* et sur les bactéries externes. Les observations ont été réalisées par microscopie électronique à balayage. (A, B, C, D) : nymphes d'*I. ricinus* traitées à l'éthanol ; (E, F, G, H) : nymphes d'*I. ricinus* traitées à l'eau de javel 1%. Les photos ont été prises sur les mêmes organes afin de permettre une comparaison directe. (A & E) Tique entière, (B & F) Rostre, (C & G) Anus, (D & H) Extrémité d'une patte.

Ce traitement ne permet pas de s'affranchir complètement des bactéries et de l'ADN externe présents sur l'arthropode puisque des bactéries dont la membrane est intègre sont observables, malgré le traitement à l'eau de javel (Figure 33). L'utilisation de ce protocole semble tout de même le plus adapté à l'étude de la composition du microbiote interne de la tique puisqu'il permet de s'affranchir des séquences issues des bactéries et de l'ADN cuticulaire. Or, la transmission des pathogènes par les tiques se fait exclusivement par l'intermédiaire de la morsure et ne concerne ainsi que les microorganismes présents au sein du vecteur.

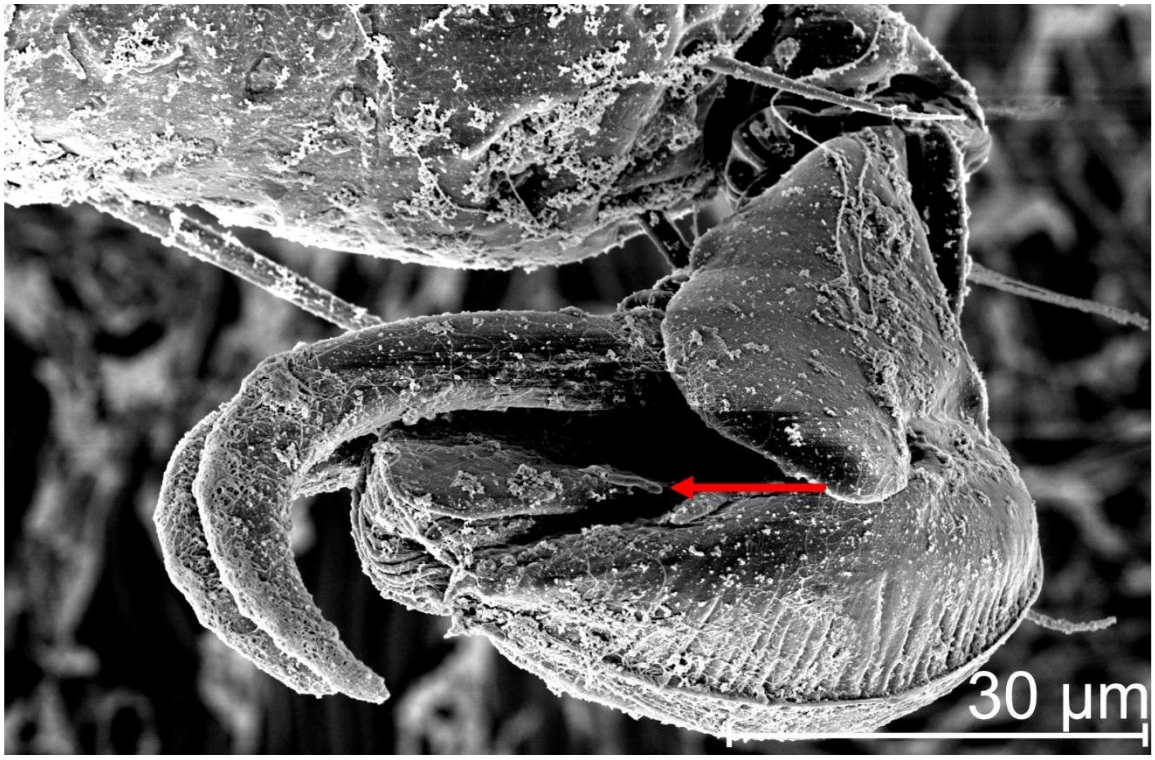

Figure 33 : Observation par microscopie électronique à balayage de l'extrémité d'une patte d'*I. ricinus* traitée à l'eau de javel. L'image ici correspond à un zoom sur la figure 32 H. La flèche rouge indique un bacille dont l'intégrité ne semble pas compromise par le traitement.

En parallèle de l'étude de diversité bactérienne au sein des nymphes d'*I. ricinus*, une étude *in vitro* a été menée. Dans celle-ci, divers outils ont été développés pour caractériser les interactions entre *B. afzelii* et *B. garinii* et également pour étudier la capacité de ces deux espèces à produire AI-2.

II. Etude *in vitro* de *B. afzelii* et *B. garinii*

II.1 Développement d'outils pour l'étude des interactions entre *B. afzelii* et *B. garinii*

II.1.1 Mise en place d'une méthode de qPCR pour la quantification spécifique de *B. afzelii* et *B. garinii*

Les espèces *B. afzelii* et *B. garinii* présentent des différences dans leur cycle de vie, les facteurs de virulence qu'elles produisent, leur classe d'hôtes préférentiels etc. Cependant, elles partagent aussi de nombreuses similitudes, tant génomiques que physiologiques. Ainsi, il n'est pas possible de les discriminer sur la seule base de leur morphologie ou de leur motilité par exemple.

Afin d'étudier de façon spécifique le comportement de *B. afzelii* et *B. garinii* en co-culture, une méthode de quantification des bactéries par qPCR a été mise en place. Pour cela, huit gènes de ménage, conservés au sein des *Borreliella*, ont initialement été sélectionnés sur la base des travaux menés par Margos et collaborateurs (Margos et al., 2008). L'ensemble de ces gènes sont chromosomiques, monocopies et sont, si possibles, non-adjacents à des gènes codants des protéines de surface ou des protéines hypothétiques. Nous avons exploré l'intérêt de chacun de ces gènes dans l'étude spécifique de *B. afzelii* et *B. garinii* en suivant plusieurs étapes (**Tableau 10**). L'étude *in silico* a consisté en un alignement des séquences nucléotidiques des gènes d'intérêt de chaque espèce afin de trouver des régions suffisamment discriminantes pour dessiner des amorces permettant d'obtenir des amplicons spécifiques de chacune des deux espèces. Seuls les gènes *recG* et *rplB* n'ont pas présenté de différences nucléotidiques suffisantes sur la base des alignements pour discriminer *B. afzelii* BO23 et *B. garinii* CIP103362.

Pour les autres gènes, des amorces ont été générées et testées par PCR sur l'ADN génomique de chacune des espèces. Les résultats de l'amplification ont été observés sur gel d'agarose 2%. Un exemple de gel obtenu après amplification par PCR est présenté en **Figure 34**. Les couples d'amorces qui ont conduit à l'obtention de bandes multiples ont alors été exclus de l'étude. La spécificité des couples d'amorces pour lesquels une seule bande a été observée par PCR a alors été testée par qPCR car c'est une technique qui présente une meilleure sensibilité de détection des amplifications aspécifiques. Un couple d'amorce a été considéré comme valide à cette étape lorsque (i) il a permis une amplification de l'ADN

génomique de l'espèce d'intérêt, (ii) une seule température de fusion a été déterminée et (iii) aucune amplification n'a été détectée en présence de l'ADN génomique de l'autre espèce.

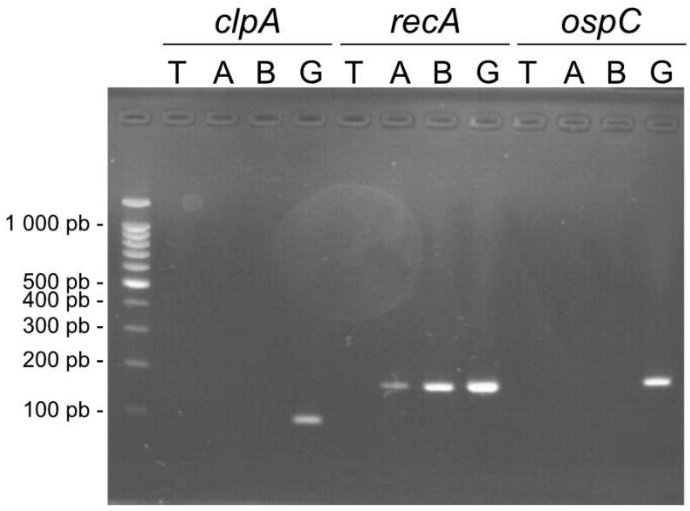

Figure 34 : Exemple de résultats obtenus après amplification par PCR en utilisant des couples d'amorces pour l'amplification spécifique des gènes. Les couples d'amorces utilisés ont été dessinés pour être spécifiques des gènes *clpA*, *recA* et *ospC* de *B. garinii*. Les couples d'amorces ont été testés par PCR en utilisant de comme matrice de l'ADN génomique de *B. afzelii* (A), de *B. burgdorferi* B31 (B), de *B. garinii* (G) ou de l'eau ultra-pure (T).

Seuls quatre couples d'amorces ont permis une amplification spécifique de ces deux espèces comme défini par PCR et qPCR. Il s'agît de couples d'amorces permettant l'amplification des gènes *clpA* ou *nifS* chez *B. afzelii* et *clpA* et *rpoB* chez *B. garinii*. Nous avons alors souhaité vérifier l'efficacité de ces quatre couples d'amorces. Brièvement, un fragment de longueur connue pour chacun des gènes d'intérêt a été généré par PCR avant d'être purifié et quantifié. Une gamme de dilution des amplicons de ces longs fragments purifiés a alors été réalisée et les échantillons ont été amplifiés par qPCR. Les résultats ont permis de déterminer des efficacités d'amplification pour chaque couple d'amorces. Ainsi, pour *B. afzelii*, les efficacités mesurées sont de 94 % et 78 % pour les couples d'amorces ciblant *nifS* et *clpA*, respectivement. Concernant *B. garinii*, les efficacités sont de 95 % et 345 % (la pente mesurée pour cette dernière valeur est de -1,5485, indiquant une efficacité d'amplification aberrante) pour les couples d'amorces ciblant *rpoB* et *clpA*, respectivement.

À la suite de l'ensemble de ces vérifications, deux couples d'amorces qui permettent une amplification spécifique de chacune des espèces ont été retenus. Le premier cible le gène *nifS*, qui code une cystéine désulfurase, chez *B. afzelii* et le second cible le gène *rpoB*, qui code la sous-unité β de l'ARN polymérase, chez *B. garinii*. Des amorces ciblant le gène *flaB* ont également été générées dans le but d'amplifier à la fois *B. afzelii* et *B. garinii* lorsque ces

deux espèces sont cultivées simultanément. Bien que ce couple d'amorces présente une bonne efficacité d'amplification (101 % pour *B. afzelii* et 102 % pour *B. garinii*), les amorces amplifient préférentiellement le gène *flaB* de *B. garinii* lorsque *B. afzelii* et *B. garinii* sont co-cultivées. Par conséquent, ce couple d'amorces n'a pas été utilisé dans la suite de cette étude.

Tableau 10 : Validation multi-étapes de la méthode de qPCR discriminante pour la quantification de *B. afzelii* et *B. garinii.*

Gène	Espèce	Discrimination *in sillico*	Amplification par PCR	Discrimination par PCR	Discrimination par qPCR	Efficacité validée
clpA	*B. afzelii*	●	●	●	●	
	B. garinii	●	●	●	●	
nifS	*B. afzelii*	●	●	●	●	●
	B. garinii	●	●	●		
ospC	*B. afzelii*	●	●			
	B. garinii	●	●	●		
pepX	*B. afzelii*	●	●	●		
	B. garinii	●				
pyrG	*B. afzelii*	●				
	B. garinii	●	●	●		
recA	*B. afzelii*	●				
	B. garinii	●	●			
recG	*B. afzelii*					
	B. garinii					
rplB	*B. afzelii*					
	B. garinii					
rpoB[1]	*B. afzelii*	●	●	●		
	B. garinii	●	●	●	●	●

flaB[2]	*B. afzelii*	●	●	●
	B. garinii	●	●	●

Chaque point noir indique que le couple d'amorce généré pour cibler spécifiquement un gène d'une espèce a été validé pour cette étape. [1] Ce gène n'a pas été sélectionné selon l'étude de Margos et collaborateurs, 2008. [2] Ce gène a initialement été considéré pour amplifier l'intégralité des spirochètes et ainsi réaliser une quantification totale des bactéries en culture.

II.1.2 Application de la méthode de qPCR pour la quantification de *B. afzelii* et *B. garinii*

II.1.2.1. Quantification de *B. afzelii* et *B. garinii* en monoculture

Actuellement, le dénombrement des *Borreliella* se fait presque exclusivement en utilisant des cellules de numération (généralement Neubauer ou Petroff-Hauser) observées par microscopie à champ noir. Afin de valider la méthode de dénombrement par qPCR mise en place au cours de cette étude, nous avons comparé le dénombrement des bactéries en utilisant les deux méthodes. Etant donné que les gènes sélectionnés (*nifS* pour *B. afzelii* et *rpoB* pour *B. garinii*) sont présents en une seule copie dans les génomes bactériens, il est possible de faire le corolaire entre le nombre de copies de gènes détectées et la quantité de cellules bactériennes présentes. Les résultats de dénombrement de *B. afzelii* et *B. garinii* en monoculture sont présentés en **Figure 35**. Les courbes de croissance obtenues pour ces deux espèces sont similaires puisqu'elles atteignent une phase stationnaire de croissance, pour laquelle la concentration cellulaire atteint environ $1*10^8$ cellules/mL, après environ 5 jours de croissance. Le milieu de la phase exponentielle de croissance, atteinte après environ 3 à 4 jours de culture, est caractérisé par une concentration cellulaire de $5*10^7$ cellules/mL.

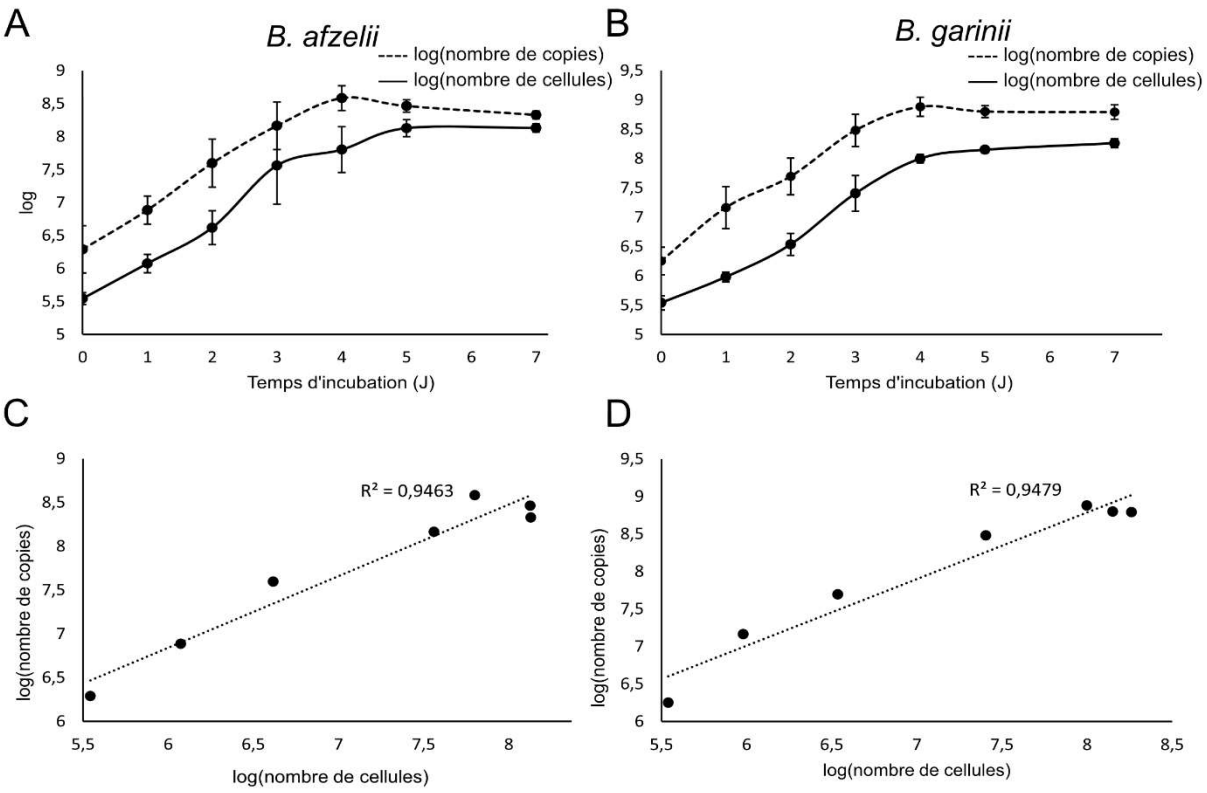

Figure 35 : Suivi de croissance de *B. afzelii* et *B. garinii* en monoculture par comptage en microscopie et qPCR. Les résultats représentent la moyenne des valeurs obtenues pour un triplicat biologique.

Les résultats montrent que les courbes de croissance déterminées par comptage direct et par qPCR suivent la même tendance. Pour compléter ces observations, les courbes de log(copies)=f(log(cellules)) ont été établies pour les deux espèces (**Figure 35C et D**). Les courbes de tendances ont été tracées à chaque fois ce qui permet de calculer un coefficient de détermination (R^2). Ce dernier est de 0,9463 pour *B. afzelii* et de 0,9479 pour *B. garinii*. Dans les deux cas, on peut voir que le coefficient de détermination est élevé (proche de 1), traduisant un bon corolaire entre ces deux mesures. En d'autres termes, ces résultats renforcent ceux estimés par l'observation des courbes de croissance seules, à savoir que la méthode de suivi de croissance par qPCR permet de suivre fidèlement la croissance de ces bactéries en monoculture. Cependant, le nombre de copies détectées par la méthode de qPCR excède le nombre de bactéries déterminé par comptage direct. Ainsi, il est possible que lors des comptages directs, le nombre de cellule soit sous-estimé, ou, au contraire, le nombre de copies amplifiés par la méthode de qPCR soit surestimé par rapport à la réalité. Dans un cas comme dans l'autre, la méthode de qPCR développée permet de suivre la croissance de *B. afzelii* et *B. garinii*. On peut donc considérer cette méthode valide au même titre que le méthode par comptage direct.

II.1.2.2. Quantification de *B. afzelii* et *B. garinii* en co-cultures

Après avoir validé la méthode de qPCR pour le suivi de croissance de ces deux espèces en monoculture, nous avons voulu l'utiliser pour suivre la croissance de ces bactéries lorsqu'elles sont cultivées simultanément. Cela permet non seulement de valider la méthode de qPCR sur un mélange des deux espèces, mais également d'estimer l'impact de la présence d'une espèce sur la croissance de l'autre.

Pour cela, trois rapports arbitraires ont été testés : 1 : 1 (1 cellule de *B. afzelii* pour 1 cellule de *B. garinii*), 1 : 3 (1 cellules de *B. afzelii* pour 3 cellules de *B. garinii*) et 3 : 1 (3 cellules de *B. afzelii* pour 1 cellule de *B. garinii*). Le nombre de cellules totales a été déterminé quotidiennement par comptage direct. Le nombre de copies des gènes *nifS* de *B. afzelii* et *rpoB* de *B. garinii* a également été déterminé quotidiennement par qPCR. Les résultats du suivi de croissance par qPCR sont présentés en **Figure 36**. Tout d'abord, on peut voir que la méthode utilisée permet de dénombrer spécifiquement chaque espèce en co-culture et ce, quel que soit le temps d'incubation et le rapport bactérien considéré. Ensuite, la culture simultanée de ces deux espèces n'a pas d'influence sur leurs vitesses de croissance respectives. Pour tous les rapports considérés, les deux espèces atteignent leur phase stationnaire de croissance après une période d'incubation d'environ 4 à 5 jours, comme lorsqu'elles sont cultivées seules (**Figure 35**). Lorsque *B. afzelii* est ensemencée en excès par rapport à *B. garinii* (rapport 3 : 1, **Figure 36C**), les deux bactéries arrivent aux mêmes concentrations cellulaires dès 24h de culture. Lorsque le rapport est inversé (1 : 3, **Figure 36B**), les deux bactéries arrivent aux mêmes concentrations cellulaires uniquement dans les phases plus tardives de croissance. Il est possible que *B. garinii* ait une croissance légèrement plus rapide que *B. afzelii*, expliquant que, même lorsque *B. afzelii* est inoculée en excès, la concentration cellulaire de *B. garinii* va rapidement égaler celle de *B. afzelii*. De plus, l'une des difficultés principales de cette méthode est la synchronisation des cultures bactériennes avant l'inoculation. En effet, la vitesse de développement des *Borreliella* va largement dépendre de la phase de croissance dans laquelle elles se trouvent avant d'être ensemencées. Ainsi, il est également possible qu'au moment de ces cultures, *B. garinii* se trouvait dans une phase de croissance légèrement plus précoce que celle de *B. afzelii*, expliquant le phénomène observé en **Figure 36C**.

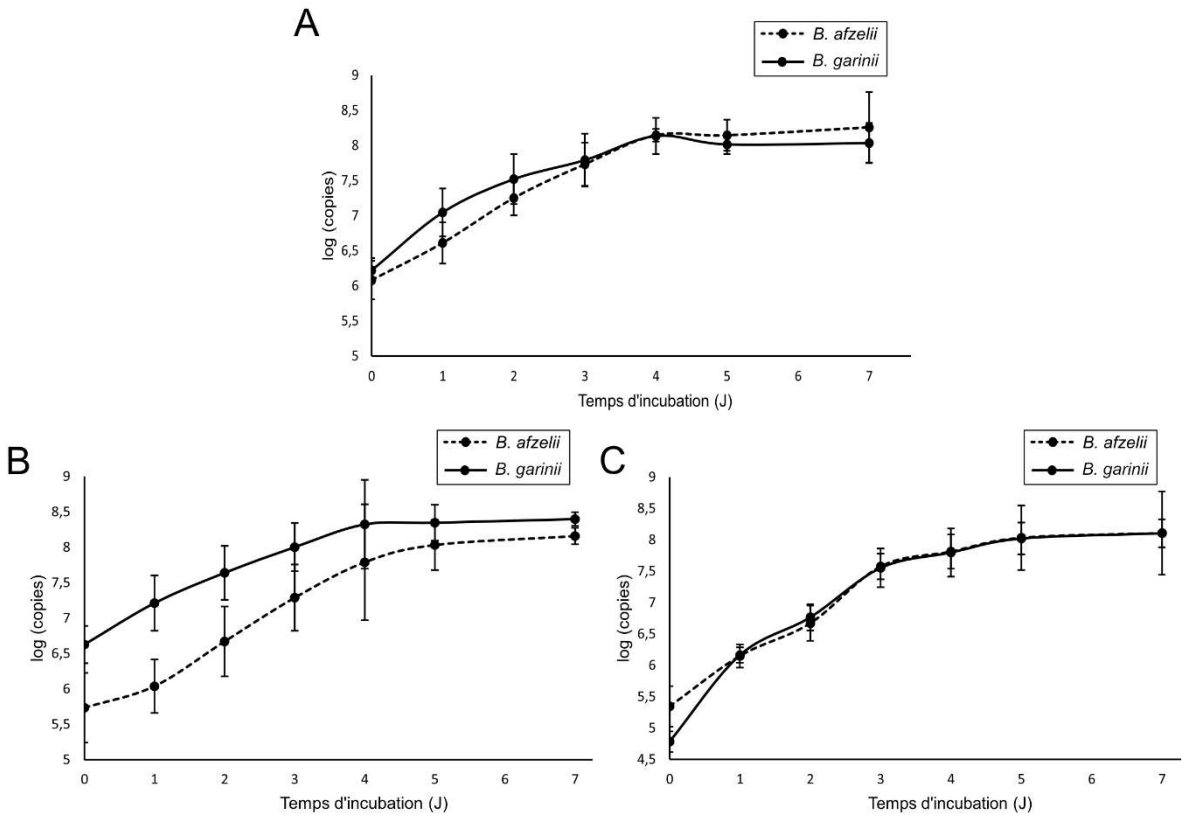

Figure 36 : Suivi de croissance de *B. afzelii* et *B. garinii* en co-culture. Afin de valider la méthode de qPCR, les co-cultures ont été ensemencées à différents rapports de concentrations entre *B. afzelii* et *B. garinii*. (A) Rapport 1 : 1 qui correspond à 1 cellule de *B. afzelii* pour 1 cellule de *B. garinii*. (B) Rapport 1 : 3 qui correspond à 1 cellule de *B. afzelii* pour 3 cellules de *B. garinii*. (C) Rapport 3 : 1 qui correspond à 3 cellules de *B. afzelii* pour 1 cellule de *B. garinii*. Les traits en pointillés correspondent aux mesures pour *B. afzelii*, les traits pleins correspondent aux mesures pour *B. garinii*.

Pour aller plus loin concernant les résultats présentés ci-dessus, il semble important de souligner qu'actuellement, il n'y a pas d'informations quant à la quantité de cellules de chaque espèce qui peuvent être présentes simultanément au sein d'une tique. Par conséquent, les rapports considérés ici ne reflètent pas nécessairement les phénomènes qui peuvent être observés dans la nature. Ces derniers ont été choisis de façon arbitraire afin de valider la méthode de quantification. En effet, avant cette étape nous n'avions pas de données quant à la possibilité d'amplifier de façon discriminante ces deux espèces si elles ne sont pas présentes dans les mêmes proportions. Le fait de réitérer ces expériences en utilisant d'autres ratios présenterait un intérêt certain dans l'étude des phénomènes de co-infections de tiques par ces deux espèces pathogènes.

II.1.3 Etude des interactions physiques entre *B. afzelii* et *B. garinii*

II.1.3.1. Transformation de *B. afzelii* et *B. garinii* pour l'expression de protéines fluorescentes

Pour étudier et observer *in vitro* d'éventuelles interactions directes entre ces espèces, *B. afzelii* et *B. garinii* ont été transformées à l'aide de plasmides d'expression de protéines fluorescentes. L'objectif derrière ces transformations était d'observer d'éventuelles interactions physiques entre elles. Le vecteur pTM61 permet l'expression de la protéine GFP sous le contrôle du promoteur du gène *flaB*, un gène constitutivement exprimé chez les *Borreliella*. Bien que ce vecteur ait initialement été construit pour *B. burgdorferi* ss, des essais de transformation de *B. afzelii* et *B. garinii* ont été réalisés. Des observations par microscopie à fluorescence ont mis en évidence la présence de bactéries fluorescentes et donc le succès de la transformation de *B. afzelii* et *B. garinii* (**Figure 37**) lorsque ces deux espèces sont cultivées en milieu BSK-II + 50 µg/mL de gentamycine. Les résultats indiquent que le plasmide pTM61 permet une expression de la GFP chez *B. afzelii* et *B. garinii* et ce, même si l'origine de réplication de ce plasmide est issue du plasmide cp9 de *B. burgdorferi* ss qui est présent chez *B. afzelii* BO23 mais absent chez *B. garinii* CIP103362.

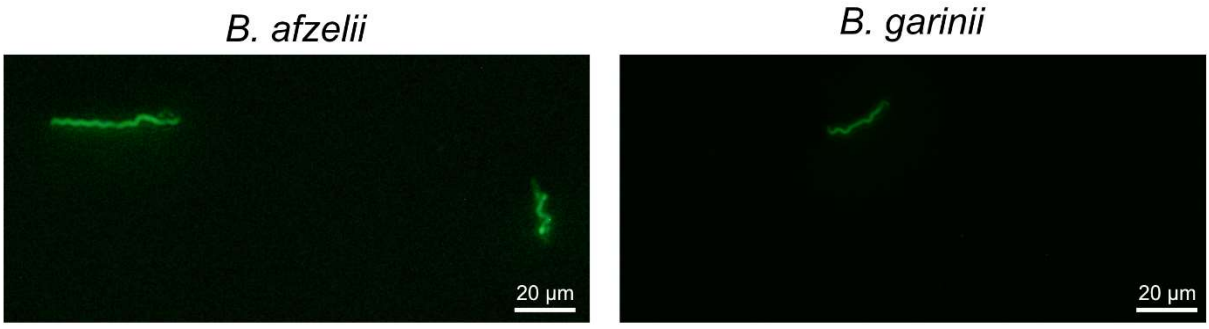

Figure 37 : Expression de la GFP chez *B. afzelii* et *B. garinii* après transformation par le plasmide pTM61.

Afin de discriminer ces deux espèces en co-culture, nous avons souhaité les transformer avec un plasmide permettant l'expression de la mCherry. De multiples essais de construction d'un tel plasmide ont été réalisés au cours de la thèse. La procédure expérimentale envisagée pour cela était d'utiliser des sites de restrictions permettant d'exciser le gène de la GFP du plasmide pTM61 afin de le remplacer par un gène codant la mCherry, une protéine fluorescente émettant dans le rouge. Bien que ce plasmide ait pu être construit, les essais de transformation chez *B. afzelii* et *B. garinii* n'ont jamais abouti. Il est possible que cela vienne de la difficulté à sélectionner et multiplier les clones transformés. En effet, cette sélection s'avère difficile et se fait quasi exclusivement en milieu liquide, l'obtention d'un milieu

BSK-II solide étant fastidieuse. Pour pallier ce manque, le plasmide pBSV2G_2_P_{flaB}-mCherry^{Bb} (Takacs et al., 2018) a été utilisé afin de transformer ces deux espèces. Ce dernier a initialement été construit pour l'expression de la mCherry, sous contrôle du promoteur du gène *flaB*, chez *B. burgdorferi* ss. Le plasmide utilisé ici est doté d'une origine de réplication du plasmide cp9 de *B. burgdorferi* ss, tout comme le plasmide pTM61 présenté plus haut. L'utilisation de ce plasmide a permis d'obtenir une fluorescence dans le rouge pour *B. afzelii* (**Figure 38**) cultivée en milieu BSK-II+50 µg/mL de gentamycine. Cependant, on note que la fluorescence obtenue est de faible intensité et difficilement détectable par microscopie. Aucun transformant n'a pu être obtenu pour *B. garinii*. Par conséquent, les deux espèces ont pu être transformées avec le plasmide pTM61 permettant l'expression de la GFP. En revanche, seule *B. afzelii* a pu être transformée par le plasmide pBSV2G_2_P_{flaB}-mCherry^{Bb} qui permet l'expression de la mCherry.

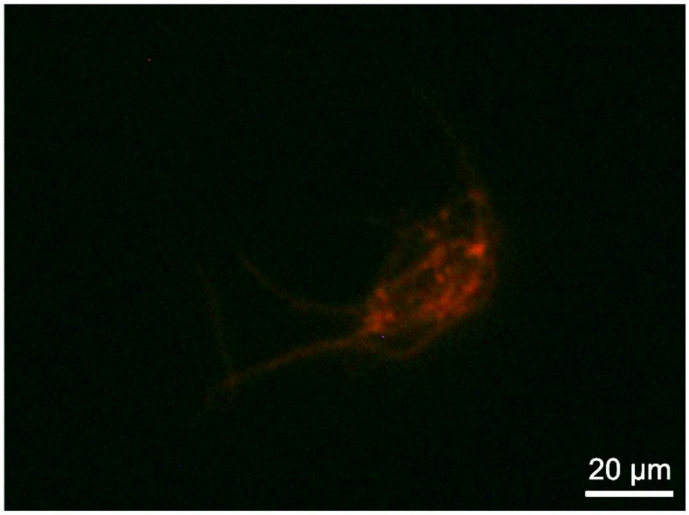

Figure 38 : Expression de la mCherry par *B. afzelii* après transformation par le plasmide pBSV2G_P_{flaB}-mCherry^{Bb}.

II.1.3.2. Etude des biofilms formés par *B. afzelii*-mCherry et *B. garinii*-GFP

Bien que l'intensité de fluorescence de *B. afzelii* exprimant la mCherry soit faible et que la transformation de *B. garinii* pour l'expression de cette même protéine n'ait jamais abouti, nous avons souhaité étudier la capacité de ces deux espèces à former des biofilms et notamment étudier le comportement de ces deux espèces lorsqu'elles sont cultivées simultanément. Pour cela, *B. afzelii*-mCherry et *B. garinii*-GFP ont été cultivées soit en monocultures, soit en co-cultures, en plaques 12 puits à fond en verre. La formation de biofilm par ces deux espèces a été étudiée à différents temps d'incubation par microscopie à

fluorescence couplée à un apotome. Cette technologie permet d'observer la structure des biofilms et de quantifier la hauteur de ces derniers. Les observations de biofilms de *B. afzelii*-mCherry et de *B. garinii*-GFP ont été réalisées après 11 jours d'incubation et sont présentées en **Figures 39 et 40**. Les observations montrent que ces deux espèces sont capables de former des biofilms lorsqu'elles sont en monoculture (**Figure 39A et B**). Ces résultats sont en accord avec ceux de Timmaraju et collaborateurs qui avaient déjà démontré que *B. afzelii* et *B. garinii* sont capables de former des biofilms *in vitro* (Timmaraju et al., 2015). Lorsque ces deux bactéries sont cultivées simultanément, elles conservent leur capacité à former des biofilms. La majorité des biofilms formés dans ces conditions ne présentent qu'une fluorescence (mCherry ou GFP) (**Figure 39C**). Par conséquent, lors de co-cultures entre ces deux espèces, elles semblent préférentiellement former des biofilms mono-espèce qui sont séparés physiquement plutôt que de former des biofilms bi-espèces. En revanche, dans de rares cas, il est également possible d'observer des colocalisations de ces deux espèces (**Figure 39 D**). Dans ce cas de figure, on observe généralement des cellules de *B. garinii*-GFP situées en surface ou enchâssées dans le biofilm formé par *B. afzelii*-mCherry. Le phénomène inverse n'a jamais été observé, peut-être à cause de la faible intensité de fluorescence de la mCherry. Ces résultats indiquent de potentielles interactions physiques entre ces deux espèces lorsqu'elles sont cultivées simultanément. Cependant, il est également possible que le fait que des cellules de *B. garinii* puissent être enchâssées dans le biofilm de *B. afzelii* soit le fruit du hasard.

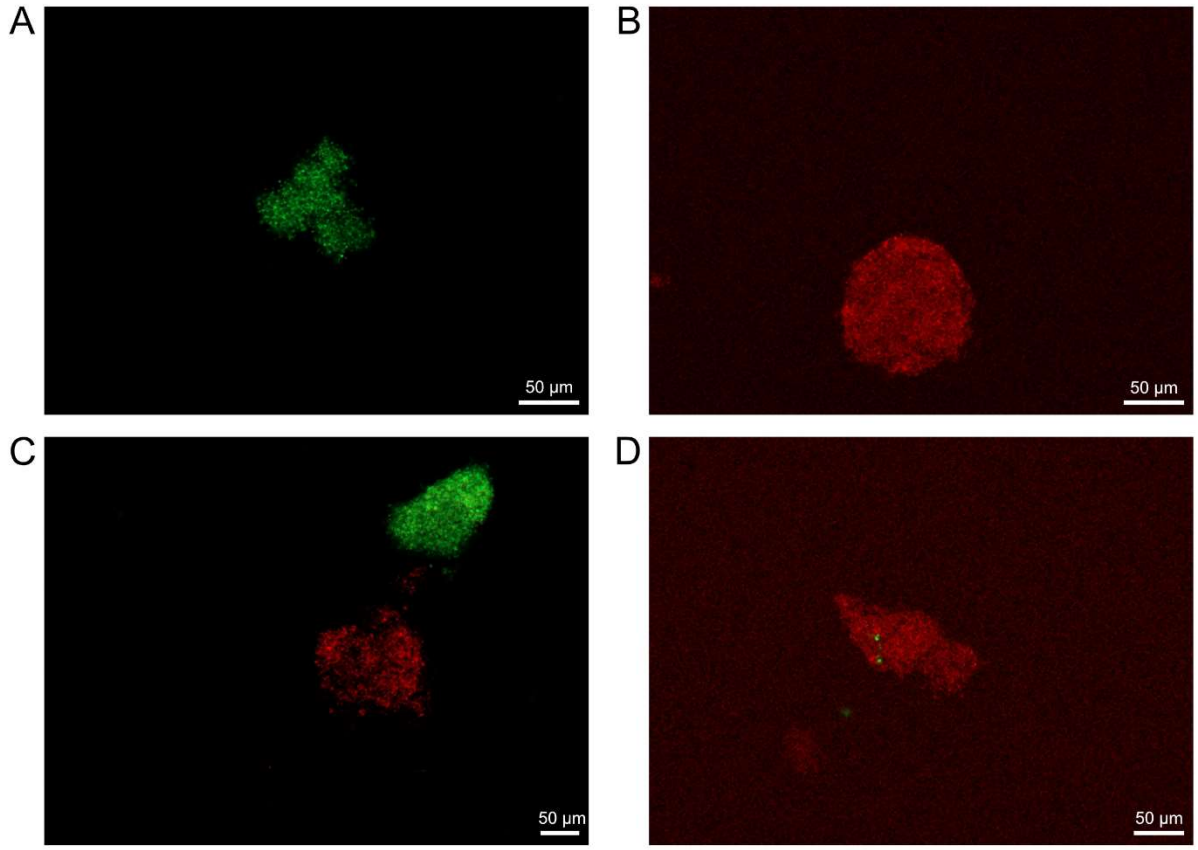

Figure 39 : Observation des biofilms formés par *B. garinii*-GFP et *B. afzelii*-mCherry. La formation des biofilms a été observée en monoculture pour *B. garinii* (A) et *B. afzelii* (B). Elle a également été observée lorsqu'elles sont co-cultivées (C et D).

La hauteur des biofilms formés par *B. afzelii* et *B. garinii* a été mesurée lors de ces observations (**Figure 40**). Les résultats présentés sur cette figure correspondent aux analyses en 3 dimensions des clichés présentés en **Figure 39**. Les observations réalisées ici montrent que pour toutes les conditions, les biofilms formés par ces deux espèces mesurent environ 50 µm en largeur et ont une hauteur d'environ 30 µm. Ainsi, les biofilms formés par ces deux espèces lorsqu'elles sont cultivées simultanément (**Figure 40C et D**) présentent les mêmes dimensions que les biofilms formés par ces deux espèces en monoculture (**Figure 40A et B**). Par conséquent, la présence simultanée de ces deux espèces ne semble en aucun cas impacter les dimensions des biofilms qu'elles forment. Lors des observations des biofilms formés dans les conditions de co-culture, il est possible de distinguer la séparation physique entre les biofilms formés par ces deux espèces (**Figure 40C**) mais également l'enchâssement de certaines cellules de *B. garinii*-GFP au sein du biofilm formé par *B. afzelii*-mCherry (**Figure 40D**). Les structures formées par *B. garinii*-GFP au sein des biofilms de *B. afzelii*-mCherry pourraient s'apparenter à des microcolonies qui auraient été « emprisonnées » dans la matrice extracellulaire formée par *B. afzelii.* Il est possible que les concentrations cellulaires de ces espèces n'étaient pas suffisamment élevées au moment de l'inoculation pour que ces deux

espèces puissent se développer de façon optimale. Il pourrait être intéressant de réitérer ces expériences avec des concentrations cellulaires initiales plus importantes afin d'observer si ce phénomène se reproduit.

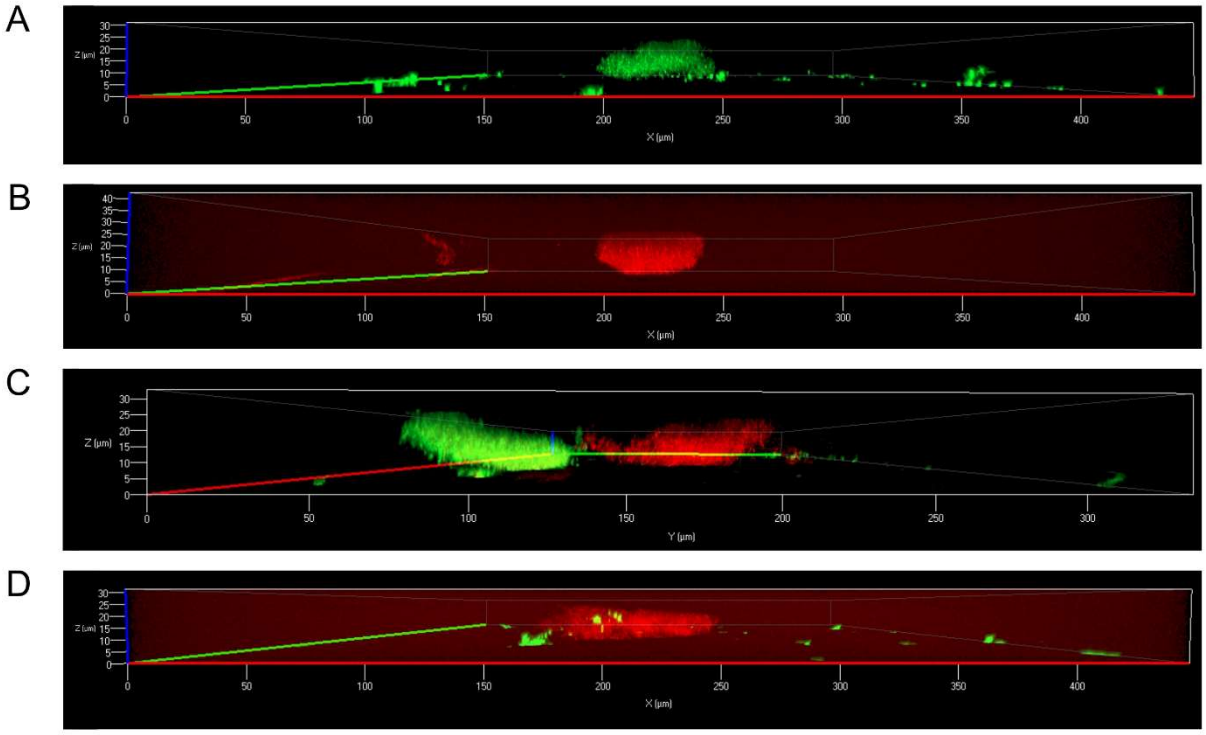

Figure 40 : Observation en trois dimensions des biofilms formés par *B. garinii*-GFP et *B. afzelii*-mCherry. Les images présentées ici correspondent aux observations en trois dimensions des images présentées en **Figure 39**. Ainsi on retrouve les biofilms formés par *B. garinii* (A) et *B. afzelii* (B) en monocultures. Les observations des biofilms formés lorsque ces deux bactéries sont cultivées simultanément sont également présentées (C et D). La barre rouge correspond à l'axe des abscisses (X), celle en vert à l'axe des ordonnées (Y) et celle en bleue à l'axe des altitudes (Z).

Les caractéristiques des biofilms que nous avons obtenus ont été comparées aux informations disponibles dans la littérature. La hauteur des biofilms mesurée ici excède largement celle de biofilms pour *B. burgdorferi* sl décrits dans la littérature (Sapi et al., 2012; Shaikh et al., 2016; Timmaraju et al., 2015). Dans ces études, la hauteur des biofilms est d'environ 1-2 µm. Ces différences peuvent être liées aux méthodes qui ont été utilisées. En effet, dans ces trois études, la hauteur des biofilms a systématiquement été mesurée par microscopie à force atomique. Cette méthode nécessite de centrifuger les échantillons avant l'analyse à des vitesses relativement importantes (entre 6 000 et 8 000g dans ces études). Il est possible que ces étapes de centrifugation aient entraîné un effet « d'écrasement » de ces biofilms qui n'apparaît pas dans nos résultats puisque les plaques qui ont servi à la formation des biofilms ont été observées directement.

Les outils présentés ci-dessus permettent d'étudier les éventuelles interactions entre ces deux espèces. L'un des objectifs de cette thèse est d'étudier le rôle que joue la communication induite par AI-2 sur ces interactions. Pour cela, la capacité de ces deux espèces à produire AI-2 a été explorée.

II.2 Le Quorum Sensing chez *B. afzelii* et *B. garinii*

La présence et la fonctionnalité d'un système de *Quorum Sensing* chez les *Borreliella* n'a été exploré que pour *B. burgdorferi* ss. Au cours des années 2000, une équipe de recherche au Kentucky a mis en évidence la capacité de cette bactérie à produire AI-2 par l'intermédiaire du gène *luxS* (Babb et al., 2005). Le rôle que joue AI-2 sur la virulence de la bactérie a également été exploré. Il a ainsi été mis en évidence que cette molécule de communication est impliquée dans la production de protéines de virulence majeurs, notamment les protéines de la famille Erp (Stevenson & Babb, 2002) et la protéine VlsE (Babb et al., 2005). Cependant, le nombre d'études visant à caractériser le rôle d'AI-2 chez *B. burgdorferi* ss est encore acutellement limité. Par conséquent, il est possible que cette molécule soit impliquée dans d'autres processus chez cette bactérie.

Ce type de mécanisme n'a été décrit que pour cette espèce au sein des *Borrelia* et des *Borreliella*. Il existe par conséquent un manque de données quant à la présence, la fonctionnalité et le rôle d'un tel système chez d'autres espèces de *Borreliella*, notamment *B. afzelii* et *B. garinii* puisqu'elles sont majoritairement responsables de la borréliose de Lyme en Europe.

II.2.1 Analyse *in sillico* de l'environnement génétique de *luxS* chez les *Borrelia* et les *Borreliella*

Au tout début de ce projet, une analyse par alignement de séquences du gène *luxS* a montré que les deux espèces d'intérêt sont dotées d'un homologue de *luxS* avec une identité nucléotidique d'au moins 94%. Nous avons alors voulu explorer l'éventuelle présence de ce gène chez d'autres espèces de *Borreliella* et de *Borrelia*. Pour cela, la séquence de l'opéron *luxS* et son environnement génétique proche issu de *B. burgdorferi* B31 (l'une des souche de référence de *B. burgdorferi* ss) a été comparée à la base de données du NCBI par alignement de séquences à l'aide de l'outil BLAST. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 41**.

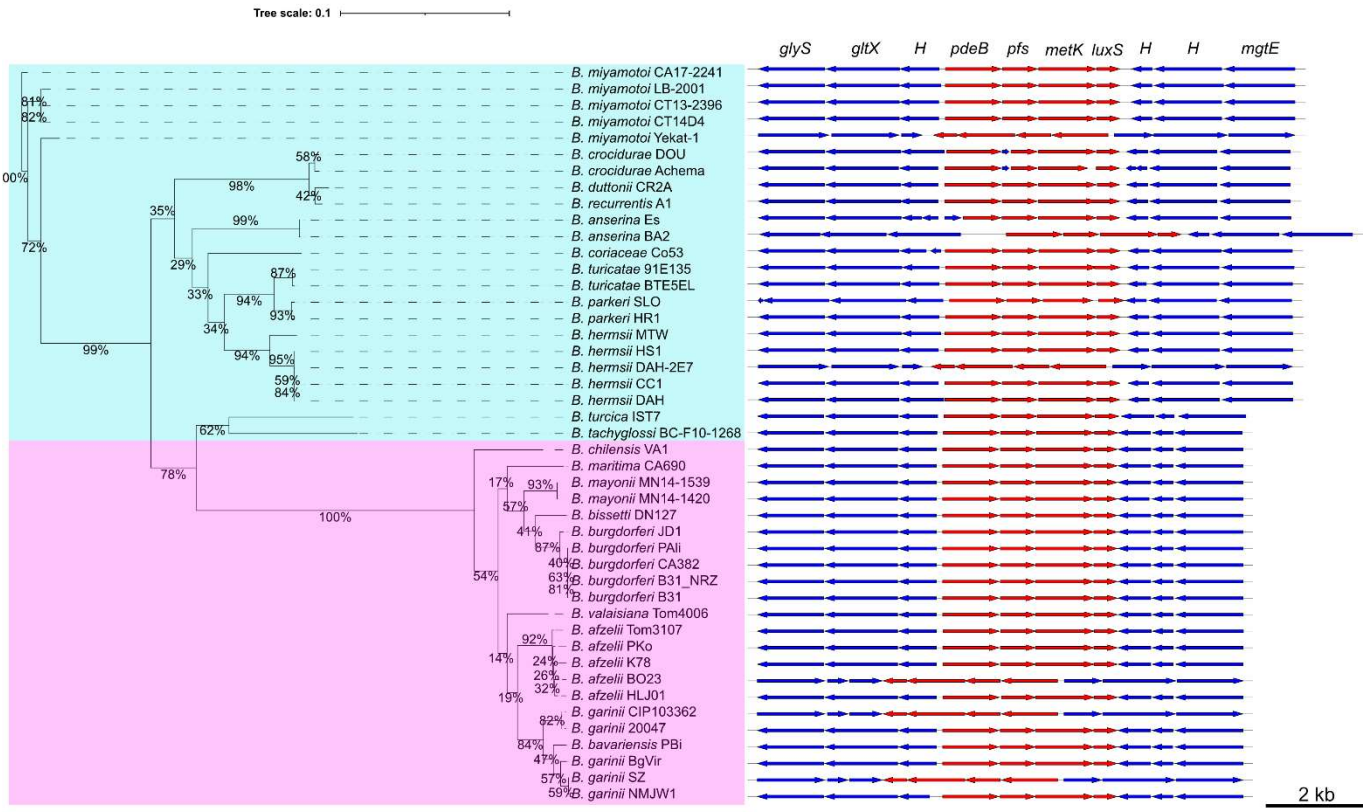

Figure 41 : Environnement de l'opéron *luxS* chez les *Borrelia* et les *Borreliella*. Afin de faciliter la lecture, un maximum de cinq souches a été inclus par espèce. Les quatre gènes de cet opéron sont représentés par les flèches rouges. Les flèches bleues indiquent les gènes de l'environnement génétique proche de l'opéron. Une phylogénie des espèces de *Borrelia* et *Borreliella* dotées de l'opéron *luxS* a été réalisée sur la base d'orthologie à l'échelle du génome. L'arbre phylogénétique a été généré par les algorithmes STRIDE (Emms & Kelly, 2017) et STAG (Emms & Kelly, 2018), implémentés dans le logiciel Orthofinder2. Cette phylogénie est générée par la comparaison de 344 gènes orthologues qui sont partagés par toutes ces souches. Les pourcentages correspondent aux résultats des tests de bootstraps. Des couleurs ont été ajoutées pour séparer les *Borrelia* et les *Borreliella*. On retrouve ainsi les espèces de *Borrelia* en cyan et les espèces de *Borreliella* en mauve. Pour l'environnement génétique, une échelle de 2 kb est représentée par une barre noire. Les gènes notés *H* ici codent une protéine hypothétique.

Les résultats indiquent qu'au-delà d'une conservation importante du gène *luxS* chez les *Borreliella* et les *Borrelia*, il existe également une conservation importante des quatre gènes de l'opéron et de l'organisation de ce dernier. Ainsi, toutes les espèces codent pour les quatre gènes dans l'ordre suivant : *pdeB*, *pfs*, *metK* et *luxS*. Sur l'ensemble des espèces analysées, on peut voir que les gènes de l'opéron *luxS* sont situés sur le brin positif, à l'exception de cinq souches, dont *B. afzelii* BO23 et *B. garinii* CIP103362, pour lesquelles l'opéron est situé sur le

brin négatif. L'importante conservation des gènes de cet opéron et de leur organisation laisse penser que les espèces sélectionnées pour cette analyse sont capables de dégrader la méthionine de la même manière que *B. burgdorferi* ss. Ainsi, si ces gènes sont transcrits chez l'ensemble de ces espèces, elles peuvent dégrader le SRH en homocystéine et en DPD, le précurseur d'AI-2. Par conséquent, il est possible que le système de communication AI-2 dépendant soit conservé au sein des genres *Borrelia* et *Borreliella*. Des analyses supplémentaires doivent cependant être réalisées afin de vérifier l'expression de ces gènes et également confirmer leur capacité à produire AI-2. De plus, l'organisation des gènes environnants de cet opéron est également conservée. On retrouve ainsi des gènes qui codent des protéines hypothétiques directement en amont et en aval des gènes *pdeB, pfs, metK* et *luxS.* De plus on retrouve également les gènes *gltX* et *glyS* qui codent des synthétases d'ARNt de glutamine et de glycine, respectivement. Enfin, le gène *mgtE* code un transporteur du magnésium. Pour résumer, toutes les souches de *Borrelia* et *Borreliella* analysées ici possèdent les gènes pour produire AI-2 dans une organisation qui est conservée au sein de ces deux genres.

II.2.2 Etude de la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à transcrire les gènes de l'opéron *luxS*

Ensuite, nous avons voulu vérifier la fonctionnalité des gènes *pdeB*, *metK, pfs* et *luxS* chez *B. afzelii* BO23 et *B. garinii* CIP103362. Pour cela, ces deux espèces ont été cultivées séparément et l'expression des gènes a été analysée par RT-PCR (**Figure 42**)

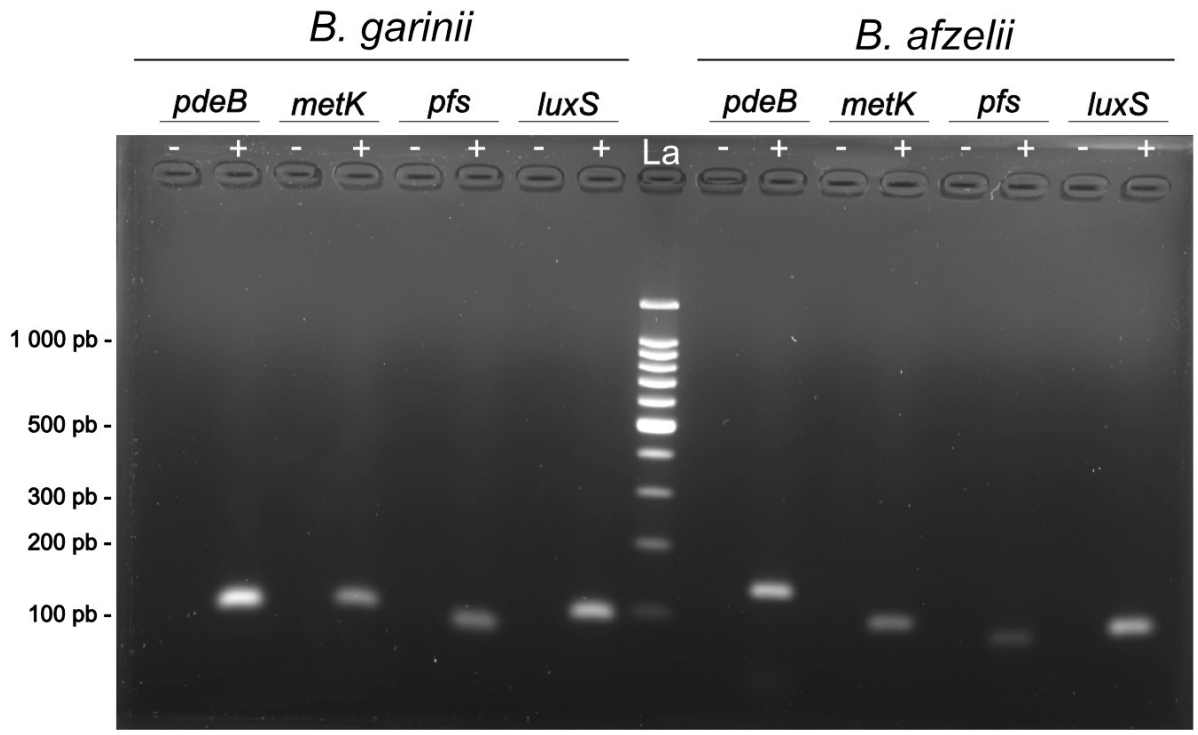

Figure 42 : Transcription des gènes de l'opéron *luxS* chez *B. garinii* et *B. afzelii*. Les réactions de transcription inverse ont été réalisées sur l'ARN total de *B. afzelii* ou *B. garinii*. Les échantillons (+) indiquent la présence de transcriptase inverse et donc la production d'ADNc. Les échantillons (-) indiquent l'absence de transcriptase inverse et font office de contrôle pour la contamination potentielle d'ADN génomique. Les échantillons rétro-transcrits ont été amplifiés par PCR. L'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. La piste légendée « La » correspond au marqueur de poids moléculaire.

Les résultats obtenus mettent en évidence la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à transcrire les gènes *pdeB*, *metK, pfs* et *luxS* Ces résultats représentent la première étape de la mise en évidence de la fonctionnalité du système AI-2 dépendant chez ces deux espèces.

Chez *B. burgdorferi* ss, comme chez *B. afzelii* et *B. garinii*, les gènes *pdeB*, *pfs*, *metK* et *luxS* sont situés sur un même opéron (**Figure 41 et Figure 43A**). La fonctionnalité de l'opéron chez ces deux espèces a alors été explorée par RT-PCR en utilisant des amorces permettant l'amplification des régions intergéniques (**Figure 43B**). Chez les deux espèces, une amplification des régions entre les gènes de l'opéron *luxS* a été obtenue pour chaque couple d'amorces. Ce résultat indique le caractère polycistronique de l'ARNm produit par l'ensemble de ces gènes et confirme la structure opéronique de ces derniers.

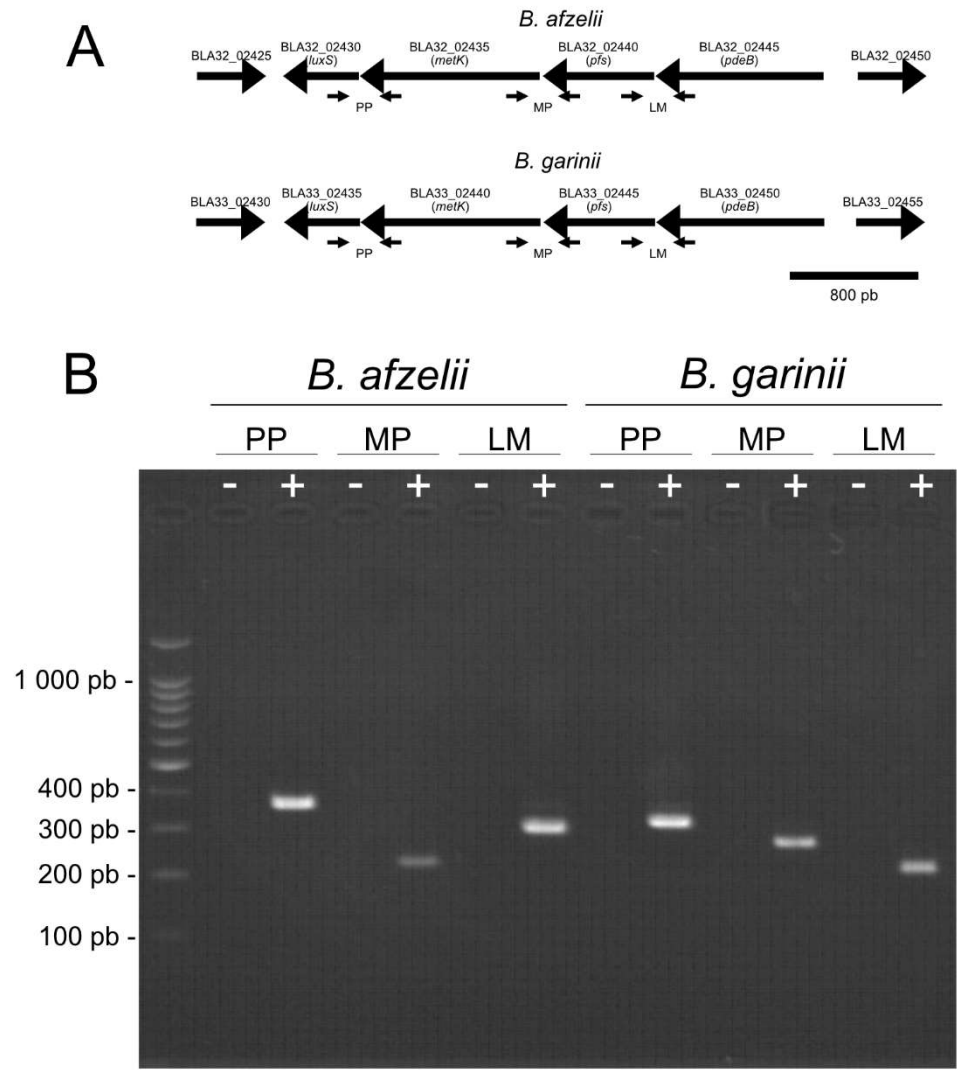

Figure 43 : Mise en évidence de la structure opéronique des gènes pdeB, metK, pfs et *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. (A) Schéma à l'échelle de l'organisation génétique des séquences codantes formant l'opéron *luxS*. Les flèches indiquent la localisation approximative des amorces utilisées en (B). (B) Analyse par RT-PCR du caractère polycistronique de l'ADNc issu de l'opéron *luxS*. Les amorces utilisées amplifient les régions intergéniques de l'opéron. Les réactions de RT-PCR ont été réalisées avec (+) ou sans (-) transcriptase inverse.

II.2.3 Expression des gènes de l'opéron *luxS* en fonction de la phase de croissance

Chez *B. burgdorferi* ss, l'expression du gène *luxS* est dépendant de la phase de croissance (Riley et al., 2007). Au cours de leur étude, les auteurs ont non seulement montré que ces quatre gènes étaient situés sur un même opéron mais ont également réalisé un suivi de l'expression de ces gènes en fonction de la phase de croissance. Les résultats obtenus indiquent que ces quatre gènes ont une expression maximale au moment de la phase exponentielle de croissance et qui va progressivement diminuer lorsque la bactérie entre en phase stationnaire. La même procédure expérimentale a été mise en place chez *B. afzelii* et *B. garinii* afin de vérifier si le profil d'expression des gènes de l'opéron *luxS* est similaire à celui obtenu pour *B. burgdorferi* ss. A la vue des courbes de croissance de ces bactéries présentées précédemment (**Figure 35**), trois temps d'incubation ont été utilisés pour réaliser le suivi de l'expression des gènes de l'opéron *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Ainsi, l'expression de ces gènes a été mesurée après trois, quatre et sept jours ce qui correspond au milieu de la phase exponentielle de croissance, la fin de la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire de croissance, respectivement. Ces résultats sont présentés en **Figure 44**. L'expression des gènes de l'opéron *luxS* LuxS aux phases de croissances plus précoces (du jour 0 au jour 2) n'a pas été mesurée car les concentrations cellulaires à ces temps sont trop faibles pour obtenir une quantité d'ARN suffisante.

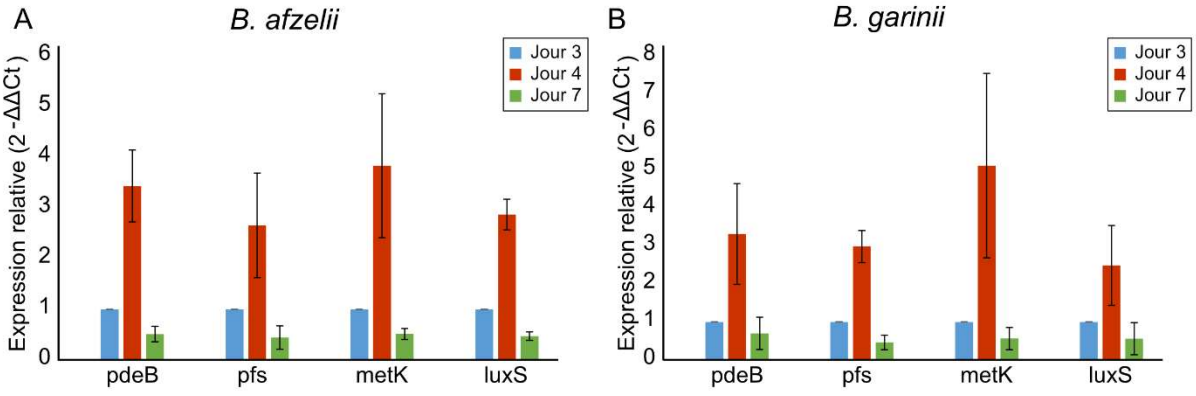

Figure 44 : Suivi de l'expression des gènes de l'opéron *luxS* en fonction du temps. L'expression relative des quatre gènes de l'opéron *luxS* a été mesurée par RT-qPCR pour (A) *B. afzelii* et (B) *B. garinii* par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en utilisant le gène *flaB* comme gène de référence. Ce dernier code la flagelline B, un composant majeur des flagelles situés dans la membrane périplasmique et indispensable à la motilité de ce genre bactérien. Les échantillons

collectés après trois jours d'incubation ont été utilisés comme référence pour le calcul de l'expression relative. Les mesures ont été réalisées sur un triplicat biologique.

Pour *B. afzelii* et *B. garinii*, les profils d'expression des quatre gènes de l'opéron *luxS* sont similaires. On peut voir une expression plus importante lorsque la bactérie arrive en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire de croissance (jour 4). L'expression des gènes chute ensuite drastiquement lorsque les bactéries se trouvent en phase stationnaire de croissance (jour 7), avec une expression légèrement plus faible que celle observée pour le milieu de la phase exponentielle (jour 3). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Riley et collaborateurs pour *B. burgdorferi* ss (Riley et al., 2007). Les auteurs ont montré une importante expression des gènes de cet opéron au milieu de la phase exponentielle, suivie d'une diminution progressive pour les phases de croissance suivantes. Cependant, dans leur étude, les concentrations cellulaires utilisées pour déterminer les phases de croissance diffèrent de celles que nous avons obtenu ici. Au cours de leur étude, les phases de croissance exponentielle, milieu d'exponentielle, stationnaire précoce et stationnaire tardive sont définies par des concentrations cellulaires de $6*10^6$, $1*10^8$, $1,5*10^8$ et $2*10^8$ cellules/mL, respectivement. Or, pour *B. afzelii* et *B. garinii*, les concentrations cellulaires des phases exponentielle (jour 3), stationnaire précoce (jour 4) et stationnaire tardive (jour 7) sont de ~ $5*10^6$, ~ $2*10^7$ et ~ $1,5*10^8$ cellules/mL, respectivement. Par conséquent, l'échantillon considéré comme la fin de la phase exponentielle dans notre étude correspond à l'échantillon du milieu de la phase exponentielle dans leur étude. De plus, d'après les résultats décrits dans d'autres études, *B. burgdorferi* ss atteint sa phase stationnaire de croissance à une concentration d'environ $1*10^8$ cellules/mL (Arnold et al., 2016). Par conséquent, ces différences de concentrations cellulaires peuvent expliquer les différences de profils d'expression entre les résultats obtenus dans cette étude et ceux obtenus par Riley et collaborateurs (Riley et al., 2007).

Après avoir vérifié la capacité de ces deux espèces à transcrire le gènes *luxS* en monoculture, nous avons souhaité initier l'étude de l'expression de ce gène lorsque *B. afzelii* et *B. garinii* sont cultivées simultanément afin d'étudier l'impact potentiel que peut avoir une espèce sur l'expression de *luxS* de l'autre espèce. Ces résultats pourraient ainsi indiquer d'éventuelles interactions entre ces deux espèces Les amorces utilisées pour mesurer l'expression de *luxS* en fonction de la phase de croissance sont spécifiques de l'espèce et permettent donc de discriminer l'expression de ce gène chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Par conséquent, l'expression spécifique du gène *luxS* de ces deux espèces a été mesurée sur des échantillons de co-culture 1 : 1 (1 cellule de *B. afzelii* pour 1 cellule de *B. garinii* au moment de l'ensemencement) à différents temps (**Figure 45**). On peut voir que lorsque ces deux espèces sont cultivées ensemble, elles sont toutes les deux capables de transcrire le gène

luxS. Le fait que les deux espèces expriment le gène *luxS* lorsqu'elles sont cultivées simultanément soulève l'hypothèse selon laquelle, dans ces conditions, ces deux espèces peuvent produire AI-2 et donc participer de manière conjointe à la communication induite par cette molécule.

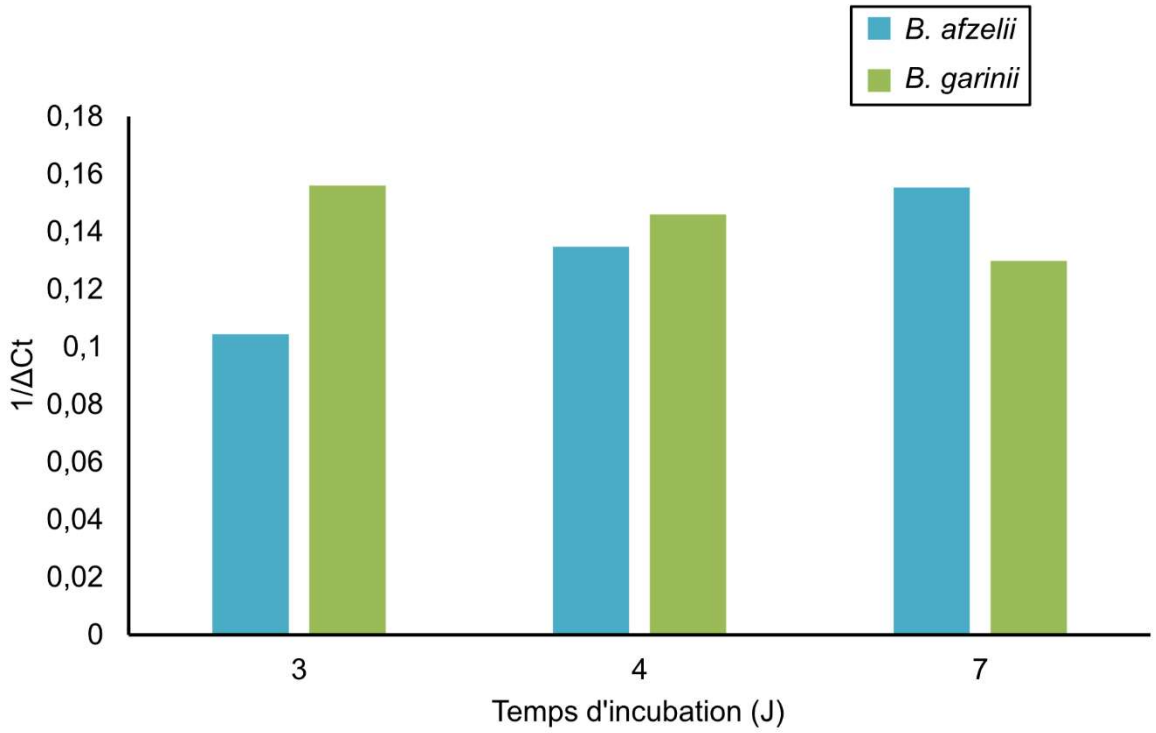

Figure 45 : Expression du gène *luxS* par *B. afzelii* et *B. garinii* en co-culture. L'expression spécifique du gène *luxS* de chacun des deux espèces a été mesurée sur des échantillons de co-culture 1 : 1 en fonction du temps. Les valeurs de ΔCt ont été calculées en soustrayant les valeurs de Ct du gène *luxS* à la moyenne des Ct obtenus pour le gène *flaB* des deux espèces. Il a été choisi d'exprimer les résultats sous la forme 1/ΔCt pour faciliter la lecture. Ainsi, plus la valeur est importante, plus l'expression du gène *luxS* est forte. Les résultats représentent les moyennes des valeurs obtenues pour deux réplicats biologiques. L'expression de *luxS* chez *B. afzelii* est présentée par les histogrammes bleus, celle chez *B. garinii* par les histogrammes verts.

II.2.4 Mise en évidence de la production d'AI-2 par *B. afzelii* et *B. garinii*

Les résultats présentés précédemment indiquent que *B. afzelii* et *B. garinii* sont capables de transcrire les gènes de l'opéron *luxS* et que ces derniers sont plus fortement exprimés à la fin de la phase exponentielle/début de phase stationnaire de croissance. Cependant, la transcription de *luxS* ne suffit pas à affirmer qu'elles sont capables de produire

une ou plusieurs molécules AI-2 fonctionnelle(s). Afin de vérifier cela, une mesure indirecte de la production d'AI-2 a été effectuée par quantification de la bioluminescence produite par le biosenseur *V. harveyi* BB170 en présence de surnageants de culture collectés à différents temps d'incubation (**Figure 46**). La souche sauvage *V. harveyi* BB120 a été utilisée en contrôle positif au cours de chaque expérience.

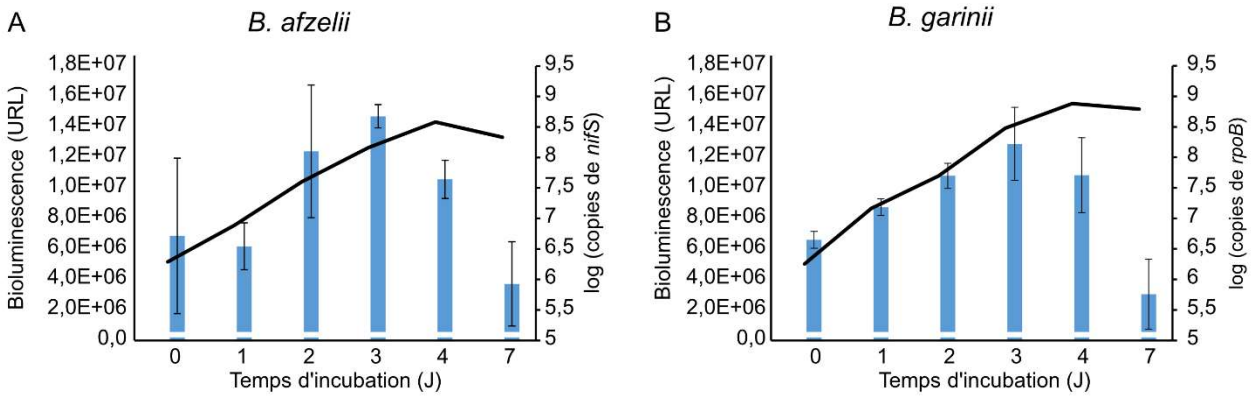

Figure 46 : Cinétique de production d'AI-2 par *B. afzelii et B. garinii*. Les valeurs de bioluminescence sont représentées par les histogrammes bleus. La bioluminescence produite par *V. harveyi* BB170 mesurée ici est directement liée à la quantité d'AI-2 présente dans le surnageant de culture des *Borreliella*. La courbe noire correspond à la population de *B. afzelii* ou *B. garinii* mesurée à chacun des temps d'incubation. Celle-ci a été déterminée par qPCR et est exprimée en $\log_{10}$ (copies de gène).

Les résultats obtenus ici indiquent que *B. afzelii* et *B. garinii* sont toutes les deux capables de produire une ou plusieurs molécule(s) AI-2, entraînant la bioluminescence de *V. harveyi* BB170. Par conséquent, ces résultats sont les premiers à démontrer que ces deux espèces ont un gène *luxS* (ainsi que les autres gènes de l'opéron) fonctionnel qui permet la production d'AI-2. De plus, on peut voir que la concentration d'AI-2 dans les deux cas est maximale lorsque les bactéries sont en milieu de phase exponentielle de croissance (Jour 3) ou en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire de croissance (Jour 4). Lorsque les bactéries atteignent la phase stationnaire tardive de croissance (Jour 7) on observe une diminution importante de la bioluminescence produite par *V. harveyi* BB170 qui traduit une baisse importante de la quantité d'AI-2. Les résultats sont en adéquation avec ceux obtenus pour *B. burgodrferi* ss (Babb et al., 2005). Au cours de cette étude, les auteurs ont également montré que la production d'AI-2 par *B. burgdorferi* ss est plus importante lorsque la concentration cellulaire est d'environ 1 à $5*10^7$ cellules/mL (qui correspond approximativement aux concentrations cellulaires de *B. afzelii* et *B. garinii* entre les jours 3 et 4). On remarque cependant des variations importantes dans la bioluminescence mesurée, notamment pour les

surnageants de *B. afzelii*. Ainsi, il est plus difficile d'affirmer pour cette espèce que le maximum de production d'AI-2 a lieu au milieu de la phase exponentielle (Jour 3). Les cinétiques d'expression des gènes de l'opéron présentés en **Figure 44** montrent également une expression relative du gène *luxS* plus importante après quatre jours d'incubation puis une diminution importante lorsque les bactéries arrivent en phase stationnaire tardive de croissance. Les résultats obtenus pour le suivi de l'expression des gènes concordent avec ceux obtenus pour la mesure de l'activité d'AI-2 chez les deux espèces.

Les deux milieux le plus couramment utilisés pour la culture des *Borreliella* sont les milieux BSK-II et BSK-H. Lors de la mesure de la bioluminescence de *V. harveyi* BB170 en réponse aux surnageants de *B. garinii*, une bioluminescence est produite, quel que soit le milieu utilisé. En revanche, *B. afzelii* est capable de produire l'AI-2 lorsqu'elle est cultivée en milieu BSK-II mais pas en milieu BSK-H (le signal de bioluminescence ne dépasse pas le bruit de fond). Ces résultats sont surprenants car les compositions de ces deux milieux sont très proches. La différence majeure est la concentration d'albumine bovine sérique puisque le BSK-II en contient 50 g/L alors que le BSK-H en contient 40 g/L. Ces résultats indiquent que *B. afzelii* est plus sensible aux variations de composition du milieu de culture que ne l'est *B. garinii* par rapport à la production d'AI-2. Par conséquent, l'utilisation du milieu BSK-II a été privilégiée pour l'étude de la communication induite par AI-2 chez les *Borreliella* puisque *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss sont toutes les trois capables de produire la molécule de communication dans ce milieu.

II.2.5 Procédures expérimentales pour bloquer la communication induite par AI-2

La souche de *B. burgdorferi* ss Δ*luxS* utilisée dans la majorité des études est issue d'un isolat clinique, naturellement délété pour le gène *luxS*. Dans la littérature, une seule étude relate la création d'un mutant Δ*luxS* généré *in vitro* (Hübner et al., 2003). Actuellement, aucun isolat clinique de *B. afzelii* ou *B. garinii* délété du gène *luxS* n'a été isolé. Par conséquent, aucune souche Δ*luxS* n'est actuellement disponible pour ces deux espèces. Nous avons donc essayé de générer un mutant de délétion de *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Pour cela, un vecteur suicide permettant l'insertion d'un gène de résistance à un antibiotique dans la séquence codante du gène *luxS* a été construit. Dans un premier temps, un gène de résistance à la kanamycine (gène nommé km^r) a été amplifié à partir du plasmide pLAW330. Ce gène de résistance a alors été inséré à la place de la séquence codante de la GFP située sur le plasmide pTM61, générant ainsi un plasmide nommé pTM63. Celui-ci possède donc un gène

de résistance à cet antibiotique sous le contrôle du promoteur du gène *flaB,* initialement utilisé pour contrôler l'expression de la GFP sur pTM61. Pour obtenir le vecteur suicide pour *Borreliella*, nommé pTM63, la séquence nucléotidique allant du promoteur de *flaB* jusqu'à la fin du gène *km*^{r} a alors été amplifiée puis insérée dans le vecteur pGEMT-Easy.

Les étapes allant jusqu'à la génération du plasmide pTM63 ont été réalisées et vérifiées, en revanche et malgré de nombreuses tentatives, aucun transformant d'*E. coli* n'a été obtenu après transformation avec le vecteur suicide. Afin d'étudier le rôle de la communication induite par AI-2 chez ces espèces, nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation d'une autre approche. Le *Quorum Sensing* peut être bloqué chez les bactéries par l'utilisation de diverses molécules qui vont empêcher la communication. On parle alors de *Quorum Quenching*.

Un tel mécanisme a été exploré par Roy et collaborateurs pour étudier la communication AI-2 dépendante entre *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Roy et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs ont détourné le mécanisme naturellement mis en place pour la détection d'AI-2 afin de bloquer la communication. Le principe qu'ils ont utilisé est présenté en **Figure 47**. Pour résumer, la protéine LsrK peut être naturellement impliquée dans la transduction du signal lié à AI-2 par phosphorylation de cette molécule, générant alors une molécule nommée ici AI-2-P (**Figure 47A**). Ce phénomène est notamment impliqué dans la transduction du signal chez les Enterobacteriaceae (Rezzonico et al., 2012). Dans l'étude de Roy et collaborateurs, une protéine LsrK recombinante a été produite et purifiée. Cette dernière a alors été ajoutée dans le milieu extracellulaire. Lorsque LsrK est localisée dans le milieu extracellulaire, elle va alors phosphoryler AI-2 non plus à l'intérieur mais à l'extérieur de la cellule (**Figure 47B**). Les molécules AI-2-P ne peuvent pas être transportées à l'intérieur de la cellule, elles sont donc piégées dans le milieu extracellulaire où elles vont se dégrader naturellement. Ainsi, cette approche est fondée sur un détournement de la réaction classique entre LsrK et AI-2 qui bloque par conséquent le signal induit par l'entrée d'AI-2 dans la cellule.

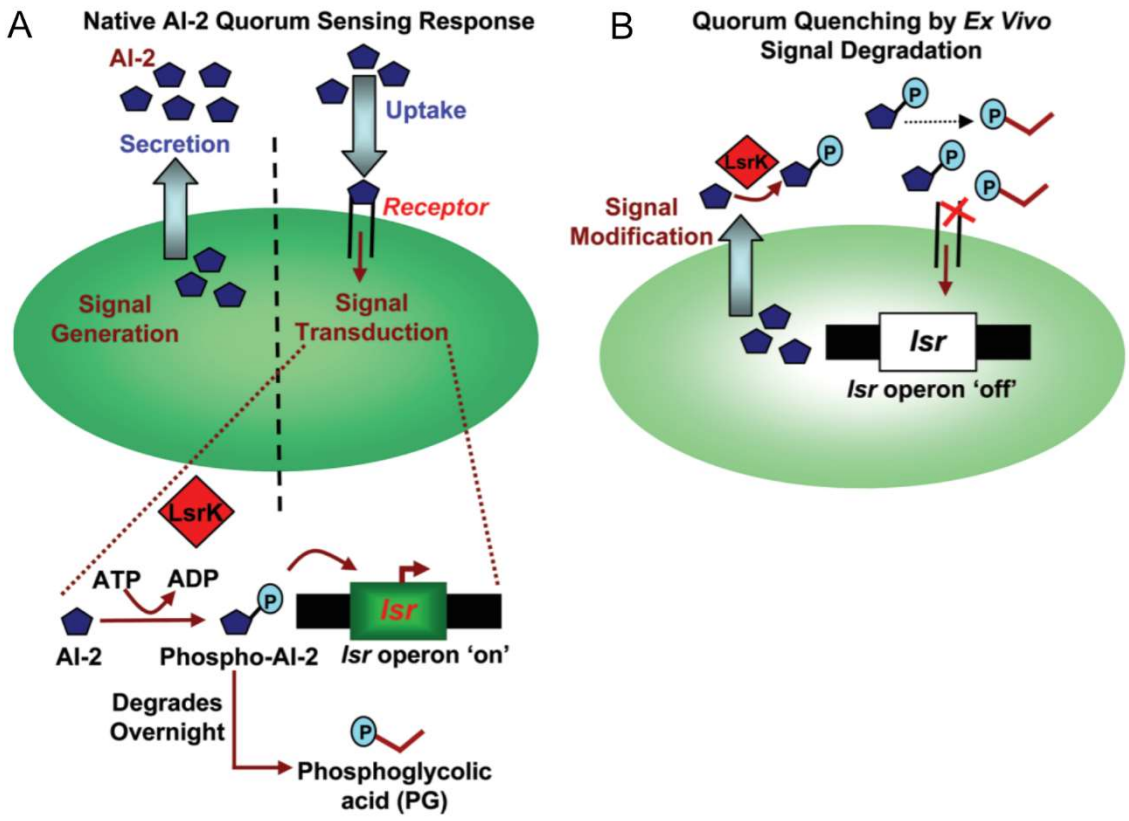

Figure 47 : Mécanisme de blocage de la communication AI-2 dépendante par ajout de LsrK dans le milieu extracellulaire. (A) représentation de l'activité « classique » de la communication par AI-2. AI-2 est produit, secrété puis internalisé dans la cellule. La protéine LsrK phosphoryle AI-2, ce qui a pour conséquence d'entraîner la transcription des gènes de l'opéron *lsr*. (B) *Quorum Quenching* dépendant de LsrK. La protéine LsrK est ajoutée de manière exogène dans le milieu extracellulaire. Elle phosphoryle AI-2, empêchant son internalisation dans la cellule et donc l'expression des gènes de l'opéron *lsr*. Adapté de (Roy et al., 2010).

La méthode de *Quorum Quenching* (QQ) par utilisation de la protéine LsrK a été utilisée afin de bloquer la communication induite par AI-2 chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Pour cela, le gène codant la protéine LsrK d'*E. coli* K12 a été amplifié et inséré dans les plasmides pQE30 et pQE70 qui permettent la production de protéines recombinantes avec une étiquette 6-His en N-terminal et C-terminal, respectivement. La souche *E. coli* M15 a alors été transformées par ces plasmides. Plusieurs transformants ont été testés pour leur capacité à produire LsrK. La surproduction de la protéine LsrK après induction à l'IPTG n'a cependant pas pu être détectée par gel SDS-PAGE même après avoir testé plusieurs concentrations d'IPTG (0,4 ; 1 et 2 mM), plusieurs températures (20 ; 30 et 37°C) et temps d'induction (2 ; 4 et 20 heures). Par soucis de temps et d'efficacité, l'obtention du plasmide d'expression de LsrK a été sous-traitée à l'entreprise Protéogenix. La séquence nucléotidique du gène *lsrK* a été amplifiée et insérée

dans le vecteur pT7 qui permet l'expression de protéines recombinantes avec une étiquette 6-His à l'extrémité N-terminale. Le plasmide ainsi généré a été nommé pET28b et a été fourni par la société Protéogenix. Plusieurs souches d'*E. coli* ont été transformées par ce plasmide et des essais de production après induction à l'IPTG ont été réalisés à différentes températures. Les surnageants montrant une importante production de la protéine recombinante ont alors été soumis à une chromatographie d'affinité afin de purifier spécifiquement la protéine LsrK étiquetée avec 6 histidines (**Figure 48**).

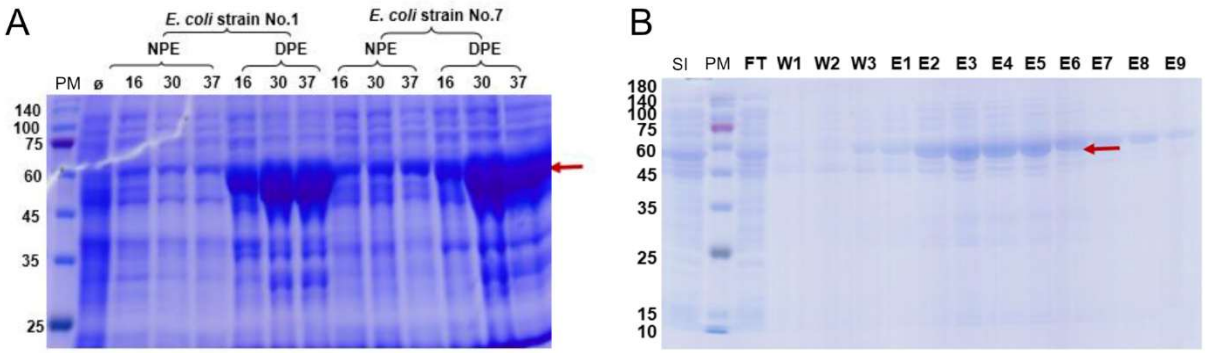

Figure 48 : Production et purification de la protéine LsrK analysées par gel SDS-PAGE. (A) Analyse de la capacité de deux souches d'*E. coli* à produire LsrK. Les analyses ont été réalisées à différentes températures d'induction sur la fraction soluble (Native Protein Extract, NPE) et sur la fraction composée majoritairement des corps d'inclusion (Denatured Protein Extract, DPE). PM : Marqueur de Poids Moléculaire. La flèche rouge indique la position de la protéine d'intérêt. (B) Purification de la protéine contenue dans la fraction native par affinité au nickel. PM : Marqueur de Poids Moléculaire ; SI : Solution initiale ; FT : Fraction non retenue ; W1-W3 : Fractions « Wash » ; E1-E9 : Fractions éluées.

Pour résumer, l'entreprise Protéogenix a réalisé la construction du plasmide d'expression de LsrK et a fourni la preuve que ce plasmide permet la effectivement la production recombinante de cette protéine (**Figure 48A**). De plus, ils ont montré que la chromatographie d'affinité permet de récupérer de façon spécifique une protéine d'environ 60 kDa, ce qui est compatible avec le poids moléculaire de LsrK (58,78 kDa) (**Figure 48B**). L'entreprise nous a alors fourni le plasmide d'expression utilisé (pET28b) ainsi que l'identité de la souche permettant la meilleure production de LsrK parmi celles qu'ils ont testé (*E. coli* C3030J (NEB)).

Ainsi, la souche d'*E. coli* C3030J (NEB) a été transformé avec le plasmide pET28b. La souche ainsi transformée a été nommée *E. coli*_AA01. Des essais de production de la protéine LsrK au laboratoire EBI ont ensuite été réalisés. Dans un premier temps, la capacité de la bactérie à produire LsrK après induction à l'IPTG a été confirmée par analyse sur gel SDS-PAGE de lysats bactériens totaux, induits ou non (**Figure 49**).

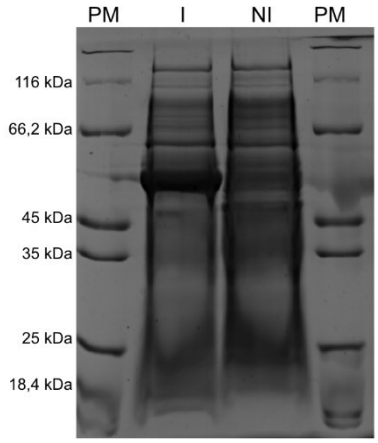

Figure 49 : Production de LsrK dans des lysats totaux d'*E. coli* avec et sans induction à l'IPTG analysée par gel SDS-PAGE. PM : Marqueur de Poids Moléculaire ; I : Induit ; NI : Non-Induit.

L'un des problèmes majeurs dans la purification de la protéine LsrK est la formation de corps d'inclusion en grande quantité. En 2017, Ha et collaborateurs ont publié une étude visant à augmenter l'expression de LsrK dans la fraction soluble (Ha et al., 2017). Au cours de cette étude, les auteurs ont réalisé des inductions d'expression dans du milieu LB plus ou moins concentré en NaCl et ont montré qu'une concentration de NaCl d'environ 14,6 g/L permet d'augmenter la quantité de protéines dans la fraction soluble. De plus, les auteurs ont réalisé des incubations à une température de 20°C pendant une durée de 20 h ce qui semble également favoriser la production de LsrK dans la fraction soluble. Ces différents éléments ont été testés sur *E. coli*_AA01. Les résultats sont présentés dans la **Figure 50**.

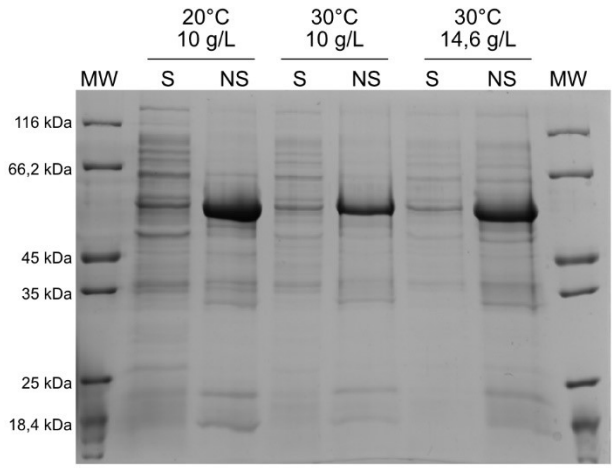

Figure 50 : Production de LsrK par *E. coli* analysée par gel SDS-PAGE. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu LB contenant 10 ou 14,6 g/L de NaCl. Après induction à l'IPTG (1 mM), les cultures ont été incubées sur la nuit à 20 ou 30°C. Les fractions solubles et non-

solubles ont été analysées. PM : Marqueur de Poids Moléculaire ; S : Fraction soluble ; NS : Fraction non-soluble.

Ces résultats ont montré que, Pour toutes les conditions de culture utilisées pour l'induction, la protéine LsrK est retrouvée dans la fraction soluble. En revanche, une quantité très importante de protéine est présente également sous forme de corps d'inclusion. Quelle que soit la fraction considérée, la condition de culture à 20°C permet d'obtenir une quantité de protéines plus importante que les autres. Par conséquent, cette condition a été retenue pour la production de LsrK.

La fraction soluble a par la suite été soumise à une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA selon le protocole recommandé par le fabricant. Afin de s'assurer que le protocole utilisé est fonctionnel, les éluats obtenus pour chacune des étapes ont été conservés et déposés sur un gel SDS-PAGE (**Figure 51**). Les résultats montrent la présence d'une bande de forte intensité entre 45 et 66,2 kDa dans l'échantillon brut qui pourrait correspondre à LsrK (58,78 kDa). On voit que cette bande n'est que peu éliminée par les étapes de lavage, indiquant une forte interaction avec le nickel contenu dans la résine. A la suite du traitement par une solution fortement concentrée en imidazole, la protéine repérée est majoritaire, indiquant qu'il s'agit de la protéine LsrK marquée à l'histidine. En revanche, à cette étape, il n'est pas encore possible de déterminer si la protéine recombinante LsrK est fonctionnelle.

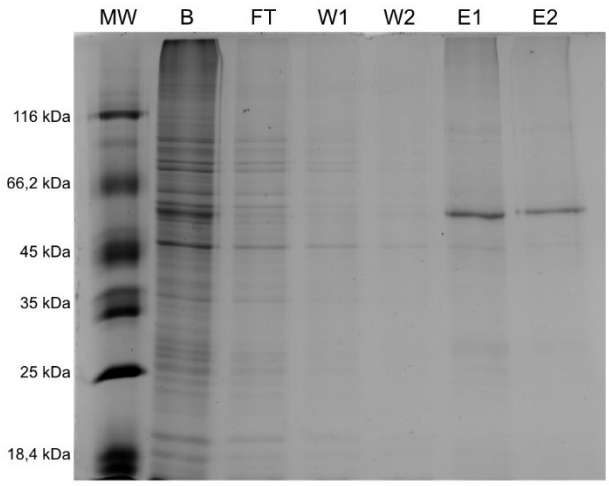

Figure 51 : Analyse SDS-PAGE des échantillons purifiés par résine Ni-NTA. Les échantillons ont été récupérés après chaque étape de la purification et déposés sur un gel SDS-PAGE. B : Echantillon brut ; FT : Fraction non retenue ; W1-2 : Etapes de lavage ; E1-2 : Fractions éluées.

Afin de tester l'activité de la protéine LsrK purifiée, la quantité de protéines présentes dans les fractions présentées en **Figure 51** a été quantifiée par dosage de Bradford. Par la suite, des cultures de *B. afzelii* et *B. garinii* en début de phase exponentielle ont été traitées

avec 1 µM de la potentielle protéine LsrK. Après une incubation sur la nuit, les surnageants de culture ont été récupérés et utilisés afin de mesurer la production de bioluminescence par *V. harveyi* BB170 (**Figure 52**). Les résultats indiquent une importante diminution de la production de bioluminescence lorsque *V. harveyi* est en contact avec les surnageants de cultures incubés avec LsrK. Par conséquent, la protéine LsrK recombinante produite ici semble capable de perturber significativement le signal AI-2 produit par *B. afzelii* et *B. garinii* et ainsi diminuer leur capacité à communiquer par l'intermédiaire de cette molécule.

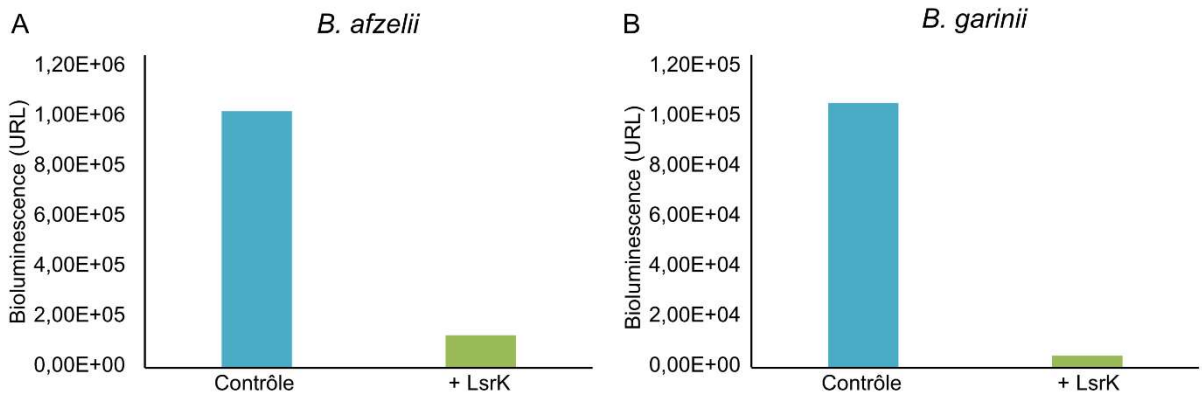

Figure 52 : Mesure de l'activité AI-2 de *B. afzelii* et *B. garinii* après traitement par LsrK. La production de bioluminescence de *V. harveyi* BB170 a été mesurée après 7h de croissance en présence des surnageants de *B. afzelii* (A) ou de *B. garinii* (B). Les surnageants de cultures ont été collectés après une nuit d'incubation sans (condition contrôle) ou avec (+ LsrK) 1 µM de LsrK purifiée (n = 1).

Plusieurs limites existent encore quant à ces résultats. Tout d'abord, une seule concentration de LsrK (1 µM) a été testée ici. Cette concentration a été choisie sur la base de l'étude par Roy et collaborateurs dans laquelle cette concentration a été définie comme optimale pour inhiber la communication AI-2 dépendante entre *E. coli* et *S. typhimurium* (Roy et al., 2010). Il est possible que cette concentration ne soit pas optimale pour le *Quorum Quenching* chez les *Borreliella*. Cependant, au vu des faibles quantités de LsrK récupérées, seule cette concentration a pu être testée pour l'instant. De plus, le contrôle utilisé dans cette expérience correspond à la culture de *B. afzelii* ou *B. garinii* sans traitement par la protéine LsrK. Ainsi, il est possible que la baisse de bioluminescence soit liée à l'activité de LsrK qui empêche AI-2 d'être détectée par *V. harveyi*, mais il est également envisageable qu'une autre molécule produite par la souche d'*E. coli* soit présente dans les fractions purifiées. Cette molécule pourrait alors être responsable de la diminution observée ici. Afin de nous assurer que la diminution de bioluminescence observée soit bien liée à la présence de LsrK, il serait

plus juste de traiter les cultures avec un échantillon issu d'une culture d'*E. coli* non induite qui serait passée par les mêmes étapes de purification.

Il est envisagé de réaliser une étude transcriptomique après avoir bloqué la communication par l'intermédiaire de LsrK. Cette étude permettra ainsi d'avoir une idée globale des gènes dont l'expression est impactée par AI-2. Pour cela, une telle étude a été initiée afin de connaître l'impact d'un changement de température sur l'expression des gènes de ces deux espèces. Cette analyse sera complétée par une analyse identique après blocage de la communication par LsrK.

II.3 Analyse transcriptomique de la réponse de *B. afzelii* et *B. garinii* à un changement de température

Au cours de leur cycle de vie, les *Borreliella* alternent entre la tique et divers hôtes. Le passage de l'un à l'autre se fait par l'intermédiaire du repas de sang qui modifie drastiquement leur microenvironnement (température, pression osmotique, pH, etc…). Chez *B. burgdorferi* ss, le rôle de la température dans l'expression globale des gènes a été étudié *in vitro,* afin de mimer l'impact de ce paramètre lors de la prise d'un repas de sang (Ojaimi et al., 2003; Popitsch et al., 2017). En revanche, aucune donnée de ce type n'est actuellement disponible pour *B. afzelii* et *B. garinii*.

Nous avons donc réalisé une analyse transcriptomique globale, par séquençage de l'ARNm, chez ces deux espèces dans deux conditions différentes : à 23 °C et 33 °C. Ces deux températures ont pour but de mimer la température interne de la tique en quête (23 °C) et au moment du repas de sang (33 °C). Brièvement, les bactéries sont cultivées à 23 °C jusqu'au milieu de la phase exponentielle. Une fois cette phase atteinte, elles sont inoculées dans du milieu BSK-II frais puis mises à incuber soit à 23 °C soit à 33 °C. Une fois que les bactéries ont atteint la phase exponentielle (le temps nécessaire varie selon la température de façon identique pour les deux espèces), les ARNs ont été extraits et envoyés à l'Institut du Cerveau de la Moëlle épinière à Paris pour le séquençage. Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

II.3.1 Données de séquençage

Le nombre de séquences générées pour chaque échantillon est compris entre 109 565 321 et 179 060 839 **Tableau 11** sauf pour l'échantillon Af 233 qui présente un nombre

de séquences de seulement 48 077 978. La qualité des séquences a été évaluée à l'aide de l'outil fastQC. Pour l'ensemble des échantillons, seule la première base en 5' de chaque échantillon présentait un score de qualité insuffisant. Par conséquent, cette base a été retirée de l'ensemble des séquences analysées. Après avoir vérifié la qualité des séquences, ces dernières ont été positionnées sur le génome de référence de chaque espèce. Les pourcentages de séquences correctement alignées sur les génomes varient entre 66,36 % et 89,04 %. Seuls deux échantillons, Af 233 et Ga 233, présentent des pourcentages d'alignement inférieurs à 86,24 % (69,63 % et 66,36 %, respectivement). Bien que ces statistiques soient faibles pour ces échantillons, ceux-ci ont été conservés pour la suite de l'analyse afin de vérifier s'ils apportent réellement un biais dans l'analyse.

Tableau 11 : Statistiques de séquençage pour chaque échantillon analysé.

	Température	Echantillon	Nombre de séquences	Pourcentage de séquences alignés au génome
B. afzelii	23 °C	Af 231	109 565 321	87,63 %
		Af 232	140 785 435	86,24 %
		Af 233	48 077 978	69,63 %
	33 °C	Af 331	116 922 731	89,00 %
		Af 332	179 060 839	88,70 %
		Af 333	129 515 484	88,42 %
B. garinii	23 °C	Ga 231	142 848 675	88,33 %
		Ga 232	123 567 671	88,22 %
		Ga 233	111 848 844	66,36 %
	33 °C	Ga 331	155 834 336	86,42 %
		Ga 332	123 884 894	86,32 %
		Ga 333	120 617 378	89.04 %

Un triplicat biologique a été réalisé pour chaque espèce et chaque condition. La nomenclature des échantillons est constituée des deux premières lettres de l'espèce, de la température de croissance et du numéro du réplicat. Par exemple, l'échantillon « Af 231 » correspond au réplicat 1 de *B. afzelii* cultivée à 23 °C.

Le nombre de séquences alignées pour chaque gène a été quantifié et les expressions différentielles de ces derniers ont été calculées avec l'outil Deseq2. Cet outil permet de déterminer des expressions différentielles, mais également d'estimer l'homogénéité des échantillons à partir du nombre de séquences assignées aux différents gènes. Sur cette base, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée pour les deux espèces (**Figure 53**). L'analyse de l'ensemble des triplicats met en évidence que les échantillons Af 233 et Ga 233 ne groupent pas avec les autres échantillons et présentent donc des différences importantes avec ceux-ci (**Figure 53A et B**). Ces différences sont plus marquées que celles que l'on obtient entre les températures de culture, indiquant un biais important lorsque ces deux échantillons sont inclus. La même analyse a été réalisée en excluant cette fois les échantillons Af 233 et Ga 233 (**Figure 53C et D**). Lorsque ces derniers sont exclus, on observe une bonne séparation des échantillons cultivés à 23 °C et ceux cultivés à 33 °C, indiquant que les résultats obtenus pour les échantillons issus d'une même condition sont homogènes. Les échantillons Af 233 et Ga 233 ont donc été exclus du jeu de données pour la suite de l'analyse. Ainsi, chaque espèce est analysée en triplicats à la température 33 °C et en duplicats à 23 °C.

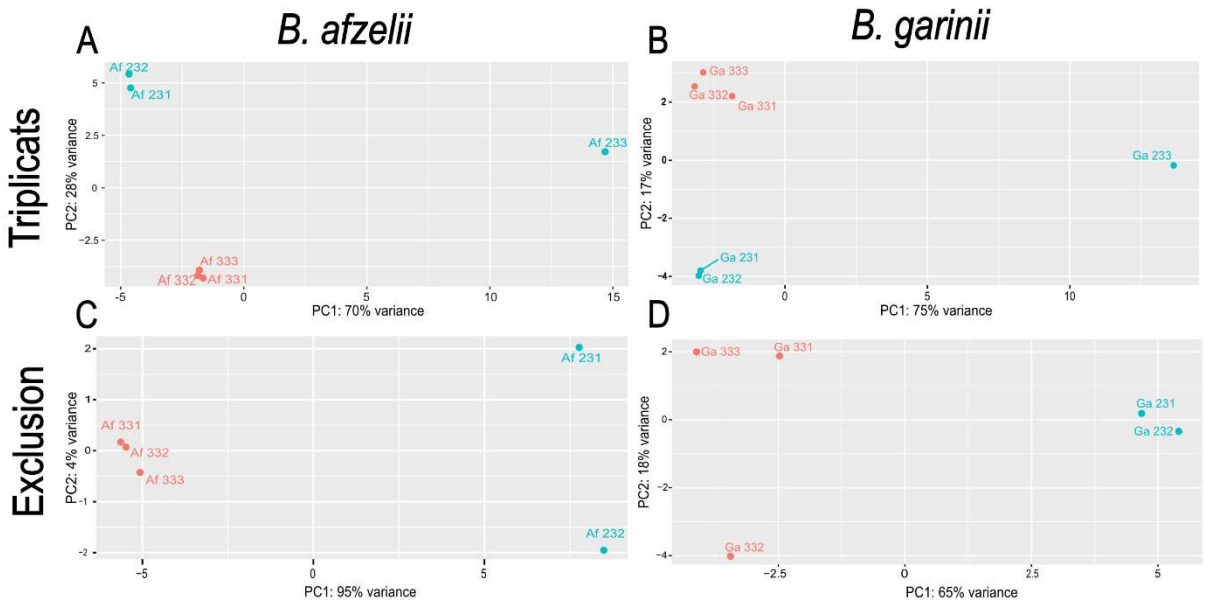

Figure 53 : Analyse en composantes principales des échantillons de RNAsequencing. Les échantillons présentés en bleu sont issus de cultures à 23 °C, ceux en rouge sont issus de cultures à 33 °C. (**A**) ACP de *B. afzelii* en triplicats pour les deux conditions, (**B**) ACP de *B. garinii* en triplicats pour les deux conditions, (**C**) ACP de *B. afzelii* après exclusion de l'échantillon Af 233, (**D**) ACP de *B. garinii* après exclusion de l'échantillon Ga 233.

II.3.2 Analyse des gènes différentiellement exprimés

Après s'être assuré de l'homogénéité des échantillons, les différences transcriptionnelles ont été analysées pour chaque espèce. Seuls les gènes dont l'expression varie d'un facteur (Fold Change, FC) d'au moins 1,5 ont été étudiés. L'outil Deseq2 utilise le Log2FC afin de mesurer les différences transcriptionnelles entre les gènes. Ainsi, un gène dont le Log2FC est de 0,58 correspond à une surexpression d'un facteur 1,5 et un Log2FC de -0,58 correspond à une sous-expression d'un facteur 1,5. De plus, les échantillons ont également été filtrés sur la base de leur *p*-value ajustée, calculée par la méthode d'ajustement Benjamini-Hochberg, permettant de limiter le nombre de faux positifs. Seuls les résultats avec une *p*-value ajustée < 0,001 ont été inclus.

Les gènes différentiellement exprimés sont présentés sous la forme de volcano plots (**Figure 54**). L'ensemble des résultats indique que la température a un impact plus important sur l'expression des gènes chez *B. afzelii* (**Figure 54A**) que chez *B. garinii* (**Figure 54B**). En effet, le changement de température entraîne une diminution de l'expression de 117 gènes et la surexpression de 225 gènes pour *B. afzelii* alors que ce paramètre entraîne une diminution de l'expression de 42 gènes et la surexpression de 38 gènes chez *B. garinii*. De plus, la température a également un impact différent sur les niveaux d'expression entre ces deux espèces. Les valeurs de log2(FC) sont comprises entre -2,51 et 6,14 pour *B. afzelii* alors que ces mêmes valeurs varient entre -3,10 et 1,6 pour *B. garinii*.

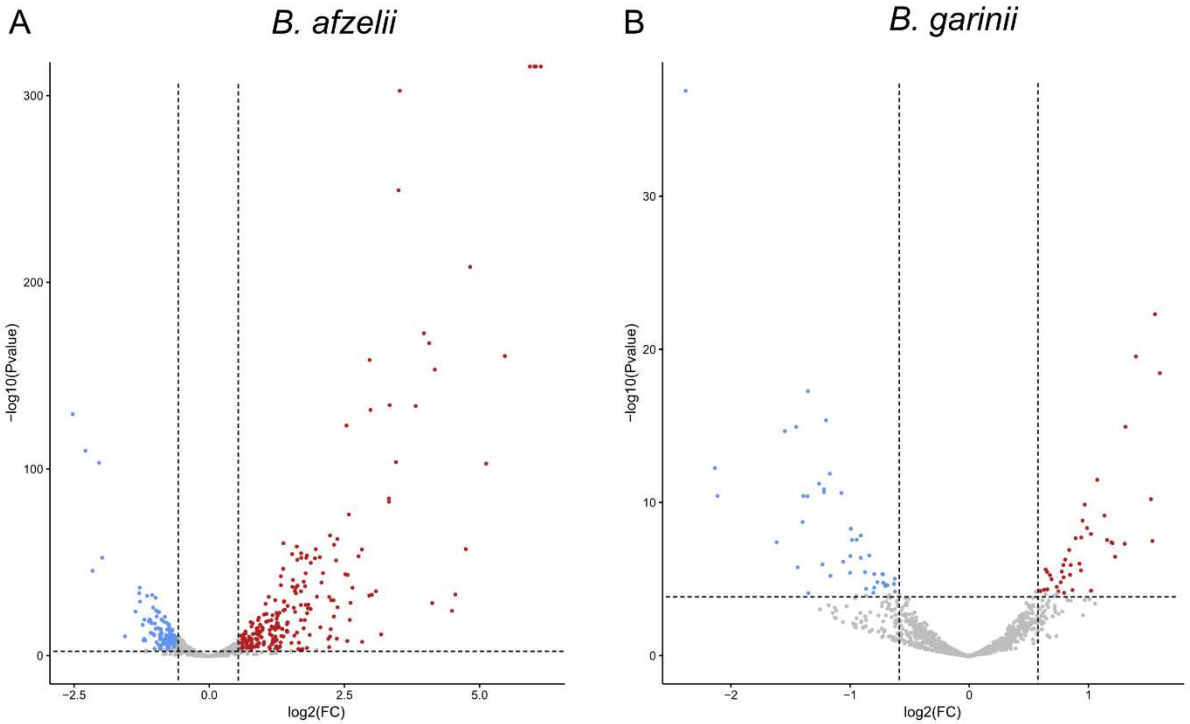

Figure 54 : Gènes différentiellement exprimés par *B. afzelii* (A) et *B. garinii* (B), en fonction de la température. Un gène est considéré différentiellement exprimé si le log2(FC) < -0,58 ou log2(FC) > 0,58 et -log10(P-value) > 3. Ces limites sont représentées par les traits pointillés. Les gènes sous-exprimés sont représentés par les points bleus, les gènes surexprimés sont représentés par les points rouges.

II.3.3 Localisation des gènes différentiellement exprimés

Quantifier le nombre de gènes différentiellement exprimés selon leur localisation, sur le chromosome ou sur les plasmides, pourrait permettre d'avoir une première estimation du rôle de la température sur la virulence de ces bactéries. En effet, chez *B. burgdorferi* ss, la majorité des gènes de virulence impliqués dans la dissémination et l'échappement au système immunitaire est localisée sur des plasmides (Kenedy et al., 2012), ce qui est aussi le cas chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Les génomes de référence de ces deux espèces indiquent la localisation des gènes (chromosome ou plasmides). Ainsi, la localisation des gènes différentiellement exprimés est indiquée dans le **Tableau 12**. Les résultats obtenus montrent que 84,4 % des gènes surexprimés chez *B. afzelii* sont localisés sur les plasmides (190/225) et 72,6 % des gènes sous-exprimés sont situés sur le chromosome (85/117). Concernant *B. garinii*, les gènes différentiellement exprimés sont majoritairement localisés sur le chromosome. Ainsi, 71,1 % (27/38) des gènes surexprimés et 88,1 % (37/42) des gènes sous-exprimés sont localisés sur ce dernier.

Tableau 12 : Localisation génomique des gènes différentiellement exprimés chez *B. afzelii* et *B. garinii*.

	B. afzelii			*B. garinii*		
	Chromosome	Plasmides	Total	Chromosome	Plasmides	Total
Gènes surexprimés	35	190	225	27	11	38
Gènes sous-exprimés	85	34	117	37	5	42

II.3.4 Rôle des gènes différentiellement exprimés

Le rôle des gènes différentiellement exprimés a été exploré par l'intermédiaire du génome annoté de chacune de ces espèces. Parmi ces gènes, une part importante code des protéines hypothétiques. Ainsi, 25,0 % (20/80) des gènes différentiellement exprimés chez *B. garinii* codent des protéines hypothétiques (13 gènes sous-exprimés et 7 gènes surexprimés). Concernant *B. afzelii*, 28,3 % (97/342) des gènes différentiellement exprimés codent des protéines hypothétiques (28 gènes sous-exprimés et 69 gènes surexprimés). Bien que le rôle des protéines codées par ces gènes ne puisse pas être établi en l'état, il pourrait être intéressant de rechercher d'éventuels domaines conservés. La présence de tels domaines pourrait fournir des indications quant aux rôles de ces protéines hypothétiques et donc d'avoir une vision plus globale des fonctions impactées par la température chez *B. afzelii* et *B. garinii*.

Les produits de gènes dont les expressions sont les plus fortement impactées par le changement de température ont été étudiés plus en détail pour *B. afzelii* (**Tableau 13**) et *B. garinii* (**Tableau 14**). Les listes complètes de ces gènes pour chaque espèce sont disponibles en **Annexe 1** et **Annexe 2** de ce manuscrit. On retrouve pour chaque espèce un gène fortement surexprimé et codant une protéine Pfam. Les protéines de la famille Pfam sont responsables, chez les *Borreliella*, du positionnement des plasmides au sein de la cellule (Casjens et al., 2018). Cette constatation est à mettre en regard du fait que chez ces deux espèces, la majorité des gènes les plus fortement surexprimés est localisée sur des plasmides. Au contraire, la majorité des gènes pour lesquels l'expression est la plus fortement diminuée est localisée sur le chromosome.

Etant donné que la température de 33 °C mime la température interne de la tique au moment du repas de sang, on pourrait s'attendre à ce que cette augmentation de température entraîne une hausse de l'expression de gènes qui codent des protéines impliquées dans la virulence chez l'hôte. Or, on peut observer pour *B. afzelii* que l'un des gènes principalement sous-exprimé code une lipoprotéine associée à la virulence. A la suite de cette observation, l'expression des gènes codant pour les facteurs de virulences principaux des *Borreliella* a été recherchée. Seul le gène codant pour la Decorin Binding Protein (DBP) B de *B. afzelii* est surexprimé. Aucune différence d'expression n'a été mesurée pour les CRASP, ni pour les gènes *ospC* ou *vlsE*. Ainsi, il semblerait que l'expression de ces facteurs de virulence chez *B. afzelii* et *B. garinii* ne soit pas uniquement dépendante de la température et que d'autres facteurs viennent stimuler leur surexpression au moment de l'infection de l'hôte. Il est également possible que ces gènes soient exprimés de façon constitutive chez ces deux espèces, bien que cela soit peu probable s'ils sont effectivement impliqués dans leur virulence.

Tableau 13 : Protéines codées par les gènes dont les expressions sont les plus impactées par le changement de température chez *B. afzelii*.

B. afzelii

Rôle de la protéine codée	Localisation génomique	log2(FC)	Rôle de la protéine codée	Localisation génomique	log2(FC)
Aquaporine	Chromosome	-2,51	Hypothétique	Plasmide	6,14
Lipoprotéine associée à la virulence	Plasmide	-2,27	Hypothétique	Plasmide	6,05
GlpK : Glycérol kinase	Chromosome	-2,14	ABC transporteur	Plasmide	6,00
4-alpha-glucanotransferase	Chromosome	-2,03	Perméase	Plasmide	5,94
Glycerol-3-phosphate déshydrogénase/oxydase	Chromosome	-1,97	Hypothétique	Plasmide	5,89
BlyA : Transporteur membranaire de la famille des holines	Plasmide	-1,54	Hypothétique	Plasmide	5,48
Hypothétique	Chromosome	-1,35	Hypothétique	Plasmide	5,13
PTS lactose/cellobiose transporteur	Plasmide	-1,27	Lipoprotéine	Plasmide	4,84
Alanine racémase	Chromosome	-1,26	Pfam protéine	Plasmide	4,79
Protéine contenant un domaine GerMN	Chromosome	-1,21	Hypothétique	Plasmide	4,56

Les produits des dix gènes les plus fortement sous-exprimés et surexprimés sont présentés. La différence d'expression associée est indiquée dans la colonne log2(FC). Les colonnes correspondant aux gènes sous-exprimés sont colorées en bleu, celles correspondant aux gènes surexprimés sont colorées en rouge.

Tableau 14 : Protéines codées par les gènes dont les expressions sont les plus impactées par le changement de température chez *B. garinii*.

B. garinii

Rôle de la protéine codée	Localisation génomique	log2(FC)	Rôle de la protéine codée	Localisation génomique	log2(FC)
Hypothétique	Plasmide	-3,11	Hypothétique	Plasmide	1,60
Terminase d'une sous-unité de phage	Plasmide	-2,37	Hypothétique	Plasmide	1,56
Hypothétique	Chromosome	-2,13	Hypothétique	Plasmide	1,54
Protéine membranaire	Plasmide	-2,11	Lipoprotéine de la famille P12	Plasmide	1,53
Hypothétique	Chromosome	-1,54	Glucose-6-phosphate - déshydrogénase	Chromosome	1,40
PsgB : Protéine indépendante du Fer impliquée dans la dégradation du SAM	Chromosome	-1,45	Hypothétique	Plasmide	1,32
Hypothétique	Plasmide	-1,43	Hypothétique	Plasmide	1,31
Glutamate-O-méthyltransférase	Chromosome	-1,39	DnaJ : Protéine chaperone	Chromosome	1,23
ABC transporteur perméase	Chromosome	-1,39	Pfam protéine	Plasmide	1,21
RecJ : Exonucléase d'ADN simple brin	Chromosome	-1,35	Hypothétique	Plasmide	1,20

Les produits des dix gènes les plus fortement sous-exprimés et surexprimés sont présentés. La différence d'expression associée est indiquée dans la colonne log2(FC). Les colonnes correspondant aux gènes sous-exprimés sont colorées en bleu, celles correspondant aux gènes surexprimés sont colorées en rouge.

On peut également noter une sous-expression importante d'un gène codant une phage terminase chez *B. garinii* qui est situé sur le plasmide linéaire lp54 chez cette espèce. Aucun autre gène codant des protéines avec des fonctions similaires n'a été détecté au sein des 80 gènes différentiellement exprimés chez *B. garinii.* Nous avons exploré la présence de gènes codants pour de tels produits chez les 342 gènes différentiellement exprimés de *B. afzelii*. Cette espèce présente une expression différentielle de trois gènes codant des terminases de

phages. Parmi eux, un est sous-exprimé, les deux autres sont surexprimés. Ces gènes sont systématiquement situés sur des plasmides. L'expression de prophages et leur rôle dans le transfert horizontal de gènes a été exploré chez *B. burgdorferi* ss Eggers et al., 2016; Christian H. Eggers & Samuels, 1999). En revanche, aucune donnée n'est disponible quant à la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à produire des prophages. Il a été suggéré que les protéines BlyA et BlyB sont codées par un prophage chez *B. burgdorferi* ss (Damman et al., 2000). On peut voir que le gène codant la BlyA est l'un des gènes majoritairement sous-exprimés chez *B. afzelii* (**Tableau 13**). Il est donc possible que la diminution d'expression de ce gène soit liée à une baisse globale de production du prophage par *B. afzelii*.

Pour finir, nous avons exploré le rôle de la température sur l'expression des gènes de l'opéron *luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Aucune différence d'expression n'a été détectée en utilisant les filtres décrits précédemment (à savoir log2(FC) < -0,58 ou 0,58 < log2(FC) et log10(Pvalue) > 3). Ainsi, la température ne semble pas être un élément déterminant dans l'expression du gène *luxS*, et donc la communication, chez ces deux espèces.

Discussion et perspectives

Les bactéries ont longtemps été considérées comme des microorganismes unicellulaires seulement capables de réaliser des processus limités. Ce dogme a, peu à peu, été remis en question, du fait, notamment, de la découverte et la caractérisation des communautés microbiennes qui peuvent être composées d'une multitude de microorganismes. La composition de ces communautés est dynamique et évolue sous l'influence de multiples facteurs, aussi bien biotiques qu'abiotiques. L'étude de la composition et de l'évolution des communautés microbiennes représente ainsi de nombreux intérêts et enjeux, notamment en termes de santé humaine. En effet, il est aujourd'hui établi que les agents pathogènes sont fréquemment retrouvés au sein de communautés microbiennes qui peuvent modifier leur pouvoir de virulence. Cette donnée est l'essence même du concept de pathobiome qui vise à prendre en compte tout le cycle de vie d'agents pathogènes et non uniquement la caractérisation du processus infectieux (Vayssier-Taussat et al., 2014). Ainsi, le concept du pathobiome incite et souligne l'importance d'étudier des maladies infectieuses non pas uniquement via la compréhension du fonctionnement des pathogènes isolées et cultivés en laboratoire, mais également dans l'environnement naturel dans lequel ils évoluent et qui peut avoir un impact majeur sur leur virulence. Parmi les diverses interactions qui existent au sein d'une communauté microbienne, la communication bactérienne, ou *Quorum Sensing*, semble jouer un rôle central. Ce mécanisme permet de réguler et de coordonner divers processus bactériens tels que l'expression de certains gènes de virulence, la capacité à transférer de l'ADN, la formation de biofilms, etc. (Mukherjee & Bassler, 2019).

L'objectif de ces travaux de thèse était d'explorer la fonctionnalité et le rôle de la communication induite par AI-2 chez *B. afzelii* et *B. garinii*, les agents majoritairement responsables de la borréliose de Lyme en Europe. Les résultats obtenus ont mis en évidence que ces deux espèces sont dotées d'un gène *luxS* fonctionnel entraînant la production d'AI-2. Cette étude a également mis en lumière la capacité de ces deux espèces à se développer simultanément, lorsqu'elles sont co-cultivées en conditions de laboratoire. De plus, une campagne de prélèvement de nymphes d'*I. ricinus* dans l'ancienne région Poitou-Charentes a été réalisée, ayant pour but d'estimer le taux d'infection de ces tiques par *Borreliella*.

I. Analyse de la diversité des pathogènes au sein des tiques et du rôle des co-infections

Pour estimer le taux d'infection d'*I. ricinus* par *Borreliella* dans l'ancienne région Poitou-Charentes, le microbiote bactérien total de ces tiques a été caractérisé par séquençage haut-débit d'amplicons du gène codant l'ARNr 16S. Cette méthode nous a permis de détecter les séquences assignées au groupe *B. burgdorferi* sl mais également d'explorer la diversité bactérienne interne des nymphes d'*I. ricinus*. Les résultats obtenus ici ont montré que le microbiote bactérien interne de nos échantillons est largement dominé par vingt genres bactériens, représentant 73,27 % des séquences exploitées au cours de cette étude. Les séquences restantes (26,73 %) sont assignées à 827 taxa. Ces résultats indiquent que les nymphes d'*I. ricinus* contiennent une importante diversité bactérienne, contenant un grand nombre de taxa en faible ou très faible abondance. L'étude du rôle des communautés microbienne au sein des tiques a gagné en intérêt non seulement car les méthodes omiques appliquées aux communautés microbiennes se sont démocratisées, mais également car les tiques sont vectrices d'une importante diversité de pathogènes pour l'Homme et l'animal. Cette variété de pathogènes transmis par les tiques a mené à de nombreuses études visant à estimer les taux d'infection des tiques de l'environnement par ces pathogènes mais également à estimer les taux de co-infections d'un individu par plusieurs microorganismes pathogènes. Généralement, les co-infections recherchées sont des co-infections entre plusieurs bactéries pathogènes ou entre une bactérie et un parasite (le plus souvent *Babesia microti*). Les taux de co-infections des tiques rapportés dans la littérature varient énormément. Ainsi, selon les études, ce taux peut aller de 0,98% à 28% (Cutler et al., 2021; Diuk-Wasser et al., 2016; Moutailler et al., 2016; Nieto et al., 2018; Raileanu et al., 2017; Tokarz et al., 2019). La disparité de ces résultats peut être, en partie, expliquée par la variété des procédures expérimentales et les méthodes utilisées. A titre d'exemple, au cours de leur études, Moutailler et collaborateurs et Raileanu et collaborateurs ont exploré la présence de 14 et 11 microorganismes pathogènes au sein d'*I. ricinus* en quête d'un hôte et ont rapporté des taux de co-infections de 20,22% et 16,70%, respectivement (Moutailler et al., 2016; Raileanu et al., 2017). En revanche, Nieto et collaborateurs ont voulu détecter la présence de seulement quatre pathogènes (*B. burgdorferi ss, B. miyamotoi, Anaplasma phagocytophilum* et *Babesia microti*) au sein des tiques et ont relevé un taux de co-infections de 0,98 % (Nieto et al., 2018). Le nombre de pathogènes dont la présence est investiguée va donc avoir un impact majeur sur les taux de co-infections détectés. En revanche, il est important de souligner que

l'ensemble de ces études s'accorde sur le fait que plus de cinquante pourcents des tiques positives pour un pathogène sont également positives pour au moins un autre microorganisme pathogène. Par conséquent, la détection de multiples pathogènes au sein d'un individu ne semble pas être un évènement isolé mais reflète plutôt un phénomène fréquent. Cette observation soulève donc la question de la possible co-transmission de ces pathogènes à l'hôte au moment du repas de sang. Il faut cependant traiter ces résultats avec prudence puisque la vaste majorité des études réalisées pour déterminer des taux d'infections de tiques utilisent des méthodes de biologie moléculaire (qPCR ou séquençage haut-débit le plus souvent). Ces méthodes présentent l'avantage d'avoir une forte sensibilité et donc de mettre en évidence la présence de certains microorganismes faiblement abondants. En revanche, ces méthodes se basent sur l'amplification de l'ADN qui est une molécule inerte et qui peut potentiellement rester présente un certain temps au sein de l'échantillon, même si le microorganisme associé n'est plus vivant. Ainsi, il est essentiel de faire la distinction entre la co-détection de pathogènes et les co-infections par ces derniers puisqu'une détection d'ADN n'atteste en aucun cas de la présence d'un organisme viable et capable d'infection, il ne traduit que la présence de cet agent à un moment donné.

Au cours de l'étude de diversité que nous avons mené au sein de l'ancienne région Poitou-Charentes, des séquences d'ADN assignées à des bactéries du genre *Borreliella* ont pu être retrouvées au sein de 11,4% (20/175) des nymphes d'*I. ricinus* collectées. En explorant plus en détails ces résultats, il a été possible de distinguer, sur la base d'alignements des séquences partielles du gène codant l'ARNr 16S, quatre clusters d'espèces de *Borreliella* (les différences nucléotidiques n'étant pas suffisantes pour distinguer de façon certaine les espèces, celles-ci ont été regroupées en clusters). Cela nous a permis d'explorer la présence de plusieurs clusters d'espèces de *Borreliella* au sein d'une même nymphe d'*I. ricinus* et de mettre en avant que sur les 175 nymphes étudiées, 11 d'entre elles (6,3%) étaient positive pour au moins deux clusters. Ces résultats, bien qu'encourageants quant à la co-détection de plusieurs pathogènes, pourraient encore être améliorés, notamment en couplant une analyse par qPCR sur ces échantillons. L'utilisation de couples d'amorces discriminantes permettrait de distinguer de façon plus claire les différentes espèces détectées et ainsi obtenir des informations plus précises quant aux co-détections de plusieurs espèces de *Borreliella* au sein de nymphes d'*I. ricinus*. Les taux d'infections de nymphes ainsi que le taux de co-détections de plusieurs espèces de *Borreliella* au sein d'un même individu sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature, à savoir un taux d'infection des nymphes entre 10,1 et 11,8% et un taux de co-détections de 4,2% (Raileanu et al., 2017; Rauter & Hartung, 2005; Strnad et al., 2017). En revanche, les informations que nous avons obtenues permettent uniquement de suggérer la capacité des *Borreliella* détectées à infecter simultanément un seul hôte.

Les co-transmissions de pathogènes par les tiques et leurs éventuelles conséquences sur l'hôte ont principalement été explorées pour des pathogènes majeurs de l'Homme à savoir *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti* et *B. burgdorferi* sl (Cutler et al., 2021). Les conséquences de telles co-transmissions sont variées et vont dépendre non seulement de l'association considérée, de l'hôte chez lequel ce phénomène est étudié mais également des souches utilisées au moment de l'étude. Il a ainsi été suggéré qu'une co-transmission de *B. burgdorferi* ss et *B. microti* entraîne une meilleure résistance de cette dernière au système immunitaire de la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus)* et augmente donc la parasitémie (Dunn et al., 2014). La co-infection *in vivo* d'*A. phagocytophilum* et *B. burgdorferi* entraîne une baisse de la capacité de cette dernière à se disséminer chez la souris (Holden et al., 2005). Ces études illustrent les impacts que peuvent avoir les co-infections par plusieurs pathogènes sur la virulence des agents microbiens. Cependant, les études présentées ici ont été réalisées sur des souris et ne permettent donc pas d'avoir d'idée précise quant aux phénomènes de co-infections et de leurs conséquences chez l'Homme. L'étude du rôle de co-infections sur l'évolution des pathologies chez l'Homme représente encore un défi. Cela passe par la détection de multiples pathogènes, détection qui est mise en relation avec une évolution plus ou moins sévère des symptômes. L'étude de Parveen et Bhanot en 2019 indique qu'entre 2 et 19 % des patients atteints de borréliose de Lyme présentent également une babésiose (Parveen & Bhanot, 2019). Or, lorsque *B. burgdorferi* et *B. microti* sont toutes les deux détectées chez un même patients, les symptômes sont plus variés, intenses et persistants (Swanson et al., 2006). Jahfari et collaborateurs ont exploré la présence d'autres pathogènes chez les patients présentant un érythème migrant et ont montré que dans environ 2,5 % des cas, un autre pathogène est détecté (Jahfari et al., 2016). En revanche, la co-présence des pathogènes dans cette étude ne semble pas avoir d'impact sur les symptômes associés. La détection de pathogènes au sein de patients, tout comme au sein du vecteur, présente cependant des limites puisqu'elle se base sur la détection et la quantification de l'ADN du pathogène ou bien d'anticorps ciblés contre ce dernier. Ainsi, un résultat positif peut aussi bien venir d'une infection active par un pathogène que d'une exposition antérieure, potentiellement asymptomatique.

L'étude des phénomènes de co-transmission de pathogènes est le plus souvent axée sur la transmission simultanée de plusieurs genres bactériens. Or, la co-transmission de différentes espèces pathogènes appartenant au même genre bactérien peut également impacter l'évolution de la pathologie. En 2007, Hovius et collaborateurs ont réalisé des co-infections de souris par *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* (Hovius et al., 2007). Les résultats obtenus indiquent qu'une telle co-infection entraîne une pathologie plus sévère que lorsque les souris sont infectées avec une seule de ces deux espèces. De plus, l'inoculation simultanée

des deux espèces induit des scores d'arthrite plus important que lorsque *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* sont inoculées de manière séquentielle. Les auteurs ont également quantifié par qPCR la présence de ces deux espèces dans les différents tissus. Les résultats indiquent que chez les souris co-infectées, la quantité de *B. burgdorferi* ss est plus importante que chez les souris uniquement infectées par cette espèce. Au contraire, les souris co-infectées présentent moins de *B. garinii* que les souris infectées uniquement par cette espèce. Ces résultats indiquent donc un effet potentialisant de la présence de *B. garinii* sur la capacité à *B. burgdorferi* ss à se multiplier au sein de l'hôte. De plus, les auteurs indiquent qu'il n'a jamais été possible de détecter *B. garinii* dans le sang des souris co-infectées par les deux espèces. Cette observation soulève alors la question d'un éventuel effet potentialisant de la présence de *B. garinii* sur le processus infectieux de *B. burgdorferi* ss. Actuellement, aucune autre étude n'a exploré les impacts des co-transmissions de plusieurs espèces de *Borreliella.* Cela met en lumière un manque de connaissances sur les co-infections, notamment par *B. afzelii* et *B. garinii* qui sont majoritairement responsables de la pathologie en Europe et qui peuvent être co-détectées au sein d'une même tique.

II. Etude des interactions entre *B. afzelii* et *B. garinii* et de leur capacité à produire un signal de *Quorum Sensing*

Au cours du projet de thèse, l'étude du comportement *in vitro* de *B. afzelii* et *B. garinii* lorsqu'elles sont cultivées ensemble a été initié. Ainsi, nous avons pu observer que lorsque ces deux bactéries sont co-cultivées, elles conservent leur capacité à se développer à des vitesses similaires à celles observées en monocultures. Néanmoins, les concentrations cellulaires utilisées au moment de l'inoculation étaient d'environ $1*10^5$ cellules/mL et il est probable que ces concentrations soient supérieures à celles rencontrées chez l'hôte ou le vecteur. Afin d'avoir une vision plus proche de la réalité du comportement de ces bactéries, il faudrait réitérer les suivis de croissance en utilisant cette fois-ci des inocula moins concentrés. Les rapports arbitraires de co-cultures testés (1 : 1 ; 1 : 3 et 3 : 1) nous ont permis de valider une méthode de qPCR spécifique pour la discrimination et la quantification de *B. afzelii* et *B. garinii*. En revanche, il est également probable que, si un phénomène de co-infection a lieu, les rapports de bactéries soient différents de ceux testés dans cette étude (bien qu'aucune donnée sur le sujet ne soit actuellement disponible). Là encore, utiliser des rapports de concentrations relatives d'inoculations plus importants permettrait de déterminer si ces deux

espèces peuvent synchroniser leur croissance (grâce à un phénomène de Quorum Sensing par exemple), ou bien si l'espèce en excès va simplement prendre le pas sur l'autre (par un phénomène de compétition nutritionnelle par exemple). La méthode de qPCR pour la quantification spécifique de *B. afzelii* et *B. garinii* mise en place pour le suivi de croissance *in vitro* de ces deux espèces pourrait également être mise à profit pour, à plus long terme, leur quantification *in vivo* et ainsi pouvoir en tirer des indications quant aux conséquences d'une co-transmission de ces deux espèces. De la même manière, les bactéries transformées par les plasmides pTM61 et pBSV2G_P_{flaB}-mCherry^{Bb}, permettant l'expression de la GFP et de la mCherry respectivement, pourraient être utilisés afin de suivre la dissémination de ces deux espèces dans un modèle animal. Cette méthode a été utilisée chez *B. burgdorferi* ss afin de suivre sa dissémination et d'observer sa capacité à s'échapper du système circulatoire sanguin de la souris (Moriarty et al., 2008). Ainsi, ces outils permettraient de suivre l'évolution en temps réel et la répartition de ces deux espèces lorsqu'elles sont co-transmises à l'hôte afin d'obtenir plus d'informations quant au rôle potentiel des co-transmissions sur l'évolution de la pathologie. Au cours de la thèse, ces bactéries fluorescentes ont également été utilisées pour initier l'étude de leur capacité à former des biofilms. Nous avons ainsi pu observer que *B. afzelii*-mCherry et *B. garinii*-GFP sont toutes deux capables de former des structures apparentées à des biofilms *in vitro*, que ce soit en monoculture ou en co-cultures. Ces résultats sont en accord avec ceux de Timmaraju et collaborateurs qui ont montré que *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss sont toutes capables de former des biofilms *in vitro* (Timmaraju et al., 2015). En revanche, les biofilms obtenus pour les co-cultures étaient le plus souvent constitués d'une seule espèce et il semble n'y avoir que peu d'interactions physiques entre *B. afzelii* et *B. garinii* dans ces conditions. Les bactéries fluorescentes utilisées dans cette étude pourraient permettre, à plus long terme, d'étudier la capacité de ces deux espèces à former des biofilms *in vivo*. La présence de biofilms formés par *Borreliella* a en effet été détectée dans des biopsies de lymphocytomes borréliens (Sapi et al., 2016). Cependant, les espèces de *Borreliella* impliquées dans la formation des biofilms n'ont pas été caractérisées. De plus, il a récemment été montré que *Borreliella* spp. est capable de s'associer à d'autres microorganismes pour former des biofilms mixtes dans des cas d'infections humaines. Ainsi, des biofilms mixtes *Borreliella* – *Chlamydia* ont été détectés au sein de lymphocytomes borréliens (Sapi et al., 2019). De plus, des biofilms mixtes *Borreliella* – *Helicobacter pylori* ont également été reportés (Middelveen et al., 2019). Dans la mesure où *Borreliella* spp. est capable de former des biofilms mixtes avec des genres bactériens différents, il est surprenant qu'aucun biofilm mixte *B. afzelii* – *B. garinii* n'ait pu être clairement observé dans notre étude. La faible intensité d'expression de la mCherry a pu entraîner un biais dans l'observation des biofilms si toutes les cellules et biofilms de cette espèce n'ont pas pu être observés. Il sera donc nécessaire d'optimiser la méthode d'étude des biofilms et de réitérer l'expérience afin de

nous assurer que les résultats obtenus reflètent bien une certaine réalité biologique. Il serait ainsi intéressant de vérifier si chacune de ces espèces est capable de coloniser un biofilm préformé de l'autre. Si toutefois l'incapacité à former des biofilms mixtes entre ces deux espèces était avérée, cela pourrait indiquer l'existence de mécanismes naturels d'exclusion entre ces deux espèces. L'optimisation de la méthode développée devra commencer par l'utilisation d'un plasmide permettant une meilleure expression de la mCherry. En effet, le plasmide pBSV2G_P_{flaB}-mCherry^{Bb} est un plasmide d'expression de la mCherry initialement construit pour être utilisée chez *B. burgdorferi* ss (Takacs et al., 2018). Pour la construction de ce plasmide, les auteurs ont réalisé une étape d'optimisation de codons pour permettre une meilleure expression de la protéine chez *B. burgdorferi* ss. Il est possible que le gène optimisé pour l'expression de la mCherry ne soit pas approprié pour l'expression de cette protéine chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Cette hypothèse pourrait également expliquer qu'aucune fluorescence dans la rouge n'ait pu être détectée chez *B. garinii* après plusieurs des essais de transformation par ce plasmide. L'utilisation de plasmides d'expression de protéines fluorescentes plus adaptés à ces deux espèces permettrait d'avoir une idée plus précise de leurs éventuelles interactions, notamment dans la formation de biofilms. Pour cela, il pourrait être envisagé de construire un plasmide utilisant l'origine de réplication d'un plasmide naturel de chacune de ces espèces. Par exemple, l'utilisation de l'origine de réplication cp26 pourrait être envisagée étant donné que ce plasmide est conservé au sein des souches de *B. afzelii* et *B. garinii* (Casjens et al., 2018).

C'est chez *B. burgdorferi* ss que la capacité à former des biofilms a été le plus étudiée. En 2016, une étude a notamment exploré le rôle de deux régulateurs transcriptionnels (RpoN et RpoS) ainsi que de LuxS dans la capacité de cette espèce à former des biofilms *in vitro* (Sapi et al., 2016). Pour cela, des souches mutées sur chacun de ces trois gènes ont été utilisées. Les résultats ont montré que les trois souches mutantes, et notamment la souche Δ*luxS*, forment des biofilms plus petits et moins stables que ceux de la souche sauvage. De plus, la délétion de *luxS* entraîne une sensibilité accrue à la doxycycline, là où les souches Δ*rpoN* et Δ*rpoS* ne présentent que peu de différences avec la souche sauvage. Dans le cadre de notre étude, il serait intéressant d'étudier le rôle de *luxS* et du QS induit par AI-2 dans la capacité de *B. afzelii* et *B. garinii* à former des biofilms et dans leur résistance aux antibiotiques. Pour cela, nous avons initié la production hétérologue de la protéine LsrK. Cette dernière nous permettra, après avoir vérifié de façon plus approfondie son activité, de bloquer la communication AI-2 dépendante et ainsi d'étudier le rôle de celle-ci chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Le *Quorum Quenching* par LsrK pourra être utilisé dans l'étude du QS sur des cultures *in vitro*, en revanche, dans des perspectives d'études du rôle de la communication *in vivo*, cette méthode pourrait atteindre ses limites. En effet, les études *in vivo* de *Borreliella*

nécessitent généralement des temps allant de plusieurs semaines à plusieurs mois (Barbour, 1988; Cuellar et al., 2019; Hovius et al., 2007). Durant ce laps de temps, la bactérie ne pourra pas être continuellement exposée à la protéine LsrK et pourra probablement rétablir son phénotype sauvage par la production d'AI-2. L'alternative pourrait être la génération de mutants Δ*luxS* chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Nous avons travaillé à la mise en place de tels mutants, en essayant de construire un vecteur suicide permettant d'inactiver le gène *luxS* par un phénomène de recombinaison homologue. Bien que cette méthode n'ait jamais abouti, il est possible d'envisager d'autres approches. Récemment, la technique CRISPR a été adaptée pour une utilisation chez *B. burgdorferi* ss (Takacs et al., 2021). Cette technique a été appliquée à quatre gènes distincts et a induit une diminution de l'expression d'au moins 95% pour chacun d'entre eux. L'utilisation de cette méthode chez *B. afzelii* et *B. garinii* pourrait alors permettre l'obtention des premières souches Δ*luxS* pour ces deux espèces. Ces dernières nous permettraient d'obtenir des données quant au rôle de la communication AI-2 dépendante de *B. afzelii* et *B. garinii*, tout d'abord *in vitro* et, dans le futur, *in vivo*. De plus, lors des études *in vitro*, le blocage de la communication par l'utilisation de LsrK et par le mutant Δ*luxS* pourraient apporter des résultats complémentaires. En effet, la délétion du gène *luxS* va effectivement impacter la production du DPD et donc d'AI-2, mais LuxS est également impliqué dans la voie métabolique de la méthionine chez *B. burgdorferi* ss (von Lackum et al., 2006). Ainsi, lorsque le rôle de la communication induite par AI-2 est uniquement étudiée à l'aide d'un mutant Δ*luxS*, il n'est pas possible de déterminer si les différences observées sont effectivement la conséquence du blocage de la communication ou bien une conséquence de la modification de cette voie métabolique.

Le rôle de *luxS* dans la virulence a été étudié chez *B. burgdorferi* ss. Bien que ce gène ne soit pas indispensable à la colonisation de la tique, la transmission à l'hôte et l'établissement de la pathologie (Blevins et al., 2004; Hübner et al., 2003), sa présence confère tout de même un avantage certain à la bactérie dans le processus infectieux (Arnold et al., 2015). Lors d'études *in vitro*, il a été mis en évidence qu'AI-2 modifie les profils d'expression protéique de *B. burgdorferi* ss de manière dépendante de la température (Babb et al., 2005; Stevenson & Babb, 2002). Au total, environ 50 protéines voient leur expression modifiée par l'ajout d'un surnageant contenant AI-2 lors de la culture de cette espèce. Les protéines dont l'expression est modifiée par ce traitement sont différentes selon que *B. burgdorferi* ss est cultivée à 23°C (qui mime la température interne de la tique en quête) ou 33°C (qui mime la température interne de la tique au moment du repas de sang). Cela suggère que l'impact d'AI-2 sur l'expression protéique de *B. burgdorferi* ss peut changer en fonction du cycle de vie de la bactérie. Parmi les protéines dont l'expression est impactée par AI-2 chez *B. burgdorferi* ss, on retrouve notamment des protéines de la famille Erp (Stevenson & Babb, 2002), la protéine

VlsE (Babb et al., 2005) et la lipoprotéine IpLA7 (von Lackum et al., 2007). Ces protéines sont décrites dans la littérature pour leur rôle dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte et sont donc impliquées dans le processus infectieux de la bactérie. L'expression des gènes qui codent ces protéines seront les premiers candidats évalués lorsque le blocage de la communication que nous envisageons sera effectif chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Il sera ainsi possible de réaliser une comparaison entre *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* en ce qui concerne les processus biologiques contrôlés par la communication AI-2 dépendante.

Au cours de cette étude, la réponse transcriptomique globale de *B. afzelii* et *B. garinii* au changement de température a été étudiée par séquençage des ARNm totaux. Les résultats obtenus ont montré que *B. afzelii* et *B. garinii* répondent différemment au changement de température mimant le passage de la tique à l'hôte vertébré. L'expression des gènes semble plus fortement impactée par le changement de température chez *B. afzelii* (342 gènes différentiellement exprimés) par rapport à *B. garinii* (80 gènes différentiellement exprimés). De plus, la localisation génomique des gènes différentiellement exprimés varie d'une espèce à l'autre. Ainsi, les gènes surexprimés sont principalement situés sur des plasmides et les gènes sous-exprimés principalement localisés sur le chromosome chez *B. afzelii*. Chez *B. garinii,* la majorité des gènes différentiellement exprimés sont localisés sur le chromosome, indépendamment de leur surexpression ou de leur sous-expression. Le rôle de la température dans l'expression globale des gènes chez *B. burgdorferi* ss a déjà été étudié (Ojaimi et al., 2003; Popitsch et al., 2017). Il est important de souligner que, bien qu'informatives, les études du rôle de la température sur l'expression des gènes chez les *Borreliella* ne sont pas suffisantes pour mimer de façon précise le passage du vecteur à l'hôte puisque d'autres paramètres physico-chimiques vont également varier (Iyer et al., 2015). Chez *B. burgdorferi* ss, le changement de température entraîne une expression différentielle de 215 gènes avec une surexpression de 133 gènes à 35°C et une sous-expression de 82 gènes à cette même température (Ojaimi et al., 2003). De plus, les auteurs ont également montré que 63 % des gènes différentiellement exprimés par *B. burgdorferi* ss en réponse au changement de température sont localisés sur des plasmides, mettant en avant le rôle prépondérant de ces derniers dans la capacité d'adaptation de la bactérie. D'autre part, le changement de température entraîne des modifications dans l'expression de petits ARNs régulateurs (small RNA ; sRNA) chez *B. burgdorferi* ss (Popitsch et al., 2017). Dans cette étude, plus de 1000 sRNAs ont été identifiés et 43% d'entre eux sont différentiellement exprimés en réponse à la température, suggérant un rôle important de ces régulateurs transcriptionnels lors du changement de température. Le rôle des sRNAs dans la régulation de l'expression des gènes chez les bactéries a gagné en intérêt au cours des dernières années (Bloch et al., 2017; Jørgensen et al., 2020) et *B. burgdorferi* ss ne fait pas exception (Lybecker & Samuels, 2017).

Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée quant à la présence et l'expression différentielle des sRNAs chez les autres espèces de *Borreliella*. Les données de transcriptomique générées au cours de cette étude pourraient être utilisées pour initier une telle étude chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Pour l'heure, l'étude du rôle d'AI-2 chez *B. burgdorferi* ss n'a été réalisée que par des méthodes d'électrophorèses bi-dimensionnelles (Babb et al., 2005; Stevenson & Babb, 2002). Bien que cette méthode soit informative sur les différences d'expression de protéines entre la souche sauvage et le mutant Δ*luxS*, elle présente tout de même une sensibilité bien plus faible que les méthodes d'analyses transcriptomiques ou protéomiques modernes. Ainsi, dans notre étude, il est envisagé de compléter l'analyse transcriptomique déjà effectuée par la réalisation d'un nouveau séquençage des ARNm totaux. Pour ce nouveau séquençage, il est envisagé de séquencer les ARNm totaux de *B. afzelii* et *B. garinii* à 23°C et 33°C, mais en bloquant cette fois-ci la communication induite par AI-2, soit par l'utilisation de la protéine LsrK, soit en utilisant un mutant de délétion du gène *luxS*. Cette méthode permettra d'obtenir de précieuses informations quant aux gènes dont la transcription est contrôlée par la Quorum Sensing AI-2 dépendant chez ces deux espèces. Il sera alors possible d'obtenir d'éventuelles pistes pour expliquer les différences de réponses qui sont mises en place par ces deux espèces et qui pourraient expliquer les nombreuses différences qu'elles présentent.

Conclusion

Pour résumer, au cours de ces travaux de thèse, nous avons caractérisé le microbiote bactérien interne de nymphes d'*I. ricinus* collectées dans l'ancienne région Poitou-Charentes. Les résultats obtenus ont permis de montrer que les individus collectés présentent une importante diversité bactérienne mais qui est faiblement abondante. Cette étude a également permis de mettre en évidence la présence de séquences assignées au genre *Borreliella* dans 11,4% des individus collectés. De plus, des séquences potentiellement assignées à différentes espèces de *Borreliella* ont été co-détectées dans 6,3% des échantillons analysés.

En parallèle, ces travaux ont permis d'initier l'étude de la communication AI-2 dépendante chez *B. afzelii* et *B. garinii*, les deux agents majoritairement responsables de la borréliose de Lyme en Europe. Il a ainsi été mis en évidence que ces deux espèces sont dotées d'un gène *luxS* fonctionnel qui permet la production d'AI-2. En ce qui concerne le suivi de l'expression du gène *luxS* et la production d'AI-2, ces deux espèces présentent le même comportement, à savoir un pic de production en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire suivi d'une baisse drastique dans la phase stationnaire plus tardive. Le rôle de la communication induite par AI-2 chez ces deux espèces doit encore être confirmé, notamment par l'utilisation de la protéine LsrK qui permet d'entraîner un blocage de celle-ci. De plus, les outils développés au cours de cette thèse, notamment la méthode de qPCR discriminante et les bactéries transformées par des plasmides permettant l'expression de protéines fluorescentes, permettront d'étudier plus en détail les éventuelles interactions qui peuvent exister entre ces deux espèces. Enfin, l'analyse transcriptomique de ces deux espèces a permis d'obtenir des informations préliminaires quant à leur activité transcriptionnelle en réponse à un changement de température. Le jeu de données que nous avons obtenu pour l'étude transcriptionnelle n'a pas encore été exploité dans son intégralité et d'autres analyses sont encore nécessaires pour connaître de façon plus précise le rôle que joue la température chez ces deux espèces.

L'ensemble de ces résultats pourra servir de base à l'étude du rôle que joue la communication induite par AI-2 chez ces deux espèces indépendamment, mais également dans un contexte de co-infection chez l'hôte. Ainsi, il sera possible d'explorer les mécanismes qui diffèrent entre ces deux espèces et qui pourraient être responsables des caractéristiques propres à chacune. L'étude de ces caractéristiques semble indispensable si l'on veut un jour comprendre tous les facteurs impliqués dans la borréliose de Lyme et ainsi apporter des soins plus adaptés aux milliers de personnes atteintes de cette pathologie chaque année dans le monde.

Bibliographie

Abraham, N. M., Liu, L., Jutras, B. L., Yadav, A. K., Narasimhan, S., Gopalakrishnan, V., Ansari, J. M., Jefferson, K. K., Cava, F., Jacobs-Wagner, C., & Fikrig, E. (2017). Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(5), E781–E790. https://doi.org/10.1073/pnas.1613422114

Acet, Ö., Erdönmez, D., Acet, B. Ö., & Odabaşı, M. (2021). N-acyl homoserine lactone molecules assisted quorum sensing: effects consequences and monitoring of bacteria talking in real life. *Archives of Microbiology*, *203*(7), 3739–3749. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02381-9

Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus Borrelia into two genera: The emended genus Borrelia containing only the members of the relapsing fever Borrelia, and the genus Borreliella gen. nov. containing the members o. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *105*(6), 1049–1072. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0164-x

Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D. A., Bollin, C., Bolton, E., Bourexis, D., Brister, J. R., Bryant, S. H., Canese, K., Cavanaugh, M., Charowhas, C., Clark, K., Dondoshansky, I., Feolo, M., Fitzpatrick, L., Funk, K., Geer, L. Y., Gorelenkov, V., … Zbicz, K. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D8–D13. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095

Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Baimai, V., & Grubhoffer, L. (2013). Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiologica*, *58*(5), 419–428. https://doi.org/10.1007/s12223-013-0222-1

Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W. R., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P. W., Rincón, M., Kantor, F. S., & Fikrig, E. (2002). Salp15, an Ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*, *16*(6), 849–859. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00325-4

Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C., & Finlay, B. B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, *156*(8), 2271–2282. https://doi.org/10.1099/mic.0.038794-0

Aounallah, H., Bensaoud, C., M'ghirbi, Y., Faria, F., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2020). Tick Salivary Compounds for Targeted Immunomodulatory Therapy. *Frontiers in Immunology*, *11*(September), 1–15. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583845

Arnold, W. K., Savage, C. R., Antonicello, A. D., & Stevenson, B. (2015). Apparent role for Borrelia burgdorferi LuxS during mammalian infection. *Infection and Immunity*. https://doi.org/10.1128/IAI.00032-15

Arnold, W. K., Savage, C. R., Brissette, C. A., Seshu, J., Livny, J., & Stevenson, B. (2016). RNA-Seq of Borrelia burgdorferi in multiple phases of growth reveals insights into the dynamics of gene expression, transcriptome architecture, and noncoding RNAs. *PLoS ONE*, *11*(10), 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164165

Babb, K., Von Lackum, K., Wattier, R. L., Riley, S. P., & Stevenson, B. (2005). Synthesis of autoinducer 2 by the lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. *Journal of Bacteriology*. https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3079-3087.2005

Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, *55*(3), 541–555. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009

Banerji, R., Kanojiya, P., & Saroj, S. D. (2020). Role of interspecies bacterial communication in the virulence of pathogenic bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *46*(2), 136–146. https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1735991

Baranton, G. U. Y., Postic, D., Girons, S., Boerlin, P., Piffaretti, J., Assous, M., & Grimonp, P. A. D. (1992). Delineation of Borrelia burgdorferi Sensu Stricto, Borrelia garinii sp . nov ., and Group VS461 Associated with Lyme Borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *42*(July), 378–383.

Barbour, A. G. (1984). Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *57*(4), 521–525.

Barbour, A. G. (1988). Laboratory aspects of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *1*(4), 399–414. https://doi.org/10.1128/CMR.1.4.399

Barbour, A. G., & Hayes, S. F. (1986). Biology of Borrelia species. *Microbiological Reviews*, *50*(4), 381–400. https://doi.org/10.1128/mmbr.50.4.381-400.1986

Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(6), 582–587. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00025-9

Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Cell*, *125*(2), 237–246. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.001

Baxter, J. C., & Funnell, B. E. (2014). Plasmid Partition Mechanisms. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 133–155. https://doi.org/10.1128/9781555818982.ch8

Beati, L., & Klompen, H. (2019). Phylogeography of ticks (Acari: Ixodida). In *Annual Review of Entomology* (Vol. 64, Issue October 2018, pp. 379–397). https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043027

Becker, R. A., & Wilks, A. R. (2018). *maps: Draw Geographical Maps*. https://cran.r-project.org/web/packages/maps/

Belisle, J. T., Brandt, M. E., Radolf, J. D., & Norgard, M. V. (1994). Fatty acids of Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins. *Journal of Bacteriology*, *176*(8), 2151–2157. https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2151-2157.1994

Belli, A., Sarr, A., Rais, O., Rego, R. O. M., & Voordouw, M. J. (2017). Ticks infected via co-feeding transmission can transmit Lyme borreliosis to vertebrate hosts. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05231-1

Benoit, J. B., & Denlinger, D. L. (2010). Meeting the challenges of on-host and off-host water balance in blood-feeding arthropods. In *Journal of Insect Physiology* (Vol. 56, Issue 10). https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.02.014

Bergström, S., & Normark, J. (2018). Microbiological features distinguishing Lyme disease and relapsing fever spirochetes. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *130*(15–16), 484–490. https://doi.org/10.1007/s00508-018-1368-2

Bhide, M. R., Travnicek, M., Levkutova, M., Curlik, J., Revajova, V., & Levkut, M. (2005). Sensitivity of Borrelia genospecies to serum complement from different animals and human: A host-pathogen relationship. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *43*(2), 165–172. https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.07.012

Bierwagen, P., Sliwiak, J., Jaskolski, M., & Urbanowicz, A. (2021). Strong interactions between Salp15 homologues from the tick I. ricinus and distinct types of the outer surface OspC protein from Borrelia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(2), 101630.

https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101630

Binetruy, F., Dupraz, M., Buysse, M., & Duron, O. (2019). Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3517-5

Biškup, U. G., Strle, F., & Ružić-Sabljić, E. (2011). Loss of plasmids of Borrelia burgdorferi sensu lato during prolonged in vitro cultivation. *Plasmid*, *66*(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.02.006

Blevins, J. S., Revel, A. T., Caimano, M. J., Yang, X. F., Richardson, J. A., Hagman, K. E., & Norgard, M. V. (2004). The luxS gene is not required for Borrelia burgdorferi tick colonization, transmission to a mammalian host, or induction of disease. *Infection and Immunity*, *72*(8), 4864–4867. https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4864-4867.2004

Bloch, S., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., & Nejman-Faleńczyk, B. (2017). Small and smaller—sRNAs and MicroRNAs in the regulation of toxin gene expression in prokaryotic cells: A mini-review. *Toxins*, *9*(6). https://doi.org/10.3390/toxins9060181

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., … Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9

Bonnet, Sarah I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A. M., & Duron, O. (2017). The tick microbiome: Why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(June), 1–14. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00236

Bonnet, Sarah Irène, & Pollet, T. (2021). Update on the intricate tango between tick microbiomes and tick-borne pathogens. *Parasite Immunology*, *43*(5), 0–2. https://doi.org/10.1111/pim.12813

Bontemps-Gallo, S., Lawrence, K. A., Richards, C. L., & Gherardini, F. C. (2018). Genomic and phenotypic characterization of Borrelia afzelii BO23 and Borrelia garinii CIP 103362. *PLoS ONE*, *13*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199641

Bourret, T. J., Lawrence, K. A., Shaw, J. A., Lin, T., Norris, S. J., & Gherardini, F. C. (2016). The nucleotide excision repair pathway protects Borrelia burgdorferi from nitrosative stress in Ixodes scapularis ticks. *Frontiers in Microbiology*, *7*(SEP), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01397

Brenner, E. V., Kurilshikov, A. M., Stronin, O. V., & Fomenkoa, N. V. (2012). Whole-genome sequencing of Borrelia garinii BgVir, isolated from taiga ticks (Ixodes persulcatus). *Journal of Bacteriology*, *194*(20), 5713–5713. https://doi.org/10.1128/JB.01360-12

Brissette, C. A., Haupt, K., Barthel, D., Cooley, A. E., Bowman, A., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P. F., Kraiczy, P., & Stevenson, B. (2009). Borrelia burgdorferi infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infection and Immunity*, *77*(1), 300–306. https://doi.org/10.1128/IAI.01133-08

Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., & Jannasch, H. W. (2016). *Lyme Disease--A Tick-Borne Spirochetosis ? Grunwaldt and Jeffrey P . Davis Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/1689391 Accessed : 27-03-2016 18 : 28 UTC Your use of the JSTOR archive*. *216*(4552), 1317–1319.

Burgdorfer, W., & Brinton, L. P. (1975). Mechanisms of Transovarial Infection of Spotted

Fever Rickettsiae in Ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *266*(1), 61–72. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35088.x

Bykowski, T., Woodman, M. E., Cooley, A. E., Brissette, C. A., Brade, V., Wallich, R., Kraiczy, P., & Stevenson, B. (2007). Coordinated expression of Borrelia burgdorferi complement regulator-acquiring surface proteins during the lyme disease spirochete's mammal-tick infection cycle. *Infection and Immunity*, *75*(9), 4227–4236. https://doi.org/10.1128/IAI.00604-07

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

Cardenas-de la Garza, J. A., De la Cruz-Valadez, E., Ocampo-Candiani, J., & Welsh, O. (2019). Clinical spectrum of Lyme disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *38*(2), 201–208. https://doi.org/10.1007/s10096-018-3417-1

Carrasco, S. E., Troxell, B., Yang, Y., Brandt, S. L., Li, H., Sandusky, G. E., Condon, K. W., Serezani, C. H., & Yang, X. F. (2015). Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects Borrelia burgdorferi from phagocytosis by macrophages. *Infection and Immunity*, *83*(12), 4848–4860. https://doi.org/10.1128/IAI.01215-15

Case, R. J., Labbate, M., & Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: Their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME Journal*, *2*(4), 345–349. https://doi.org/10.1038/ismej.2008.13

Casjens, S., Delange, M., Ley, H. L., Rosa, P., & Wai Mun Huang. (1995). Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: Genetic diversity and conservation of gene order. *Journal of Bacteriology*, *177*(10), 2769–2780. https://doi.org/10.1128/jb.177.10.2769-2780.1995

Casjens, S. R., Di, L., Akther, S., Mongodin, E. F., Luft, B. J., Schutzer, S. E., Fraser, C. M., & Qiu, W. G. (2018). Primordial origin and diversification of plasmids in Lyme disease agent bacteria. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–24. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4597-x

Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W. G., Dunn, J. J., Luft, B. J., Fraser-Liggett, C. M., & Schutzer, S. E. (2011). Whole-Genome sequences of two Borrelia afzelii and two Borrelia garinii Lyme disease agent isolates. *Journal of Bacteriology*, *193*(24), 6995–6996. https://doi.org/10.1128/JB.05951-11

Casjens, Sherwood, Palmer, N., Van Vugt, R., Huang, W. M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R. J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., & Fraser, C. M. (2000). A bacterial genome in flux: The twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi. *Molecular Microbiology*, *35*(3), 490–516. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01698.x

Castellino, F. J., & Ploplis, V. A. (2005). Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and Haemostasis*, *93*(4), 647–654. https://doi.org/10.1160/TH04-12-0842

Chaconas, G., Castellanos, M., & Verhey, T. B. (2020). Changing of the guard: How the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(2), 301–313. https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008583

Charon, N. W., Cockburn, A., Li, C., Liu, J., Miller, K. A., Miller, M. R., Motaleb, M. A., & Wolgemuth, C. W. (2012). The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of Microbiology*, *66*, 349–370. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150145

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*. https://doi.org/10.1038/415545a

Cho, J., Jenneson, S., Lane, M., & Macfadyen, A. (2003). The Effects of Altering Autoinducer-2 Concentration on Transfer Efficiencies of the F and RPI plasmids to the Quorum Sensing Recipient Escherichia coli Strain AB1157. *Microbiology and Immunology*, *3*(April), 8–14.

Christe, M., Rutti, B., & Brossard, M. (2000). Cytokines (IL-4 and IFN-γ) and antibodies (IgE and IgG2a) produced in mice infected with Borrelia burgdorferi sensu stricto via nymphs of Ixodes ricinus ticks or syringe inoculations. *Parasitology Research*, *86*(6), 491–496. https://doi.org/10.1007/s004360050699

Coipan, E. C., Jahfari, S., Fonville, M., Oei, G. A., Spanjaard, L., Takumi, K., Hovius, J. W. R., & Sprong, H. (2016). Imbalanced presence of Borrelia burgdorferi s.l. multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Infection, Genetics and Evolution*, *42*, 66–76. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.019

Cuellar, J., Pietikäinen, A., Glader, O., Liljenbäck, H., Söderström, M., Hurme, S., Salo, J., & Hytönen, J. (2019). Borrelia burgdorferi Infection in Biglycan Knockout Mice. *Journal of Infectious Diseases*, *220*(1), 116–126. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz050

Cutler, S. J., Vayssier-Taussat, M., Estrada-Peña, A., Potkonjak, A., Mihalca, A. D., & Zeller, H. (2021). Tick-borne diseases and co-infection: Current considerations. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(1). https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101607

Damman, C. J., Eggers, C. H., Samuels, D. S., & Oliver, D. B. (2000). Characterization of Borrelia burgdorferi BlyA and BlyB proteins: A prophage-encoded holin-like system. *Journal of Bacteriology*, *182*(23), 6791–6797. https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6791-6797.2000

Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. In *Trends in Parasitology*. https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003

Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A., & Callahan, B. J. (2017). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Simple Statistical Identification and Removal of Contaminant Sequences in Marker-Gene and Metagenomics Data*, 221499. https://doi.org/10.1101/221499

De Meeûs, T., Koffi, B. B., Barré, N., de Garine-Wichatitsky, M., & Chevillon, C. (2010). Swift sympatric adaptation of a species of cattle tick to a new deer host in New Caledonia. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(7), 976–983. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.06.005

Díaz-Sánchez, S., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., & de la Fuente, J. (2019). Evolutionary Insights into the Tick Hologenome. *Trends in Parasitology*, *35*(9), 725–737. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.014

Diuk-Wasser, M. A., Vannier, E., & Krause, P. J. (2016). Coinfection by Ixodes Tick-Borne Pathogens: Ecological, Epidemiological, and Clinical Consequences. *Trends in Parasitology*, *32*(1), 30–42. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.008

Duan, K., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H., & Surette, M. G. (2003). Modulation of Pseudomonas aeruginosa gene expression by host microflora through interspecies communication. *Molecular Microbiology*, *50*(5), 1477–1491. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03803.x

Dunham-Ems, S. M., Caimano, M. J., Pal, U., Wolgemuth, C. W., Eggers, C. H., Balic, A., & Radolf, J. D. (2009). Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of Borrelia burgdorferi within ticks. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(12), 3652–3665. https://doi.org/10.1172/JCI39401

Dunn, J. M., Krause, P. J., Davis, S., Vannier, E. G., Fitzpatrick, M. C., Rollend, L., Belperron, A. A., States, S. L., Stacey, A., Bockenstedt, L. K., Fish, D., & Diuk-Wasser, M. A. (2014). Borrelia burgdorferi Promotes the Establishment of Babesia microti in the Northeastern United States. *PLoS ONE*, *9*(12), e115494. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115494

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340

Eggers, C. H., Kimmel, B. J., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., & Samuels, D. S. (2001). Transduction by φBB-1, a bacteriophage of Borrelia burgdorferi. *Journal of Bacteriology*, *183*(16), 4771–4778. https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4771-4778.2001

Eggers, Christian H., Gray, C. M., Preisig, A. M., Glenn, D. M., Pereira, J., Ayers, R. W., Alshahrani, M., Acabbo, C., Becker, M. R., Bruenn, K. N., Cheung, T., Jendras, T. M., Shepley, A. B., & Moeller, J. T. (2016). Phage-mediated horizontal gene transfer of both prophage and heterologous DNA by φBB-1, a bacteriophage of Borrelia burgdorferi. *Pathogens and Disease*, *74*(9), 1–32. https://doi.org/10.1093/femspd/ftw107

Eggers, Christian H., & Samuels, D. S. (1999). Molecular evidence for a new bacteriophage of Borrelia burgdorferi. *Journal of Bacteriology*, *181*(23), 7308–7313. https://doi.org/10.1128/jb.181.23.7308-7313.1999

Emms, D. M., & Kelly, S. (2017). STRIDE: Species tree root inference from gene duplication events. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(12), 3267–3278. https://doi.org/10.1093/molbev/msx259

Emms, D. M., & Kelly, S. (2018). STAG: Species Tree Inference from All Genes. *BioRxiv*, 1–29. https://doi.org/https://doi.org/10.1101/267914

Emms, D. M., & Kelly, S. (2019). OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biology and Evolution*, *20*(238). https://doi.org/10.1101/466201

Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as Vectors. *Encyclopedia of Parasitology*, *34*(1), 2729–2729. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4_3182

Estrada-Peña, Agustín, Cutler, S., Potkonjak, A., Vassier-Tussaut, M., Bortel, W., Zeller, H., Fernández-Ruiz, N., & Mihalca, A. D. (2018). An updated meta-analysis of the distribution and prevalence of Borrelia burgdorferi s.l. in ticks in Europe. *International Journal of Health Geographics*, *17*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12942-018-0163-7

Estrada-Peña, Agustín, & De La Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, *108*(1), 104–128. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016

Estrada-Peña, Agustín, Ortega, C., Sánchez, N., DeSimone, L., Sudre, B., Suk, J. E., & Semenza, J. C. (2011). Correlation of Borrelia burgdorferi Sensu lato prevalence in questing Ixodes ricinus ticks with specific abiotic traits in the Western Palearctic. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(11), 3838–3845. https://doi.org/10.1128/AEM.00067-11

Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(8), 538–550. https://doi.org/10.1038/nrmicro2832

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., & Spring, D. R. (2011). Quorum sensing in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews*, *111*(1), 28–67. https://doi.org/10.1021/cr100109t

Gern, L. (2009). Life Cycle of Borrelia burgdorferi sensu lato and Transmission to Humans. In *Current Problems in Dermatology*. https://doi.org/10.1159/000213068

Glöckner, G., Schulte-Spechtel, U., Schilhabel, M., Felder, M., Sühnel, J., Wilske, B., & Platzer, M. (2006). Comparative genome analysis: Selection pressure on the Borrelia vls cassettes is essential for infectivity. *BMC Genomics*, *7*, 1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-211

Gottlieb, Y., Lalzar, I., & Klasson, L. (2015). Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two Coxiella-like endosymbionts in ticks. *Genome Biology and Evolution*, *7*(6), 1779–1796. https://doi.org/10.1093/gbe/evv108

Grange, F., Wechsler, J., Guillaume, J. C., Tortel, J., Tortel, M. C., Audhuy, B., Jaulhac, B., & Cerroni, L. (2002). Borrelia burgdorferi-associated lymphocytoma cutis simulating a primary cutaneous large B-cell lymphoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *47*(4), 530–534. https://doi.org/10.1067/mjd.2002.120475

Greenberg, E. P., Hastings, J. W., & Ulitzur, S. (1979). Induction of luciferase synthesis in Beneckea harveyi by other marine bacteria. *Archives of Microbiology*. https://doi.org/10.1007/BF00409093

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*(3), 307–321. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010

Gupta, R. S. (2019). Distinction between Borrelia and Borreliella is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos' et al. "The genus Borrelia reloaded" (PLoS ONE 13(12): E0208432). *PLoS ONE*, *14*(8), 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221397

Guy, L., Kultima, J. R., Andersson, S. G. E., & Quackenbush, J. (2011). GenoPlotR: comparative gene and genome visualization in R. *Bioinformatics*, *27*(13), 2334–2335. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq413

Ha, J. H., Eo, Y., Ahn, H. C., & Ryu, K. S. (2017). Increasing the soluble expression and crystallization of the Escherichia coli quorum-sensing protein LsrK. *Acta Crystallographica Section:F Structural Biology Communications*, *73*(5), 253–258. https://doi.org/10.1107/S2053230X1700468X

Hallström, T., Siegel, C., Mörgelin, M., Kraiczy, P., Skerka, C., & Zipfel, P. F. (2013). CspA from Borrelia burgdorferi inhibits the terminal complement pathway. *MBio*, *4*(4), 1–10. https://doi.org/10.1128/mBio.00481-13

Hammerschmidt, C., Koenigs, A., Siegel, C., Hallström, T., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P. F., & Kraiczy, P. (2014). Versatile roles of CspA orthologs in complement inactivation of serum-resistant lyme disease spirochetes. *Infection and Immunity*, *82*(1), 380–392. https://doi.org/10.1128/IAI.01094-13

Hart, T., Thien, N., Nguyen, T., Nowak, N. A., Zhang, F., Linhardt, J., Diuk-wasser, M., Ram, S., Kraiczy, P., & Lin, Y. (2018). Polymorphic factor H-binding activity of CspA protects

Lyme borreliae from the host complement in feeding ticks to facilitate tick- to-host transmission. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 5).

Heberle, H., Meirelles, V. G., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, *16*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3

Herlemann, D. P. R., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME Journal*, *5*(10), 1571–1579. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41

Holden, K., Hodzic, E., Feng, S., Freet, K. J., Lefebvre, R. B., & Barthold, S. W. (2005). *Coinfection with Anaplasma phagocytophilum Alters Borrelia burgdorferi Population Distribution in C3H/HeN Mice*. *73*(6), 3440–3444. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3440

Hovius, J. W. R., Levi, M., & Fikrig, E. (2008). Salivating for knowledge: Potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Medicine*, *5*(2), 0202–0208. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050043

Hovius, J. W. R., Li, X., Ramamoorthi, N., Van Dam, A. P., Barthold, S. W., Van Der Poll, T., Speelman, P., & Fikrig, E. (2007). Coinfection with Borrelia burgdorferi sensu stricto and Borrelia garinii alters the course of murine Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *49*(2), 224–234. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00177.x

https://www.cdc.gov/. (n.d.). *https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/recent-surveillance-data.html*. https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/recent-surveillance-data.html

Hubálek, Z., Halouzka, J., & Heroldová, M. (1998). Growth temperature ranges of Borrelia burgdorferi sensu lato strains. *Journal of Medical Microbiology*, *47*(10), 929–932. https://doi.org/10.1099/00222615-47-10-929

Hübner, A., Revel, A. T., Nolen, D. M., Hagman, K. E., & Norgard, M. V. (2003). Expression of a luxS gene is not required for Borrelia burgdorferi infection of mice via needle inoculation. *Infection and Immunity*, *71*(5), 2892–2896. https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2892-2896.2003

Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, *96*(1), 23–28. https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P

Ismail, A. S., Valastyan, J. S., & Bassler, B. L. (2016). A Host-Produced Autoinducer-2 Mimic Activates Bacterial Quorum Sensing. *Cell Host and Microbe*, *19*(4), 470–480. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.020

Iyer, R., Caimano, M. J., Luthra, A., Axline, D., Corona, A., Iacobas, D. A., Radolf, J. D., & Schwartz, I. (2015). Stage-specific global alterations in the transcriptomes of Lyme disease spirochetes during tick feeding and following mammalian host adaptation. *Molecular Microbiology*, *95*(3), 509–538. https://doi.org/10.1111/mmi.12882

Jahfari, S., Hofhuis, A., Fonville, M., van der Giessen, J., van Pelt, W., & Sprong, H. (2016). Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Humans with Tick Bites and Erythema Migrans, in the Netherlands. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(10), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005042

Jiang, B. G., Zheng, Y. C., Tong, Y. G., Jia, N., Huo, Q. B., Fan, H., Ni, X. B., Ma, L., Yang, X. F., Jiang, J. F., & Cao, W. C. (2012). Genome sequence of Borrelia afzelii strain HLj01, isolated from a patient in china. *Journal of Bacteriology*, *194*(24), 7014–7015. https://doi.org/10.1128/JB.01863-12

Jiang, B., Yao, H., Tong, Y., Yang, X., Huang, Y., Jiang, J., & Cao, W. (2012). Genome

sequence of Borrelia garinii strain NMJW1, isolated from China. *Journal of Bacteriology*, *194*(23), 6660–6661. https://doi.org/10.1128/JB.01844-12

Johnson, R. C., Schmid, G. P., & Hyde, F. W. (1984). Borrelia burgdorferi sp. nov.: Etiologic agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *34*(4), 496–497. https://doi.org/10.1099/00207713-34-4-496

Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, *129*(SUPPL.). https://doi.org/10.1017/S0031182004005967

Jørgensen, M. G., Pettersen, J. S., & Kallipolitis, B. H. (2020). sRNA-mediated control in bacteria: An increasing diversity of regulatory mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1863*(5), 194504. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2020.194504

Jory Brinkerhoff, R., Clark, C., Ocasio, K., Gauthier, D. T., & Hynes, W. L. (2020). Factors affecting the microbiome of Ixodes scapularis and Amblyomma americanum. *PLoS ONE*, *15*(5), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232398

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, *14*(6), 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Kazimírová, M., & Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: Their role in modulation of host defences and pathogen transmission. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 4, Issue AUG). https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043

Kazimírová, M., Thangamani, S., Bartíková, P., Hermance, M., Holíková, V., Štibrániová, I., & Nuttall, P. A. (2017). Tick-borne viruses and biological processes at the tick-host-virus interface. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(JUL), 1–21. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00339

Kenedy, M. R., Lenhart, T. R., & Akins, D. (2012). The Role of Borrelia burgdorferi Outer Surface Proteins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1–19. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00980.x

Kindt, R., & Coe, R. (2005). *Tree diversity analysis*. *3*(January).

Kitsou, C., Fikrig, E., & Pal, U. (2021). Tick host immunity: vector immunomodulation and acquired tick resistance. *Trends in Immunology*, *42*(7), 554–574. https://doi.org/10.1016/j.it.2021.05.005

Klempner, M. S., Noring, R., Epstein, M. P., McCloud, B., & Rogers, R. A. (1996). Binding of human urokinase type plasminogen activator and plasminogen to Borrelia species. *Journal of Infectious Diseases*, *174*(1), 97–104. https://doi.org/10.1093/infdis/174.1.97

Kraiczy, P. (2016a). Hide and seek: How lyme disease spirochetes overcome complement attack. *Frontiers in Immunology*, *7*(SEP). https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00385

Kraiczy, P. (2016b). Travelling between two worlds: Complement as a Gatekeeper for an expanded host range of lyme disease spirochetes. *Veterinary Sciences*, *3*(2), 1–15. https://doi.org/10.3390/vetsci3020012

Kraiczy, P., & Stevenson, B. (2013). Complement regulator-acquiring surface proteins of Borrelia burgdorferi: Structure, function and regulation of gene expression. In *Ticks and Tick-borne Diseases* (Vol. 4, Issues 1–2). https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.039

Kröber, T., & Guerin, P. M. (2007). In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology*, *23*(9), 445–449. https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.010

Kudryashev, M., Cyrklaff, M., Baumeister, W., Simon, M. M., Wallich, R., & Frischknecht, F.

(2009). Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. *Molecular Microbiology*. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06613.x

Kurokawa, C., Lynn, G. E., Pedra, J. H. F., Pal, U., Narasimhan, S., & Fikrig, E. (2020). Interactions between Borrelia burgdorferi and ticks. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(10), 587–600. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0400-5

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S. M., Sewell, H. S., Brade, V., & Kraiczy, P. (2002). Host association of Borrelia burgdorferi sensu lato - The key role of host complement. *Trends in Microbiology*, *10*(2), 74–79. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02298-3

Kurtenbach, K., Sewell, H. S., Ogden, N. H., Randolph, S. E., & Nuttall, P. A. (1998). Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infection and Immunity*, *66*(3), 1248–1251. https://doi.org/10.1128/iai.66.3.1248-1251.1998

Landesman, W. J., Mulder, K., Allan, B. F., Bashor, L. A., Logiudice, K., Ostfeld, R. S., Circle, O. B., & Circle, O. B. (2020). *Potential effects of blood meal host on bacterial community composition in Ixodes scapularis nymphs*. *10*(3), 523–527. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.01.002.Potential

Lees, A. D. (1946). The water balance in ixodes ricinus L. and certain other species of ticks. *Parasitology*, *37*(1–2), 1–20. https://doi.org/10.1017/S0031182000013093

Lejal, E., Chiquet, J., Aubert, J., Robin, S., Estrada-Peña, A., Rue, O., Midoux, C., Mariadassou, M., Bailly, X., Cougoul, A., Gasqui, P., Cosson, J. F., Chalvet-Monfray, K., Vayssier-Taussat, M., & Pollet, T. (2021). Temporal patterns in Ixodes ricinus microbial communities: an insight into tick-borne microbe interactions. *Microbiome*, *9*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01051-8

Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), 256–259. https://doi.org/10.1093/nar/gkz239

Li, Q., Ren, Y., & Fu, X. (2019). Inter-kingdom signaling between gut microbiota and their host. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *0123456789*. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03076-7

Lin, Y. P., Benoit, V., Yang, X., Martínez-Herranz, R., Pal, U., & Leong, J. M. (2014). Strain-Specific Variation of the Decorin-Binding Adhesin DbpA Influences the Tissue Tropism of the Lyme Disease Spirochete. *PLoS Pathogens*, *10*(7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004238

Lin, Y. P., Diuk-Wasser, M. A., Stevenson, B., & Kraiczy, P. (2020). Complement Evasion Contributes to Lyme Borreliae–Host Associations. In *Trends in Parasitology* (Vol. 36, Issue 7). https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.011

Liu, L., Dai, J., Zhao, Y. O., Narasimhan, S., Yang, Y., Zhang, L., & Fikrig, E. (2012). Ixodes scapularis JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. *Journal of Infectious Diseases*, *206*(8), 1233–1241. https://doi.org/10.1093/infdis/jis484

Lloyd, D. (1976). *Circular Letter #12 -32*. 1–2. http://www.ct.gov/dph/lib/dph/infectious_diseases/lyme/1976_circular_letter.pdf

Lybecker, M. C., & Samuels, D. S. (2017). Small RNAs of Borrelia burgdorferi: Characterizing functional regulators in a sea of sRNAs. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *90*(2), 317–323.

Margos, G., Gatewood, A. G., Aanensen, D. M., Hanincova, K., Terekhova, D., Vollmer, S.

A., Cornet, M., Piesman, J., Donaghy, M., Bormane, A., Hurn, M. A., Feil, E. J., Fish, D., Casjens, S., Wormser, G. P., Schwartz, I., & Kurtenbach, K. (2008). MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of Borrelia burgdorferi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105

Margos, Gabriele, Fingerle, V., Oskam, C., Stevenson, B., & Gofton, A. (2020). Comment on: Gupta, 2019, distinction between Borrelia and Borreliella is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos' et al. "The genus Borrelia reloaded" (PLoS One. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *11*(2), 101320. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101320

Margos, Gabriele, Gofton, A., Wibberg, D., Dangel, A., Marosevic, D., Loh, S. M., Oskam, C., & Fingerle, V. (2018). The genus Borrelia reloaded. *PLoS ONE*, *13*(12), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208432

Margos, Gabriele, Vollmer, S. A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., & Kurtenbach, K. (2009). A new Borrelia species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(16), 5410–5416. https://doi.org/10.1128/AEM.00116-09

McCoy, K. D., & Boulanger, N. (2015). *Tiques et maladies à tiques Biologie, écologie évolutive, épidémiologie* (IRD Éditio).

McCoy, K. D., Léger, E., & Dietrich, M. (2013). Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*(OCT), 1–12. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00057

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, *8*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Meriläinen, L., Herranen, A., Schwarzbach, A., & Gilbert, L. (2015). Morphological and biochemical features of Borrelia burgdorferi pleomorphic forms. *Microbiology (United Kingdom)*. https://doi.org/10.1099/mic.0.000027

Middelveen, M. J., Filush, K. R., Bandoski, C., Kasliwala, R. S., Melillo, A., Stricker, R. B., & Sapi, E. (2019). Mixed borrelia burgdorferi and helicobacter pylori biofilms in morgellons disease dermatological specimens†. *Healthcare (Switzerland)*, *7*(2), 8–12. https://doi.org/10.3390/healthcare7020070

Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., & Bassler, B. L. (2002). Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in Vibrio cholerae. *Cell*, *110*(3), 303–314. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00829-2

Miller, S. T., Xavier, K. B., Campagna, S. R., Taga, M. E., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2004). Salmonella typhimurium recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Molecular Cell*, *15*(5), 677–687. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.020

Mirzaei, R., Mohammadzadeh, R., Alikhani, M. Y., Shokri Moghadam, M., Karampoor, S., Kazemi, S., Barfipoursalar, A., & Yousefimashouf, R. (2020). The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life*, *72*(7), 1271–1285. https://doi.org/10.1002/iub.2266

Mongodin, E. F., Casjens, S. R., Bruno, J. F., Xu, Y., Drabek, E. F., Riley, D. R., Cantarel, B. L., Pagan, P. E., Hernandez, Y. A., Vargas, L. C., Dunn, J. J., Schutzer, S. E., Fraser, C. M., Qiu, W. G., & Luft, B. J. (2013). Inter- and intra-specific pan-genomes of Borrelia

burgdorferi sensu lato: Genome stability and adaptive radiation. *BMC Genomics*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-693

Monnet, V., Juillard, V., & Gardan, R. (2014). Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(3), 339–351. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.948804

Moriarty, T. J., Norman, M. U., Colarusso, P., Bankhead, T., Kubes, P., & Chaconas, G. (2008). Real-time high resolution 3D imaging of the lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathogens*. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000090

Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S., & Charon, N. W. (2000). Borrelia burgdorferi periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(20), 10899–10904. https://doi.org/10.1073/pnas.200221797

Motaleb, M. D. A., Liu, J., & Mark Wooten, R. (2015). Spirochetal motility and chemotaxis in the natural enzootic cycle and development of Lyme disease. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 28). https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.09.006

Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F. H., Devillers, E., Cosson, J. F., Gasqui, P., Van, V. T., Mavingui, P., Vourc'h, G., & Vayssier-Taussat, M. (2016). Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539

Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(6), 371–382. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5

Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y. O., Heisig, J., Pan, J., Eppler-Epstein, R., Deponte, K., Fish, D., & Fikrig, E. (2014). Gut microbiota of the tick vector Ixodes scapularis modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host and Microbe*. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.001

Narasimhan, S., Schuijt, T. J., Abraham, N. M., Rajeevan, N., Coumou, J., Graham, M., Robson, A., Wu, M. J., Daffre, S., Hovius, J. W., & Fikrig, E. (2017). Modulation of the tick gut milieu by a secreted tick protein favors Borrelia burgdorferi colonization. *Nature Communications*, *8*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00208-0

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300

Nieto, N. C., Porter, T. W., Wachara, J. C., Lowrey, T. J., Martin, L., Motyka, P. J., & Salkeld, D. J. (2018). Using citizen science to describe the prevalence and distribution of tick bite and exposure to tick-borne diseases in the United States. *PLoS ONE*, *13*(7). https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal. pone.0199644

Norris, S. J. (2014). vls Antigenic Variation Systems of Lyme Disease Borrelia : Eluding Host Immunity through both Random, Segmental Gene Conversion and Framework Heterogeneity . *Microbiology Spectrum*, *2*(6). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0038-2014

Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, *48*(6), 1429–1449. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x

Obregón, D., Bard, E., Abrial, D., Estrada-Peña, A., & Cabezas-Cruz, A. (2019). Sex-Specific Linkages Between Taxonomic and Functional Profiles of Tick Gut Microbiomes.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, *9*(August), 1–16. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00298

Ojaimi, C., Brooks, C., Casjens, S., Rosa, P., Elias, A., Barbour, A., Jasinskas, A., Benach, J., Katona, L., Radolf, J., Caimano, M., Skare, J., Swingle, K., Akins, D., & Schwartz, I. (2003). Profiling of temperature-induced changes in Borrelia burgdorferi gene expression by using whole genome arrays. *Infection and Immunity*, *71*(4), 1689–1705. https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1689-1705.2003

Oksanen, A. J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P. R., Hara, R. B. O., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., & Szoecs, E. (2013). *Package ‘ vegan .’ December 2016*, 0–291.

Oliver, J. H., Owsley, M. R., Hutcheson, H. J., James, A. M., Chen, C., Irby, W. S., Dotson, E. M., & McLain, D. K. (1993). Conspecificity of the ticks Ixodes scapularis and I. dammini (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, *30*(1), 54–63. https://doi.org/10.1093/jmedent/30.1.54

Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 385. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385

Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R. R., Ramamoorthi, N., DeSilva, A. M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, F. S., Telford, S., Anderson, J. F., & Fikrig, E. (2004). TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for Borrelia burgdorferi. *Cell*, *119*(4), 457–468. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.027

Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 576–588. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89

Parveen, N., & Bhanot, P. (2019). Babesia microti—Borrelia burgdorferi coinfection. *Pathogens*, *8*(3). https://doi.org/10.3390/pathogens8030117

Pereira, C. S., Thompson, J. A., & Xavier, K. B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews*. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x

Pérez-Eid, C. (2007). *Les tiques: Ientification, Biologie, Importance Médicale et Vétérinaire* (Lavoisier). Lavoisier-Tec & Doc.

Perrin, Y., Bouchon, D., Delafont, V., Moulin, L., & Héchard, Y. (2019). Microbiome of drinking water: A full-scale spatio-temporal study to monitor water quality in the Paris distribution system. *Water Research*, *149*, 375–385. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.013

Popitsch, N., Bilusic, I., Rescheneder, P., Schroeder, R., & Lybecker, M. (2017). Temperature-dependent sRNA transcriptome of the Lyme disease spirochete. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3398-3

Qin, Q. L., Xie, B. Bin, Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C., Zhou, J., Oren, A., & Zhang, Y. Z. (2014). A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. *Journal of Bacteriology*, *196*(12), 2210–2215. https://doi.org/10.1128/JB.01688-14

Raileanu, C., Moutailler, S., Pavel, I., Porea, D., Mihalca, A. D., Savuta, G., & Vayssier-Taussat, M. (2017). Borrelia Diversity and Co-infection with Other Tick Borne Pathogens in Ticks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00036

Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M. V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., & Fikrig, E. (2005). The

Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, *436*(7050), 573–577. https://doi.org/10.1038/nature03812

Randolph, S. E., Gern, L., & Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, *12*(12), 472–479. https://doi.org/10.1016/S0169-4758(96)10072-7

Rauter, C., & Hartung, T. (2005). Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: A metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology*. https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7203-7216.2005

Rezzonico, F., Smits, T. H. M., & Duffy, B. (2012). Detection of AI-2 receptors in genomes of Enterobacteriaceae suggests a role of type-2 quorum sensing in closed ecosystems. *Sensors (Switzerland)*, *12*(5), 6645–6665. https://doi.org/10.3390/s120506645

Ribeiro, J. M. C., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., & Spielman, A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of tick, ixodes dammini. *Journal of Experimental Medicine*, *161*(2), 332–344. https://doi.org/10.1084/jem.161.2.332

Riley, S. P., Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., & Stevenson, B. (2007). Genetic and physiological characterization of the Borrelia burgdorferi ORF BB0374-pfs-metK-luxS Operon. *Microbiology*. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004424-0

Roe, R. M., & Sonenshine, D. E. (2014). *Biology of Ticks, Volume 1* (D. E. Sonenshine & R. M. Roe (eds.)). Oxford University Press.

Rogers, E. A., & Marconi, R. T. (2007). Delineation of species-specific binding properties of the CspZ protein (BBH06) of lyme disease spirochetes: Evidence for new contributions to the pathogenesis of Borrelia spp. *Infection and Immunity*, *75*(11), 5272–5281. https://doi.org/10.1128/IAI.00850-07

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *2016*(10), 1–22. https://doi.org/10.7717/peerj.2584

Ross, B. D., Hayes, B., Radey, M. C., Lee, X., Josek, T., Bjork, J., Neitzel, D., Paskewitz, S., Chou, S., & Mougous, J. D. (2018). Ixodes scapularis does not harbor a stable midgut microbiome. *ISME Journal*, *12*(11), 2596–2607. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0161-6

Roy, V., Fernandes, R., Tsao, C., & Bentley, W. E. (2010). Cross Species Quorum Quenching Using a Native AI-2 Processing Enzyme. *ACS Chem. Biol.*, *5*(2), 223–232.

Ružić-Sabljić, E., Strle, F., Cimperman, J., Maraspin, V., Lotrič-Furlan, S., & Pleterski-Rigler, D. (2000). Characterisation of Borrelia burgdorferi sensu lato strains isolated from patients with skin manifestations of Lyme borreliosis residing in Slovenia. *Journal of Medical Microbiology*, *49*(1), 47–53. https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-1-47

Ružić-Sabljić, Eva, & Strle, F. (2004). Comparison of growth of Borrelia afzelii, B. gavinii, and B. burgdorferi sensu stricto in MKP and BSK-II medium. *International Journal of Medical Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.08.002

Salo, J., Loimaranta, V., Lahdenne, P., Viljanen, M. K., & Hytönen, J. (2011). Decorin binding by DbpA and B of Borrelia garinii, Borrelia afzelii, and Borrelia burgdorferi sensu stricto. *Journal of Infectious Diseases*, *204*(1), 65–73. https://doi.org/10.1093/infdis/jir207

Sapi, E., Balasubramanian, K., Poruri, A., Maghsoudlou, J. S., Socarras, K. M., Timmaraju, A. V., Filush, K. R., Gupta, K., Shaikh, S., Theophilus, P. A. S., Luecke, D. F., MacDonald, A., & Zelger, B. (2016). Evidence of in vivo existence of Borrelia biofilm in

borrelial lymphocytomas . *European Journal of Microbiology and Immunology*, *6*(1), 9–24. https://doi.org/10.1556/1886.2015.00049

Sapi, E., Gupta, K., Wawrzeniak, K., Gaur, G., Torres, J., Filush, K., Melillo, A., & Zelger, B. (2019). Borrelia and Chlamydia can form mixed biofilms in infected human skin tissues . *European Journal of Microbiology and Immunology*, *9*(2), 46–55. https://doi.org/10.1556/1886.2019.00003

Sapi, Eva, Bastian, S. L., Mpoy, C. M., Scott, S., Rattelle, A., Pabbati, N., Poruri, A., Burugu, D., Theophilus, P. A. S., Pham, T. V., Datar, A., Dhaliwal, N. K., MacDonald, A., Rossi, M. J., Sinha, S. K., & Luecke, D. F. (2012). Characterization of Biofilm Formation by Borrelia burgdorferi In Vitro. *PLoS ONE*, *7*(10), 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048277

Sapi, Eva, Theophilus, P. A. S., Pham, T. V., Burugu, D., & Luecke, D. F. (2016). Effect of RpoN, RpoS and LuxS pathways on the biofilm formation and antibiotIc sensitivity of *Borrelia burgdorferi*. *European Journal of Microbiology and Immunology*. https://doi.org/10.1556/1886.2016.00026

Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E. A. P., Sacchi, L., Fabbi, M., & Lo, N. (2006). Candidatus Midichloria mitochondrii', an endosymbiont of the Ixodes ricinus with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(11), 2535–2540. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64386-0

Schüler, W., Bunikis, I., Weber-Lehman, J., Comstedt, P., Kutschan-Bunikis, S., Stanek, G., Huber, J., Meinke, A., Bergstroäm, S., & Lundberg, U. (2015). Complete genome sequence of Borrelia afzelii K78 and comparative genome analysis. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–27. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120548

Shaikh, S., Timmaraju, V. A., Torres, J. P., Socarras, K. M., Theophilus, P. A. S., & Sapi, E. (2016). Influence of tick and mammalian physiological temperatures on Borrelia burgdorferi biofilms. *Microbiology (United Kingdom)*. https://doi.org/10.1099/mic.0.000380

Shelburne, S. A., Olsen, R. J., Makthal, N., Brown, N. G., Sahasrabhojane, P., Watkins, E. M., Palzkill, T., Musser, J. M., & Kumaraswami, M. (2011). An amino-terminal signal peptide of Vfr protein negatively influences RopB-dependent SpeB expression and attenuates virulence in Streptococcus pyogenes. *Molecular Microbiology*, *82*(6), 1481–1495. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07902.x

Shi, J., Hu, Z., Deng, F., & Shen, S. (2018). Tick-Borne Viruses. *Virologica Sinica*, *33*(1), 21–43. https://doi.org/10.1007/s12250-018-0019-0

Shi, Y., Xu, Q., McShan, K., & Fang, T. L. (2008). Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of Borrelia burgdorferi. *Infection and Immunity*, *76*(3), 1239–1246. https://doi.org/10.1128/IAI.00897-07

Sicklinger, M., Wienecke, R., & Neubert, U. (2003). In vitro susceptibility testing of four antibiotics against Borrelia burgdorferi: A comparison of results for the three genospecies Borrelia afzelii, Borrelia garinii, and Borrelia burgdorferi sensu stricto. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(4), 1791–1793. https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1791-1793.2003

Silpe, J. E., & Bassler, B. L. (2019). A Host-Produced Quorum-Sensing Autoinducer Controls a Phage Lysis-Lysogeny Decision. *Cell*, *176*(1–2), 268-280.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.059

Smith, D., Wang, J. H., Swatton, J. E., Davenport, P., Price, B., Mikkelsen, H., Stickland, H., Nishikawa, K., Gardiol, N., Spring, D. R., & Welch, M. (2006). Variations on a theme:

Diverse N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing mechanisms in Gram-negative bacteria. *Science Progress*, *89 PART 3*(4/-), 167–211. https://doi.org/10.3184/003685006783238335

Smith, T. A., Driscoll, T., Gillespie, J. J., & Raghavan, R. (2015). A Coxiella-like endosymbiontis a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biology and Evolution*, *7*(3), 831–838. https://doi.org/10.1093/gbe/evv016

Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, *18*(1), 96–104. https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008

South, A. (2017). *rnaturalearth: World Map Data from Natural Earth*. https://cran.r-project.org/web/packages/rnaturalearth/

Stanek, G., & Reiter, M. (2011). The expanding Lyme Borrelia complex-clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(4), 487–493. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x

Stanek, Gerold, & Strle, F. (2017). Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(3), 233–258. https://doi.org/10.1093/femsre/fux047

Stanek, Gerold, Wewalka, G., Groh, V., Neumann, R., & Kristoferitsch, W. (1985). DIFFERENCES BETWEEN LYME DISEASE AND EUROPEAN ARTHROPOD-BORNE BORRELIA INFECTIONS. *Lancet*, 1985. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)91424-2

Stanek, Gerold, Wormser, G. P., Gray, J., & Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. In *The Lancet* (Vol. 379, Issue 9814). https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60103-7

Stavru, F., Riemer, J., Jex, A., & Sassera, D. (2020). When bacteria meet mitochondria: The strange case of the tick symbiont Midichloria mitochondrii†. *Cellular Microbiology*, *22*(4), 1–9. https://doi.org/10.1111/cmi.13189

Steere, A. C., Malawista, S. E., Snydman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R., & Steele, F. M. (1977). An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis & Rheumatism*, *20*(1), 7–17. https://doi.org/10.1002/art.1780200102

Steere, A. C., & Sikand, V. K. (2003). The Presenting Manifestations of Lyme Disease. *New England Journal of Medicine*, *348*(24), 2472–2474.

Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W. R., Li, X., & Mead, P. S. (2016). Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.90

Stevenson, B., & Babb, K. (2002). LuxS-mediated quorum sensing in Borrelia burgdorferi, the Lyme disease spirochete. *Infection and Immunity*. https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4099-4105.2002

Stevenson, B., Fingerle, V., Wormser, G. P., & Margos, G. (2018). Public health and patient safety concerns merit retention of Lyme borreliosis-associated spirochetes within the genus Borrelia, and rejection of the genus novum Borreliella. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.010

Stewart, P. E., Thalken, R., Bono, J. L., & Rosa, P. (2001). Isolation of a circular plasmid region sufficient for autonomous replication and transformation of infectious Borrelia burgdorferi. *Molecular Microbiology*, *39*(3), 714–721. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02256.x

Strle, F., Ružić-Sabljić, E., Cimperman, J., Lotrič-Furlan, S., & Maraspin, V. (2006).

Comparison of findings for patients with Borrelia garinii and Borrelia afzelii isolated from cerebrospinal fluid. *Clinical Infectious Diseases*, *43*(6), 704–710. https://doi.org/10.1086/506936

Strnad, M., Hönig, V., Růžek, D., Grubhoffer, L., & Rego, R. O. M. (2017). Europe-wide meta-analysis of Borrelia burgdorferi sensu lato prevalence in questing Ixodes ricinus ticks. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(15). https://doi.org/10.1128/AEM.00609-17

Sultan, S. Z., Manne, A., Stewart, P. E., Bestor, A., Rosa, P. A., Charon, N. W., & Motaleba, M. A. (2013). Motility is crucial for the infectious life cycle of borrelia burgdorferi. *Infection and Immunity*, *81*(6), 2012–2021. https://doi.org/10.1128/IAI.01228-12

Sultan, S. Z., Pitzer, J. E., Boquoi, T., Hobbs, G., Miller, M. R., & Motaleb, M. A. (2011). Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric gmp phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of Borrelia burgdorferi. *Infection and Immunity*. https://doi.org/10.1128/IAI.05153-11

Swanson, S. J., Neitzel, D., Reed, K. D., & Belongia, E. A. (2006). Coinfections acquired from Ixodes ticks. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(4), 708–727. https://doi.org/10.1128/CMR.00011-06

Sykes, R. A., & Makiello, P. (2016). An estimate of Lyme borreliosis incidence inWestern Europe. *Journal of Public Health (United Kingdom)*, *39*(1), 74–81. https://doi.org/10.1093/pubmed/fdw017

Takacs, C. N., Kloos, Z. A., Scott, M., Rosa, P. A., & Jacobs-Wagner, C. (2018). *Fluorescent Proteins, Promoters, and Selectable Markers for Applications in the Lyme Disease Spirochete Borrelia burgdorferi*. *84*(24), 1–21. https://doi.org/10.1128/AEM.01824-18

Takacs, C. N., Scott, M., Chang, Y., Kloos, Z. A., Irnov, I., Rosa, P. A., Liu, J., & Jacobs-Wagner, C. (2021). A CRISPR Interference Platform for Selective Downregulation of Gene Expression in Borrelia burgdorferi. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*(4), 1–25. https://doi.org/10.1128/AEM.02519-20

Thapa, S., Zhang, Y., & Allen, M. S. (2019). Effects of temperature on bacterial microbiome composition in Ixodes scapularis ticks. *MicrobiologyOpen*, *8*(5), 1–13. https://doi.org/10.1002/mbo3.719

Timmaraju, A., Theophilus, P. A. S., Balasubramanian, K., Shakih, S., Leucke, D. F., & Sapi, E. (2015). Biofilm formation by Borrelia sensu lato. *FEMS Microbiology Letters*, *October*, 1–6. https://doi.org/10.4161/gmic.25862

Timmaraju, V. A., Theophilus, P. A. S., Balasubramanian, K., Shakih, S., Luecke, D. F., & Sapi, E. (2015). Biofilm formation by Borrelia burgdorferi sensu lato. *FEMS Microbiology Letters*. https://doi.org/10.1093/femsle/fnv120

Tokarz, R., Tagliafierro, T., Sameroff, S., Cucura, D. M., Oleynik, A., Che, X., Jain, K., & Lipkin, W. I. (2019). Microbiome analysis of Ixodes scapularis ticks from New York and Connecticut. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *10*(4), 894–900. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.011

Toledo, A., Crowley, J. T., Coleman, J. L., LaRocca, T. J., Chiantia, S., London, E., & Benach, J. L. (2014). Selective association of outer surface lipoproteins with the lipid rafts of Borrelia burgdorferi. *MBio*, *5*(2), 1–9. https://doi.org/10.1128/mBio.00899-14

Tonetti, N. (2012). *Dynamique de transmission de Borrelia afzelii par Ixodes ricinus : comparaisons entre groupes ospC*. Université de Neuchâtel.

Tufts, D. M., Hart, T. M., Chen, G. F., Kolokotronis, S. O., Diuk-Wasser, M. A., & Lin, Y. P.

(2019). Outer surface protein polymorphisms linked to host-spirochete association in Lyme borreliae. *Molecular Microbiology*, *111*(4), 868–882. https://doi.org/10.1111/mmi.14209

Van Duijvendijk, G., Coipan, C., Wagemakers, A., Fonville, M., Ersöz, J., Oei, A., Földvári, G., Hovius, J., Takken, W., & Sprong, H. (2016). Larvae of Ixodes ricinus transmit Borrelia afzelii and B. miyamotoi to vertebrate hosts. *Parasites and Vectors*, *9*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1389-5

van Treuren, W., Ponnusamy, L., Brinkerhoff, R. J., Gonzalez, A., Parobek, C. M., Juliano, J. J., Andreadis, T. G., Falco, R. C., Ziegler, L. B., Hathaway, N., Keeler, C., Emch, M., Bailey, J. A., Roe, R. M., Apperson, C. S., Knight, R., & Meshnick, S. R. (2015). Variation in the microbiota of Ixodes ticks with regard to geography, species, and sex. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(18), 6200–6209. https://doi.org/10.1128/AEM.01562-15

Varela-Stokes, A. S., Park, S. H., Kim, S. A., & Ricke, S. C. (2017). Microbial communities in North American Ixodid ticks of veterinary and medical importance. *Frontiers in Veterinary Science*, *4*(OCT), 1–7. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00179

Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.-F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.-A., Roumagnac, P., & Candresse, T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00029

Veinović, G., Ružić-Sabljí, E., Strle, F., & Cerar, T. C. (2016). Comparison of growth of borrelia afzelii, borrelia garinii, and borrelia burgdorferi sensu stricto at five different temperatures. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157706

Venables, W., & Ripley, B. (2002). *Modern Applied Statistics with S., 4th ed.* (Springer:).

Vidal, J. E., Ludewick, H. P., Kunkel, R. M., Zähner, D., & Klugman, K. P. (2011). The luxs-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by streptococcus pneumoniae strain D39. *Infection and Immunity*, *79*(10), 4050–4060. https://doi.org/10.1128/IAI.05186-11

von Lackum, K., Babb, K., Riley, S. P., Wattier, R. L., Bykowski, T., & Stevenson, B. (2006). Functionality of Borrelia burgdorferi LuxS: The Lyme disease spirochete produces and responds to the pheromone autoinducer-2 and lacks a complete activated-methyl cycle. *International Journal of Medical Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.12.011

von Lackum, K., Ollison, K. M., Bykowski, T., Nowalk, A. J., Hughes, J. L., Carroll, J. A., Zückert, W. R., & Stevenson, B. (2007). Regulated synthesis of the Borrelia burgdorferi inner-membrane lipoprotein lpLA7 (P22, P22-A) during the Lyme disease spirochaete's mammal-tick infectious cycle. *Microbiology*. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003350-0

Voordouw, M. J. (2014). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*, *142*(2), 290–302. https://doi.org/10.1017/S0031182014001486

Wallich, R., Pattathu, J., Kitiratschky, V., Brenner, C., Zipfel, P. F., Brade, V., Simon, M. M., & Kraiczy, P. (2005). Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the lyme disease spirochetes Borrelia afzelii and Borrelia garinii. *Infection and Immunity*, *73*(4), 2351–2359. https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2351-2359.2005

Wiater, L. A., Sadosky, A. B., & Shuman, H. A. (1994). Mutagenesis of Legionella pneumophila using Jn903 dlIlacZ: identification of a growth-phase-regulated

pigmentation gene. *Molecular Microbiology*, *11*(4), 641–653. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00343.x

Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer:).

Wickham, Hadley, Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., … Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, *4*(43), 1686. https://doi.org/10.21105/joss.01686

Wolcott, K. A., Margos, G., Fingerle, V., & Becker, N. S. (2021). Host association of Borrelia burgdorferi sensu lato: A review. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(5). https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101766

Wu, Q., Guan, G., Liu, Z., Li, Y., Luo, J., & Yin, H. (2015). RNA-Seq-based analysis of changes in Borrelia burgdorferi gene expression linked to pathogenicity. *Parasites and Vectors*. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0623-2

Xu, H., Raddi, G., Liu, J., Charon, N. W., & Li, C. (2011). Chemoreceptors and flagellar motors are subterminally located in close proximity at the two cell poles in spirochetes. *Journal of Bacteriology*, *193*(10), 2652–2656. https://doi.org/10.1128/JB.01530-10

Yang, X., Koči, J., Smith, A. A., Zhuang, X., Sharma, K., Dutta, S., Rana, V. S., Kitsou, C., Yas, O. B., Mongodin, E. F., & Pal, U. (2021). A novel tick protein supports integrity of gut peritrophic matrix impacting existence of gut microbiome and Lyme disease pathogens. *Cellular Microbiology*, *23*(2). https://doi.org/10.1111/cmi.13275

Zhang, J. R., Hardham, J. M., Barbour, A. G., & Norris, S. J. (1997). Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell*, *89*(2). https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80206-8

Zhang, Y. K., & Liu, J. Z. (2019). Maternally inherited symbiotic bacteria in ticks: Incidence and biological importance. *Systematic and Applied Acarology*, *24*(1), 16–32. https://doi.org/10.11158/saa.24.1.12

Zhao, J., Quan, C., Jin, L., & Chen, M. (2018). Production, detection and application perspectives of quorum sensing autoinducer-2 in bacteria. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 268, pp. 53–60). https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.009

Zhao, T., Gong, H., Shen, X., Zhang, W., Shan, T., Yu, X., Wang, S. J., & Cui, L. (2020). Comparison of Viromes in Ticks from Different Domestic Animals in China. *Virologica Sinica*, *35*(4), 398–406. https://doi.org/10.1007/s12250-020-00197-3

Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L., & Mekalanos, J. J. (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in Vibrio cholerae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(5), 3129–3134. https://doi.org/10.1073/pnas.052694299

Annexes

Annexe 1 : Gènes de *B. afzelii* différentiellement exprimés en réponse au changement de température

Locus	Localisation génomique	Protéine codée	Log2(FC)
BLA32_RS03100	chromosome	aquaporin family protein	-2,51410332
BLA32_RS05400	plasmide	virulence associated lipoprotein	-2,27810474
BLA32_RS03095	chromosome	glycerol kinase GlpK	-2,14486622
BLA32_RS03480	chromosome	4-alpha-glucanotransferase	-2,02715765
BLA32_RS03085	chromosome	glycerol-3-phosphate dehydrogenase/oxidase	-1,96863761
BLA32_RS04520	plasmide lp54-lp38 fusion	MULTISPECIES: BlyA family holin	-1,54584533
BLA32_RS01560	chromosome	hypothetical protein	-1,35227061
BLA32_RS05140	plasmide cp26	PTS lactose/cellobiose transporter subunit IIA	-1,27348355
BLA32_RS03505	chromosome	alanine racemase	-1,26869407
BLA32_RS01725	chromosome	GerMN domain-containing protein	-1,21883377
BLA32_RS05120	plasmide cp26	acylphosphatase	-1,20525702
BLA32_RS02550	chromosome	hypothetical protein	-1,19267166
BLA32_RS00130	chromosome	YicC family protein	-1,18652
BLA32_RS00225	chromosome	ribosome maturation factor RimP	-1,1706048
BLA32_RS05150	plasmide cp26	alpha3-beta1 integrin-binding protein	-1,13575185
BLA32_RS04595	plasmide lp54-lp38 fusion	PBSX family phage terminase large subunit	-1,10452675
BLA32_RS02130	chromosome	MULTISPECIES: DUF1893 domain-containing protein	-1,10384893
BLA32_RS02250	chromosome	hypothetical protein	-1,08407843
BLA32_RS02790	chromosome	FtsQ-type POTRA domain-containing protein	-1,07226211
BLA32_RS06215	plasmide	hypothetical protein	-1,06956376
BLA32_RS04650	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF3890 domain-containing protein	-1,05610596
BLA32_RS04635	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF1357 family protein	-1,04156153
BLA32_RS04590	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	-1,02804893
BLA32_RS05145	plasmide cp26	PTS sugar transporter subunit IIB	-1,02605976
BLA32_RS02030	chromosome	RNA polymerase factor sigma-54	-1,00587419
BLA32_RS05155	plasmide cp26	hypothetical protein	-0,99799266
BLA32_RS00455	chromosome	ribonuclease Z	-0,99374795
BLA32_RS00015	chromosome	arginine deiminase	-0,97887034
BLA32_RS04500	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF2634 domain-containing protein	-0,97628546
BLA32_RS04750	plasmide lp54-lp38 fusion	complement regulator-acquiring protein	-0,9709491
BLA32_RS03640	chromosome	hypothetical protein	-0,96186054
BLA32_RS04630	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF1073 domain-containing protein	-0,95902649
BLA32_RS04735	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	-0,93686849
BLA32_RS02535	chromosome	transcriptional regulator	-0,92389877
BLA32_RS02665	chromosome	peptide ABC transporter substrate-binding protein	-0,9238661
BLA32_RS00460	chromosome	ABC transporter ATP-binding protein	-0,91501684
BLA32_RS02530	chromosome	hypothetical protein	-0,89961541

BLA32_RS00125	chromosome	AAA family ATPase	-0,89752228
BLA32_RS00930	chromosome	hypothetical protein	-0,89691089
BLA32_RS00920	chromosome	DUF192 domain-containing protein	-0,89531733
BLA32_RS00535	chromosome	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridine)(34)-methyltransferase MnmD	-0,89477354
BLA32_RS03150	chromosome	polymer-forming cytoskeletal protein	-0,89474658
BLA32_RS00925	chromosome	hypothetical protein	-0,89160385
BLA32_RS04140	chromosome	hypothetical protein	-0,87983135
BLA32_RS01230	chromosome	ATP-dependent helicase	-0,87138782
BLA32_RS04645	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	-0,86824659
BLA32_RS03110	chromosome	deoxynucleoside kinase	-0,84059496
BLA32_RS03450	chromosome	VWA domain-containing protein	-0,83595746
BLA32_RS00475	chromosome	DUF4340 domain-containing protein	-0,83487311
BLA32_RS03975	chromosome	16S rRNA (uracil(1498)-N(3))-methyltransferase	-0,82663974
BLA32_RS04190	chromosome	RluA family pseudouridine synthase	-0,82558181
BLA32_RS04365	plasmide lp54-lp38 fusion	chromosome replication/partitioning protein	-0,81752725
BLA32_RS00740	chromosome	50S ribosomal protein L19	-0,81250416
BLA32_RS04660	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	-0,81191968
BLA32_RS01585	chromosome	tetratricopeptide repeat protein	-0,80783545
BLA32_RS02290	chromosome	cation:dicarboxylase symporter family transporter	-0,80770145
BLA32_RS04525	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	-0,80616652
BLA32_RS00620	chromosome	hypothetical protein	-0,7870018
BLA32_RS02685	chromosome	outer membrane protein assembly factor BamD	-0,78451992
BLA32_RS00470	chromosome	GIdg family protein	-0,77270247
BLA32_RS04025	chromosome	RNA methyltransferase	-0,76762655
BLA32_RS01580	chromosome	polymer-forming cytoskeletal protein	-0,76348031
BLA32_RS03005	chromosome	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	-0,76303701
BLA32_RS03580	chromosome	membrane protein insertion efficiency factor YidD	-0,75865443
BLA32_RS03800	chromosome	endonuclease MutS2	-0,75565267
BLA32_RS04515	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF685 domain-containing protein	-0,75222226
BLA32_RS01535	chromosome	dephospho-CoA kinase	-0,74937935
BLA32_RS03985	chromosome	rRNA maturation RNase YbeY	-0,74893648
BLA32_RS04640	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF228 domain-containing protein	-0,74677184
BLA32_RS04510	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF735 family protein	-0,74613394
BLA32_RS01945	chromosome	MULTISPECIES: nucleoid-associated protein EbfC	-0,74490612
BLA32_RS03390	chromosome	MULTISPECIES: carbon storage regulator CsrA	-0,73714068
BLA32_RS00110	chromosome	hypothetical protein	-0,73448821
BLA32_RS02135	chromosome	hypothetical protein	-0,73444064
BLA32_RS00140	chromosome	hypothetical protein	-0,73276129
BLA32_RS04675	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF1463 family protein	-0,73051596
BLA32_RS00135	chromosome	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	-0,72026071
BLA32_RS03455	chromosome	tetratricopeptide repeat protein	-0,71980628
BLA32_RS00555	chromosome	septal ring lytic transglycosylase RlpA family protein	-0,71765876
BLA32_RS01990	chromosome	fibronectin type III domain-containing protein	-0,71540045
BLA32_RS00240	chromosome	OmpH family outer membrane protein	-0,71397613
BLA32_RS04655	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF1506 family protein	-0,71070267
BLA32_RS05520	plasmide	MULTISPECIES: hypothetical protein	-0,70158967

BLA32_RS02865	chromosome	flagellar protein	-0,70137481
BLA32_RS04160	chromosome	PQQ-dependent sugar dehydrogenase	-0,70056982
BLA32_RS01985	chromosome	hypothetical protein	-0,69801149
BLA32_RS00495	chromosome	ABC transporter permease subunit	-0,69451464
BLA32_RS03610	chromosome	transpeptidase family protein	-0,69131226
BLA32_RS03375	chromosome	hypothetical protein	-0,68779824
BLA32_RS01240	chromosome	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	-0,67149076
BLA32_RS02815	chromosome	ATP-dependent protease subunit HslV	-0,66740966
BLA32_RS03440	chromosome	hypothetical protein	-0,66650848
BLA32_RS00205	chromosome	tRNA pseudouridine(55) synthase TruB	-0,66597873
BLA32_RS00090	chromosome	ATP-dependent RNA helicase	-0,65795696
BLA32_RS04670	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF787 family protein	-0,65723854
BLA32_RS03910	chromosome	hypothetical protein	-0,65065187
BLA32_RS02000	chromosome	hypothetical protein	-0,64761904
BLA32_RS04505	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF276 domain-containing protein	-0,64709903
BLA32_RS04665	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF764 family protein	-0,6419801
BLA32_RS00965	chromosome	hypothetical protein	-0,63851852
BLA32_RS02005	chromosome	DNA polymerase III subunit delta	-0,63371333
BLA32_RS02380	chromosome	nucleoside ABC transporter substrate-binding protein BmpD	-0,62703262
BLA32_RS04145	chromosome	hypothetical protein	-0,62584441
BLA32_RS03645	chromosome	rRNA pseudouridine synthase	-0,62412115
BLA32_RS04030	chromosome	queuosine precursor transporter	-0,62101256
BLA32_RS01385	chromosome	DUF1761 family protein	-0,62032269
BLA32_RS04570	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF261 domain-containing protein	-0,61656255
BLA32_RS03845	chromosome	hypothetical protein	-0,61382683
BLA32_RS04680	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF1473 family protein	-0,6090825
BLA32_RS02630	chromosome	hypothetical protein	-0,60899072
BLA32_RS03445	chromosome	VWA domain-containing protein	-0,60862448
BLA32_RS01630	chromosome	TIGR02757 family protein	-0,604826
BLA32_RS04695	plasmide lp54-lp38 fusion	DUF792 family protein	-0,60473915
BLA32_RS03545	chromosome	glucosamine-6-phosphate deaminase	-0,60161268
BLA32_RS01730	chromosome	TlyA family RNA methyltransferase	-0,60105607
BLA32_RS04685	plasmide lp54-lp38 fusion	MULTISPECIES: DUF1322 family protein	-0,59248638
BLA32_RS05470	plasmide	MULTISPECIES: hypothetical protein	-0,59236727
BLA32_RS03380	chromosome	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex ATPase subunit type 1 TsaE	-0,59096123
BLA32_RS02545	chromosome	hypothetical protein	0,582989226
BLA32_RS03265	chromosome	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0,584258723
BLA32_RS01375	chromosome	chemotaxis protein	0,585033094
BLA32_RS05060	plasmide cp26	peptide ABC transporter substrate-binding protein	0,593734825
BLA32_RS03220	chromosome	extracellular solute-binding protein	0,594585615
BLA32_RS02575	chromosome	NFACT family protein	0,604760943
BLA32_RS01130	chromosome	transcription-repair coupling factor	0,616066396
BLA32_RS05735	plasmide	DUF787 family protein	0,628150207
BLA32_RS05795	plasmide	MULTISPECIES: BlyA family holin	0,636533191
BLA32_RS06295	plasmide	MULTISPECIES: BlyA family holin	0,638514008

BLA32_RS05790	plasmide	DUF685 domain-containing protein	0,650755572
BLA32_RS04725	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	0,651378039
BLA32_RS05840	plasmide	DUF787 family protein	0,652892709
BLA32_RS06205	plasmide	ParA family protein	0,655852071
BLA32_RS04900	plasmide	hypothetical protein	0,660974324
BLA32_RS06090	plasmide	DUF603 domain-containing protein, partial	0,665077101
BLA32_RS03215	chromosome	phosphate ABC transporter permease subunit PstC	0,681641338
BLA32_RS01160	chromosome	cytidine deaminase	0,682432521
BLA32_RS01430	chromosome	chemotaxis protein CheB	0,686386612
BLA32_RS06650	plasmide	hypothetical protein	0,687077173
BLA32_RS02490	chromosome	hypothetical protein	0,689840424
BLA32_RS05825	plasmide	MULTISPECIES: DUF1506 family protein	0,696190521
BLA32_RS02120	chromosome	ParA family protein	0,696456854
BLA32_RS03225	chromosome	elongation factor P	0,700652181
BLA32_RS05430	plasmide	MULTISPECIES: chromosome replication/partitioning protein	0,701772756
BLA32_RS05535	plasmide	MULTISPECIES: DUF5425 family lipoprotein	0,715178214
BLA32_RS03355	chromosome	hypothetical protein	0,718530696
BLA32_RS05010	plasmide lp28-3	helix-turn-helix domain-containing protein	0,735029775
BLA32_RS02255	chromosome	fructose-specific PTS transporter subunit EIIC	0,740169514
BLA32_RS02230	chromosome	protein-glutamate O-methyltransferase	0,746707379
BLA32_RS05800	plasmide	biotin--acetyl-CoA-carboxylase ligase	0,75684275
BLA32_RS05445	plasmide	hypothetical protein	0,761279471
BLA32_RS06085	plasmide	DUF603 domain-containing protein	0,771519583
BLA32_RS05885	plasmide	DUF276 domain-containing protein	0,778074303
BLA32_RS04980	plasmide lp28-3	chromosome replication/partitioning protein	0,789456618
BLA32_RS05190	plasmide	chromosome replication/partitioning protein	0,79222769
BLA32_RS01330	chromosome	methionine--tRNA ligase	0,793588519
BLA32_RS00030	chromosome	hypothetical protein	0,79571074
BLA32_RS06280	plasmide	DUF643 domain-containing protein	0,802262339
BLA32_RS06210	plasmide	chromosome replication/partitioning protein	0,802486816
BLA32_RS02295	chromosome	hypothetical protein	0,816899227
BLA32_RS04600	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	0,821168339
BLA32_RS04460	plasmide lp54-lp38 fusion	P52 family lipoprotein	0,847319486
BLA32_RS02690	chromosome	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	0,871228865
BLA32_RS04445	plasmide lp54-lp38 fusion	P52 family lipoprotein	0,873306006
BLA32_RS00395	chromosome	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase	0,874898431
BLA32_RS05350	plasmide	class I SAM-dependent DNA methyltransferase	0,889372662
BLA32_RS05860	plasmide	DUF759 family protein	0,897438519
BLA32_RS00025	chromosome	ribonuclease H family protein	0,897889611
BLA32_RS05785	plasmide	DUF735 family protein	0,898332002
BLA32_RS05975	plasmide	MULTISPECIES: chromosome replication/partitioning protein	0,898985772
BLA32_RS04325	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	0,900091019
BLA32_RS05855	plasmide	DUF1322 family protein	0,904178664
BLA32_RS03335	chromosome	peptide chain release factor 1	0,905910162
BLA32_RS06290	plasmide	DUF685 domain-containing protein	0,912761838

BLA32_RS06160	plasmide	ERF family protein	0,91288984
BLA32_RS04360	plasmide lp54-lp38 fusion	virulence associated lipoprotein	0,916113283
BLA32_RS05845	plasmide	DUF1463 family protein	0,929525504
BLA32_RS04495	plasmide lp54-lp38 fusion	BBA07 family lipoprotein	0,930768733
BLA32_RS04575	plasmide lp54-lp38 fusion	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	0,935804034
BLA32_RS05850	plasmide	DUF1473 family protein	0,953088843
BLA32_RS06300	plasmide	holin, BlyB family	0,956652456
BLA32_RS04080	chromosome	protein-glutamate O-methyltransferase	0,978896764
BLA32_RS04805	plasmide	chromosome replication/partitioning protein	0,97974044
BLA32_RS05330	plasmide	hypothetical protein	0,997332046
BLA32_RS06170	plasmide	fibronectin-binding protein RevA	0,997370104
BLA32_RS03260	chromosome	hypothetical protein	1,018582396
BLA32_RS05810	plasmide	DUF735 family protein	1,025069785
BLA32_RS06000	plasmide	hypothetical protein	1,025442138
BLA32_RS04230	chromosome	hypothetical protein	1,054276187
BLA32_RS05720	plasmide	DUF792 family protein	1,065234267
BLA32_RS04800	plasmide	ParA family protein	1,070479057
BLA32_RS05125	plasmide cp26	hypothetical protein	1,099077545
BLA32_RS06135	plasmide	PBSX family phage terminase large subunit	1,111562708
BLA32_RS04545	plasmide lp54-lp38 fusion	peptide transporter	1,122942043
BLA32_RS01675	chromosome	molecular chaperone DnaK	1,131925776
BLA32_RS06625	plasmide lp54-lp38 fusion	SIMPL domain-containing protein	1,134240511
BLA32_RS06100	plasmide	hypothetical protein	1,135110163
BLA32_RS04615	plasmide lp54-lp38 fusion	peptide ABC transporter substrate-binding protein	1,16047934
BLA32_RS06115	plasmide	DUF261 domain-containing protein	1,164738492
BLA32_RS04585	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	1,165098861
BLA32_RS05905	plasmide	ERF family protein	1,165136332
BLA32_RS05715	plasmide	MULTISPECIES: DUF759 family protein	1,18312137
BLA32_RS06130	plasmide	DUF603 domain-containing protein	1,18445293
BLA32_RS04405	plasmide lp54-lp38 fusion	P12 family lipoprotein	1,187408639
BLA32_RS05425	plasmide	ParA family protein	1,192548458
BLA32_RS06060	plasmide	DUF261 domain-containing protein, partial	1,194285753
BLA32_RS06655	plasmide lp28-3	hypothetical protein	1,228238299
BLA32_RS05970	plasmide	ParA family protein	1,228722907
BLA32_RS06185	plasmide	MULTISPECIES: DUF228 domain-containing protein	1,231352933
BLA32_RS04295	plasmide lp54-lp38 fusion	adenine deaminase	1,231997958
BLA32_RS05915	plasmide	DUF226 domain-containing protein	1,234525719
BLA32_RS05545	plasmide	P12 family lipoprotein	1,242216969
BLA32_RS06015	plasmide	DUF226 domain-containing protein	1,249502425
BLA32_RS05950	plasmide	Mlp family lipoprotein	1,250119623
BLA32_RS04740	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	1,256111371
BLA32_RS00020	chromosome	hypothetical protein	1,258336688
BLA32_RS06325	plasmide	DUF603 domain-containing protein, partial	1,261980546
BLA32_RS05165	plasmide cp26	hypothetical protein	1,261992742
BLA32_RS05820	plasmide	MULTISPECIES: DUF3890 domain-containing protein	1,263431374
BLA32_RS05045	plasmide lp28-3	hypothetical protein	1,263955209

BLA32_RS05435	plasmide	MULTISPECIES: hypothetical protein	1,279559377
BLA32_RS05910	plasmide	hypothetical protein	1,27985759
BLA32_RS05635	plasmide	Mlp family lipoprotein	1,291490405
BLA32_RS05900	plasmide	DUF4094 domain-containing protein	1,293149714
BLA32_RS05625	plasmide	hypothetical protein	1,295617184
BLA32_RS05700	plasmide	MULTISPECIES: DUF1463 family protein	1,311830402
BLA32_RS04915	plasmide lp28-3	P13 family porin	1,32102223
BLA32_RS05590	plasmide	tyrosine-type recombinase/integrase	1,335596703
BLA32_RS06140	plasmide	DUF1073 domain-containing protein	1,336879312
BLA32_RS05195	plasmide	MULTISPECIES: ParA family protein	1,337774187
BLA32_RS04940	plasmide lp28-3	S2/P23 family protein	1,344054807
BLA32_RS04975	plasmide lp28-3	ParA family protein	1,356272826
BLA32_RS05685	plasmide	hypothetical protein	1,366865493
BLA32_RS04380	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	1,380623045
BLA32_RS03710	chromosome	PTS transporter subunit EIIC	1,382415785
BLA32_RS04280	plasmide lp54-lp38 fusion	VUT family protein	1,386455044
BLA32_RS05160	plasmide cp26	hypothetical protein	1,387083969
BLA32_RS05705	plasmide	MULTISPECIES: DUF1473 family protein	1,39287193
BLA32_RS06750	plasmide	hypothetical protein	1,399729705
BLA32_RS04425	plasmide lp54-lp38 fusion	P52 family lipoprotein	1,410591588
BLA32_RS05710	plasmide	MULTISPECIES: DUF1322 family protein	1,44690215
BLA32_RS05965	plasmide	DUF226 domain-containing protein	1,450795003
BLA32_RS04970	plasmide lp28-3	DUF226 domain-containing protein	1,450986314
BLA32_RS06260	plasmide	tyrosine-type recombinase/integrase	1,458650529
BLA32_RS04490	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	1,460775793
BLA32_RS01455	chromosome	DUF3996 domain-containing protein	1,4616241
BLA32_RS05585	plasmide	hypothetical protein	1,532656966
BLA32_RS01435	chromosome	chemotaxis protein CheA	1,54548521
BLA32_RS05055	plasmide cp26	hypothetical protein	1,549735525
BLA32_RS01440	chromosome	STAS domain-containing protein	1,561310185
BLA32_RS06180	plasmide	DUF1357 family protein	1,576116757
BLA32_RS05595	plasmide	DUF261 domain-containing protein	1,58752543
BLA32_RS06235	plasmide	MULTISPECIES: DUF228 domain-containing protein	1,595737436
BLA32_RS01680	chromosome	molecular chaperone DnaJ	1,599954762
BLA32_RS05530	plasmide	ferrous iron transporter A	1,612976014
BLA32_RS04610	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	1,614875396
BLA32_RS06005	plasmide	chromosome replication/partitioning protein	1,630759692
BLA32_RS06265	plasmide	hypothetical protein	1,634342066
BLA32_RS01445	chromosome	chemotaxis protein CheW	1,641096991
BLA32_RS05665	plasmide	MULTISPECIES: DUF228 domain-containing protein	1,646049431
BLA32_RS06105	plasmide	hypothetical protein	1,65941124
BLA32_RS06455	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	1,67157134
BLA32_RS06340	plasmide	hypothetical protein	1,696638993
BLA32_RS06030	plasmide	ERF family protein, partial	1,707597934
BLA32_RS06155	plasmide	hypothetical protein	1,708119505
BLA32_RS05420	plasmide	MULTISPECIES: DUF226 domain-containing protein	1,709501254

BLA32_RS05695	plasmide	DUF787 family protein	1,712509838
BLA32_RS05690	plasmide	DUF764 family protein	1,713727192
BLA32_RS04785	plasmide	variable large family protein	1,737287272
BLA32_RS04415	plasmide lp54-lp38 fusion	ThiF family adenylyltransferase	1,758627168
BLA32_RS06230	plasmide	DUF228 domain-containing protein	1,759126176
BLA32_RS06320	plasmide	DUF643 domain-containing protein	1,778927517
BLA32_RS05660	plasmide	DUF228 domain-containing protein	1,784609914
BLA32_RS05630	plasmide	ERF family protein	1,795781131
BLA32_RS05580	plasmide	DUF643 domain-containing protein	1,796208831
BLA32_RS05670	plasmide	hypothetical protein	1,80673835
BLA32_RS05105	plasmide cp26	hypothetical protein	1,820366519
BLA32_RS05675	plasmide	MULTISPECIES: DUF3890 domain-containing protein	1,820628691
BLA32_RS06035	plasmide	hypothetical protein	1,821789213
BLA32_RS05680	plasmide	MULTISPECIES: DUF1506 family protein	1,83787109
BLA32_RS04310	plasmide lp54-lp38 fusion	5\\'-methylthioadenosine/adenosylhomocysteine nucleosidase	1,843152428
BLA32_RS06545	plasmide	MULTISPECIES: Mlp family lipoprotein	1,869780708
BLA32_RS06165	plasmide	Mlp family lipoprotein	1,887407049
BLA32_RS04965	plasmide lp28-3	hypothetical protein	1,889471765
BLA32_RS06515	plasmide lp28-3	transposase	1,968513196
BLA32_RS05600	plasmide	DUF244 domain-containing protein	1,983305532
BLA32_RS00375	chromosome	RNA polymerase sigma factor RpoS	2,002868915
BLA32_RS06225	plasmide	DUF228 domain-containing protein	2,058133371
BLA32_RS05205	plasmide	hypothetical protein	2,067657355
BLA32_RS06740	plasmide lp28-3	transposase	2,088180832
BLA32_RS06145	plasmide	DUF1357 family protein	2,115977478
BLA32_RS04865	plasmide	CPBP family intramembrane metalloprotease	2,216007255
BLA32_RS05270	plasmide	hypothetical protein	2,230457287
BLA32_RS05220	plasmide	hypothetical protein	2,2307499
BLA32_RS05655	plasmide	DUF228 domain-containing protein	2,245445012
BLA32_RS04795	plasmide	DUF226 domain-containing protein	2,246043174
BLA32_RS05230	plasmide	hypothetical protein	2,259443935
BLA32_RS01670	chromosome	nucleotide exchange factor GrpE	2,268878705
BLA32_RS05240	plasmide	hypothetical protein	2,309601032
BLA32_RS05415	plasmide	hypothetical protein	2,315527006
BLA32_RS05030	plasmide lp28-3	hypothetical protein	2,322230991
BLA32_RS05225	plasmide	hypothetical protein	2,357804953
BLA32_RS05255	plasmide	terminase	2,371924521
BLA32_RS06120	plasmide	DUF244 domain-containing protein, partial	2,380490414
BLA32_RS05235	plasmide	hypothetical protein	2,38575762
BLA32_RS06020	plasmide	hypothetical protein	2,528140801
BLA32_RS04625	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	2,550386617
BLA32_RS05250	plasmide	hypothetical protein	2,565576927
BLA32_RS05245	plasmide	hypothetical protein	2,571695855
BLA32_RS04875	plasmide	complement regulator-acquiring protein	2,595283484
BLA32_RS05200	plasmide	DUF226 domain-containing protein	2,611125805
BLA32_RS05960	plasmide	hypothetical protein	2,624836775

BLA32_RS06075	plasmide	hypothetical protein	2,661674113
BLA32_RS04755	plasmide lp54-lp38 fusion	complement regulator-acquiring protein	2,772864784
BLA32_RS04580	plasmide lp54-lp38 fusion	decorin-binding protein DbpB	2,835198027
BLA32_RS06640	plasmide	variable large family protein	2,839913744
BLA32_RS04790	plasmide	hypothetical protein	2,970701237
BLA32_RS04860	plasmide	YcaO-like family protein	2,979119239
BLA32_RS04315	plasmide lp54-lp38 fusion	hypothetical protein	2,994292082
BLA32_RS05265	plasmide	PBSX family phage terminase large subunit	3,020636641
BLA32_RS06055	plasmide	YqaJ viral recombinase family protein, partial	3,095634376
BLA32_RS06470	plasmide	variable large family protein	3,193081735
BLA32_RS05315	plasmide	hypothetical protein	3,333404
BLA32_RS05320	plasmide	DUF226 domain-containing protein	3,337175616
BLA32_RS05185	plasmide	P12 family lipoprotein	3,34738924
BLA32_RS04850	plasmide	SagB/ThcOx family dehydrogenase	3,46695422
BLA32_RS04620	plasmide lp54-lp38 fusion	Mlp family lipoprotein	3,513600986
BLA32_RS04855	plasmide	streptolysin associated protein SagC	3,53597989
BLA32_RS05285	plasmide	right-handed parallel beta-helix repeat-containing protein	3,829580775
BLA32_RS06485	plasmide	MULTISPECIES: TOMM family putative cytolysin BorA	3,982582154
BLA32_RS05075	plasmide cp26	cell surface protein	4,08051699
BLA32_RS05305	plasmide	hypothetical protein	4,135694331
BLA32_RS05310	plasmide	hypothetical protein	4,184345241
BLA32_RS05295	plasmide	hypothetical protein	4,502243918
BLA32_RS05290	plasmide	hypothetical protein	4,563599929
BLA32_RS05300	plasmide	MULTISPECIES: DUF261 family protein	4,758046579
BLA32_RS05050	plasmide lp28-3	P52 family lipoprotein, partial	4,837210128
BLA32_RS04840	plasmide	hypothetical protein	5,133523777
BLA32_RS04845	plasmide	hypothetical protein	5,479975702
BLA32_RS04815	plasmide	hypothetical protein	5,891412442
BLA32_RS04830	plasmide	FtsX-like permease family protein	5,943077807
BLA32_RS04825	plasmide	ABC transporter ATP-binding protein	6,003347474
BLA32_RS04820	plasmide	hypothetical protein	6,054381817
BLA32_RS04835	plasmide	hypothetical protein	6,144490757

Annexe 2 : Gènes de *B. garinii* différentiellement exprimés en réponse au changement de température

Locus	Localisation génomique	Protéine codée	Log2(FC)
BLA33_RS04385	plasmide p_lp54_linear	hypothetical protein	-3,10528984
BLA33_RS04390	plasmide p_lp54_linear	PBSX family phage terminase large subunit	-2,3733004
BLA33_RS00360	chromosome	hypothetical protein	-2,12790372
BLA33_RS05435	plasmide cp26	cell surface protein	-2,10612275
BLA33_RS02255	chromosome	hypothetical protein	-1,54139563
BLA33_RS00955	chromosome	HemN-related non-iron pseudo-SAM protein PsgB	-1,44671369
BLA33_RS05335	plasmide cp26	hypothetical protein	-1,43387488
BLA33_RS04075	chromosome	protein-glutamate O-methyltransferase	-1,3924999
BLA33_RS03880	chromosome	ABC transporter permease	-1,38616414
BLA33_RS03025	chromosome	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	-1,35217304
BLA33_RS04265	chromosome	hypothetical protein	-1,34731474
BLA33_RS02135	chromosome	MULTISPECIES: DUF1893 domain-containing protein	-1,25484026
BLA33_RS00870	chromosome	hypothetical protein	-1,22503458
BLA33_RS02245	chromosome	hypothetical protein	-1,21264615
BLA33_RS01735	chromosome	TlyA family RNA methyltransferase	-1,21224894
BLA33_RS04605	plasmide p_lp54_linear	OMS28 family porin	-1,19656827
BLA33_RS03795	chromosome	endonuclease MutS2	-1,1640549
BLA33_RS01070	chromosome	exodeoxyribonuclease V subunit beta	-1,15876872
BLA33_RS03500	chromosome	alanine racemase	-1,06713266
BLA33_RS03890	chromosome	FtsX-like permease family protein	-1,05261277
BLA33_RS03020	chromosome	M23 family metallopeptidase	-0,99407863
BLA33_RS02720	chromosome	ABC transporter permease	-0,99156724
BLA33_RS03885	chromosome	ABC transporter ATP-binding protein	-0,98798076
BLA33_RS04185	chromosome	RluA family pseudouridine synthase	-0,97860439
BLA33_RS00495	chromosome	ABC transporter permease subunit	-0,93919141
BLA33_RS00500	chromosome	endonuclease III	-0,90415581
BLA33_RS00735	chromosome	hypothetical protein	-0,90393474
BLA33_RS01540	chromosome	dephospho-CoA kinase	-0,86842158
BLA33_RS03950	chromosome	hypothetical protein	-0,86045272
BLA33_RS00490	chromosome	ABC transporter permease	-0,83309616
BLA33_RS02240	chromosome	SEC59/DGK1/VTE5 family protein	-0,79906114
BLA33_RS00205	chromosome	tRNA pseudouridine(55) synthase TruB	-0,79124504
BLA33_RS03435	chromosome	hypothetical protein	-0,79113433
BLA33_RS02250	chromosome	DNA/RNA non-specific endonuclease	-0,76543906
BLA33_RS00300	chromosome	MULTISPECIES: DNA-binding protein SpoVG	-0,72226308
BLA33_RS03380	chromosome	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex dimerization subunit type 1 TsaB	-0,71847373

BLA33_RS00550	chromosome	tRNA-dihydrouridine synthase	-0,71667863
BLA33_RS02500	chromosome	MULTISPECIES: methylglyoxal synthase	-0,69829036
BLA33_RS02550	chromosome	hypothetical protein	-0,68122476
BLA33_RS02635	chromosome	hypothetical protein	-0,62512128
BLA33_RS03505	chromosome	S2/P23 family protein	-0,61945694
BLA33_RS02215	chromosome	hypothetical protein	-0,61745094
BLA33_RS00420	chromosome	M23 family metallopeptidase	0,602960835
BLA33_RS00445	chromosome	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	0,634410334
BLA33_RS03685	chromosome	di-trans,poly-cis-decaprenylcistransferase	0,645999432
BLA33_RS00390	chromosome	PfkB family carbohydrate kinase	0,659166817
BLA33_RS00460	chromosome	ABC transporter ATP-binding protein	0,661119303
BLA33_RS00625	chromosome	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	0,68234351
BLA33_RS03740	chromosome	acetyl-CoA C-acyltransferase	0,696147305
BLA33_RS04105	chromosome	P13 family porin	0,739617496
BLA33_RS00040	chromosome	excinuclease ABC subunit UvrA	0,752256013
BLA33_RS04510	plasmide p_lp54_linear	DUF693 family protein	0,77389143
BLA33_RS02665	chromosome	peptide ABC transporter substrate-binding protein	0,781816516
BLA33_RS04530	plasmide p_lp54_linear	hypothetical protein	0,795682816
BLA33_RS00325	chromosome	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L27	0,79748384
BLA33_RS00525	chromosome	ATP-binding cassette domain-containing protein	0,801271276
BLA33_RS02030	chromosome	chromate transporter	0,810602269
BLA33_RS01050	chromosome	Na+/H+ antiporter NhaC family protein	0,844393491
BLA33_RS02565	chromosome	50S ribosomal protein L28	0,851388271
BLA33_RS00385	chromosome	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex transferase subunit TsaD	0,856656996
BLA33_RS01440	chromosome	chemotaxis protein CheA	0,897506772
BLA33_RS00475	chromosome	DUF4340 domain-containing protein	0,930606474
BLA33_RS00345	chromosome	DUF2147 domain-containing protein	0,942933868
BLA33_RS00260	chromosome	hypothetical protein	0,9453648
BLA33_RS03070	chromosome	peptidoglycan DD-metalloendopeptidase family protein	0,956481773
BLA33_RS02275	chromosome	DUF3996 domain-containing protein	0,973903627
BLA33_RS03080	chromosome	DUF327 family protein	0,994062682
BLA33_RS01450	chromosome	MULTISPECIES: chemotaxis protein CheW	1,026553859
BLA33_RS04570	plasmide p_lp54_linear	complement regulator-acquiring protein	1,027386482
BLA33_RS03075	chromosome	polymer-forming cytoskeletal protein	1,161475149
BLA33_RS04665	plasmide unnamed1	variable large family protein	1,198114785
BLA33_RS05190	plasmide lp28-7	chromosome replication/partitioning protein	1,207639644
BLA33_RS01685	chromosome	molecular chaperone DnaJ	1,229460364
BLA33_RS05830	plasmide unnamed1	hypothetical protein	1,309486529
BLA33_RS04660	plasmide unnamed1	hypothetical protein	1,316160123
BLA33_RS01055	chromosome	glucose-6-phosphate dehydrogenase	1,40347505
BLA33_RS04630	plasmide unnamed1	P12 family lipoprotein	1,529865247
BLA33_RS04415	plasmide p_lp54_linear	hypothetical protein	1,542437049
BLA33_RS04495	plasmide p_lp54_linear	hypothetical protein	1,563693732
BLA33_RS04500	plasmide p_lp54_linear	hypothetical protein	1,604926245

Curriculum vitae

Aurélien Alafaci

Né le 27 Novembre 1995
Adresse : 4 Allée Armonville, 86000 Poitiers
Téléphone : 06.64.62.54.54
E-mail : aurelien.alafaci@univ-poitiers.fr

Formations

Doctorat en Biochimie et Biologie Moléculaire – 2018 à 2021 – Implications des interactions *Quorum Sensing* dépendantes dans la mise en place et la prévalence de co-infections et la virulence de *B. afzelii* et *B. garinii*, agents responsables de la Borréliose de Lyme en Europe - Université de Poitiers.

Master Biologie Cellulaire et Moléculaire – 2016 à 2018 – Mention bien - Université de Poitiers.

DUETE Microbiology & Biotechnology – 2015 à 2016 – Napier University (Edimbourg).

DUT Génie Biologique option agronomie – 2013 à 2015 – Université de Haut-Alsace.

Baccalauréat – 2013 – Options science de la vie et de la terre – Mention bien - Lycée Camille Sée, Colmar

Expériences professionnelles

Attaché temporaire d'enseignement et de recherche – Université de Poitiers, UMR CNRS 7267 – Septembre 2021 à aujourd'hui.

Doctorat - Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions (UMR CNRS 7267) - **Octobre 2018 à 2021** – Dirigé par Jean-Marc BERJEAUD, Julien VERDON et Vincent DELFAONT.
Implications des interactions *Quorum Sensing* dépendantes dans la mise en place et la prévalence de co-infections et la virulence de *B. afzelii* et *B. garinii*, agents responsables de la Borréliose de Lyme en Europe.

Compétences associées :

- **Microbiologie** : Culture bactérienne, microscopie, étude d'interactions bactériennes
- **Biologie moléculaire** : Extraction et purification d'acides nucléiques (ADN et ARN), PCR, RT-PCR, qPCR, RT-qPCR, création de mutants, transformation bactérienne.
- **Bioinformatique** : Analyse de diversité bactérienne par métabarcoding 16S (Qiime2, R software), analyse transcriptomique.
- **Compétences transversales** : Rédaction d'articles scientifiques, communication.

Stage de Master 2 - Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions (UMR CNRS 7267) - **Janvier 2018 à juin 2018** – Encadré par Julien VERDON.
Etude de la fonctionnalité d'un système de *Quorum Sensing* LuxS dépendant chez *Borrelia garinii* et *Borrelia afzelii*.
Compétences associées : Culture bactérienne, microscopie, étude des biofilms, extraction d'acides nucléiques, RT-PCR, RT-qPCR, création de mutants.

Stage de Master 1 - Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions (UMR CNRS 7267) - **Mai 2007 à juin 2017** – Encadré par Yann HECHARD.
Isolement et caractérisation d'amibes environnementales et de leurs bactéries intracellulaires
Compétences associées : Culture d'amibes en milieu liquide et solide, Extraction et purification de l'ADN, Séquençage.

Stage de DUT 2 - RITTMO Agroenvironnement, Colmar - **Avril 2015 à juillet 2015** – Encadré par Najat NASSR et Aude LANGENFELD
Etude des impacts de différents biochars sur les populations microbiennes.
Compétences associées : Mesures de pH, entretien de cultures végétales, PCR, qPCR, Mesures Oxitop.

Publications

Alafaci, A.; Crépin, A.; Beaubert, S.; Berjeaud, J.-M.; Delafont, V.; Verdon, J. Exploring the Individual Bacterial Microbiota of Questing *Ixodes ricinus* Nymphs. Microorganisms 2021, 9, 1526. https://doi.org/10.3390/ microorganisms9071526

Aucher W, Delafont V, Ponlaitiac E, Alafaci A, Agogué H, Leboulanger C, Bouvy M, Héchard Y. Morphology and Ecology of Two New Amoebae, Isolated From a Thalassohaline Lake, Dziani Dzaha. Protist. 2020 Dec;171(6):125770. doi: 10.1016/j.protis.2020.125770. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33166717.

Alafaci, A. ; Berjeaud, J.-M. ; Crépin, C. ; Delafont, V. ; Verdon, J. Comparison of *Borreliella afzelii* and *Borreliella garinii*, the main agents of Lyme Borreliosis in Europe, a state of the art. Review. En préparation.

Communication orale

Alafaci, A. ; Crépin, A. ; Berjeaud, J.-M. ; Delafont, V. ; Verdon, J. Rôle de la communication moléculaire chez *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*. 23 mars 2021. Groupement Tiques et Maladies à Tiques.

Activités d'enseignement

Attaché temporaire d'enseignement et de recherche – Section 64 (Biochimie et biologie moléculaire) et section 65 (Biologie cellulaire) – Septembre 2021 à juin 2022 – Université de Poitiers, UMR CNRS 7267 -192h équivalent TD

Doctorant contractuel à activités complémentaires d'enseignement – Section 64 (Biochimie et biologie moléculaire) – 2020-2021 – 63h équivalent TD

Doctorant contractuel à activités complémentaires d'enseignement – Section 64 (Biochimie et biologie moléculaire) – 2019-2020 – 36h équivalent TD

Autres interventions et responsabilités

Animation d'ateliers scientifiques grand public, E**cole de l'ADN, Poitiers** - 2019

Finaliste régional au concours **Ma Thèse en 180 secondes** - 2019

Coordinateur local du festival **Pint of Science** à Poitiers - 2020

Résumé

La Borréliose de Lyme est la maladie vectorielle la plus importante dans l'hémisphère nord en termes de prévalence. Elle est causée par des bactéries du genre *Borreliella* qui sont transmises à l'Homme par l'intermédiaire de morsures de tiques. En Europe, *B. afzelii* et *B. garinii* sont deux espèces majeures qui sont fréquemment co-détectées au sein d'une tique, soulevant l'hypothèse de l'existence d'un système leur permettant d'établir des co-infections. Le *Quorum Sensing* est un système de communication bactérien qui joue un rôle crucial dans le cycle de vie et la virulence des bactéries. Le *Quorum Sensing* induit par l'autoinducteur-2 (AI-2) permet une communication à la fois intra et inter-espèces. L'un des objectifs de cette thèse a été d'investiguer **la présence, la fonctionnalité et le rôle de ce type de communication chez *B. afzelii* et *B. garinii***. Les résultats ont montré que ces deux espèces possèdent un système de communication AI-2 dépendant fonctionnel. Le développement d'outils visant à bloquer cette communication a été initié et permettra d'étudier de manière plus précise le rôle du *Quorum Sensing* dans la virulence des *Borreliella* ainsi que dans l'établissement de co-infections. En parallèle, la présence de tiques infectées par des *Borreliella* en Poitou-Charentes a été étudiée pour la première fois. Pour cela, le microbiote bactérien interne de tiques *Ixodes ricinus* a été étudié par séquençage haut-débit d'amplicons du gène codant l'ARNr 16s. Cette méthode présente l'avantage de permettre la caractérisation du microbiote bactérien dans son ensemble, à la fois les pathogènes mais également les autres genres bactériens. Un microbiote conservé/partagé des tiques analysées a été défini et la présence de séquences assignées à *Borreliella* spp. a été mise en évidence. Au sein de plusieurs tiques, différentes espèces de *Borreliella* spp. ont été détectées, indiquant de possibles co-infections.

Mots-clés: Borréliose de Lyme, tiques, *Ixodes ricinus*, *Quorum Sensing*, *Borreliella*, microbiote de tiques, *Borreliella afzelii*, *Borreliella garinii*.

Abstract

Lyme Borreliosis is the most common vectorial disease in the northern hemisphere. It is caused by bacteria belonging to the *Borreliella* genus, the main species being *B. afzelii* and *B. garinii* in Europe, which are transmitted to Humans by tick bites. These species are frequently co-detected inside a tick, raising the hypothesis of the existence of a mechanism facilitating such co-infections. *Quorum Sensing* is a bacterial communication system crucial in the life cycle and the virulence of bacteria. The autoinducer-2 (AI-2) based communication system is involved in both intra and inter-species. One aim of this thesis was to **investigate the presence, functionality, and the role of such communication in *B. afzelii* and *B. garinii***. Results have shown that both species have a functional AI-2 based communication system and the development of tools to block such communication has been initiated. These tools should provide better insight into the role played by *Quorum Sensing* in the virulence of these two species as well as in the establishment of co-infections. In parallel, the presence of *Borreliella* in ticks of the region Poitou-Charentes has been investigated. No data was available concerning tick's infection rates by this bacterial genus even though the prevalence of the disease in this region is important. Internal bacterial microbiota of ticks has been explored by high-throughput sequencing of amplicons of the gene coding for the 16S rRNA. This method allows the characterisation of the total bacterial microbiota. A core microbiota of the ticks analysed was defined and the presence of sequences assigned to *Borreliella* spp. was highlighted. Inside a single tick, sequences assigned to several *Borreliella* spp. were detected, indicating potential co-infections.

Keywords: Lyme Borreliosis, ticks, *Quorum Sensing*, *Borreliella*, tick microbiota, *Borreliella afzelii*, *Borreliella garinii*.