



HAL
open science

Développement d'une méthode automatique de suivi de la croissance de *Borrelia burgdorferi*

Damien Potheret, Patrizia Giannoni, Axelle Cadiere

► **To cite this version:**

Damien Potheret, Patrizia Giannoni, Axelle Cadiere. Développement d'une méthode automatique de suivi de la croissance de *Borrelia burgdorferi*. Microbes 2022 - 17e congrès national de la SFM, Oct 2022, Montpellier, France. hal-04108122

HAL Id: hal-04108122

<https://hal.science/hal-04108122>

Submitted on 26 May 2023

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

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

Damien Potheret^{#✉}, Axelle Cadière^{*}, Patrizia Giannoni^{*}
étudiant en doctorat, * directeur de thèse

UPR CHROME, Université de Nîmes, Rue du Dr G. Salan, 30021 Nîmes CEDEX1, France

✉ damien.potheret@unimes.fr

Contexte et Objectif

Borrelia burgdorferi sensu lato regroupe les espèces bactériennes responsables de la maladie de Lyme. Cette maladie est transmise à l'Homme au cours du repas de sang d'une tique (**Fig1-1**) qui est le vecteur de la bactérie (**Fig1-2**). Durant le stade précoce de la maladie, les personnes infectées présentent généralement un rash caractéristique appelé érythème migrant (**Fig1-3**) au niveau du site de morsure de la tique (**Fig1-4**) qui peut être accompagné de symptômes pseudo-grippaux. A partir de ce stade, si la maladie n'est pas prise en charge à l'aide d'un traitement antibiotique adapté, la bactérie peut disséminer depuis son site d'entrée vers d'autres régions de l'organisme (**Fig1** ☆) et causer différentes manifestations (**Table1**). Même si *B. burgdorferi* a été identifiée comme l'agent responsable de la maladie de Lyme il y a plus de 40 ans, il reste encore beaucoup à découvrir sur le développement de la maladie et sur l'amélioration des techniques de diagnostics. Une raison limitant le nombre d'étude sur *B. burgdorferi* est la complexité de sa culture par rapport à d'autres agents pathogènes et notamment sa lenteur de croissance, qui empêche d'utiliser la lecture de turbidimétrie pour l'évaluer. Par conséquent, la croissance de *B. burgdorferi* en laboratoire est majoritairement monitorée à l'aide d'hématimètre (lame de Petroff Hausser) via un dénombrement manuel au microscope. L'objectif de cette étude est de proposer une méthode alternative plus rapide et automatique pour le dénombrement de *B. burgdorferi*.

Figure 1 : sites de manifestations de la maladie de Lyme

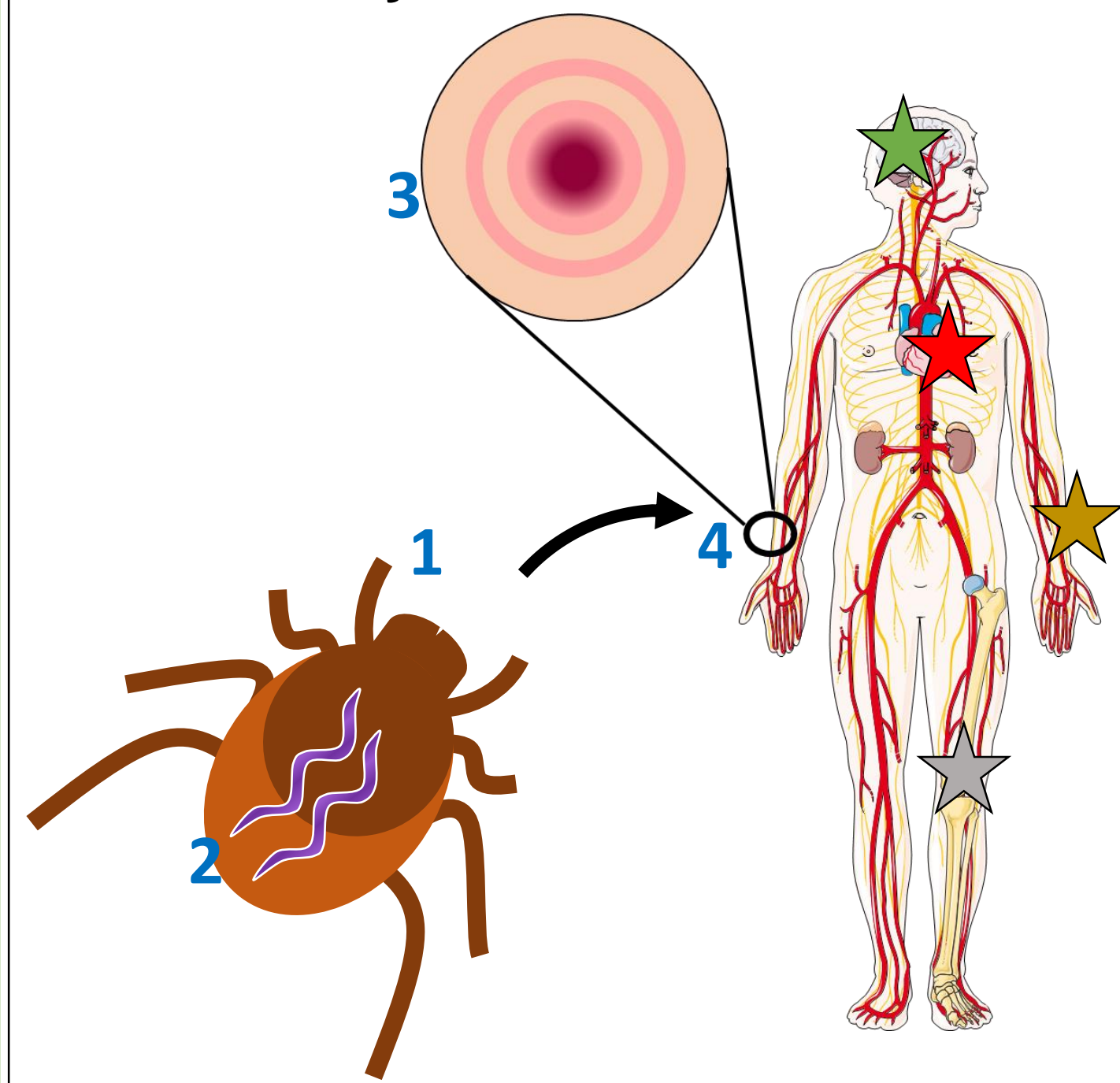


Table 1 : Développement de la maladie de Lyme, principales manifestations et espèces de *Borrelia burgdorferi* s.l. associées

Stade d'avancement de la maladie	Site de la manifestation	Manifestation ; espèce bactérienne associée
Précoce localisé	Morsure de la tique (Fig1-4) « Générale »	Erythème migrant, symptôme pseudo-grippaux ; <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.
Précoce disséminé	★ Peau ★ Cœur ★ Système Nerveux Central et Périphérique (neuroborréliose)	Lymphocytome borrélien <i>Borrelia afzelii</i> Cardites ; <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. Paralysie faciale, neuropathie trigéminal, méningites, radiculoneurites ; <i>Borrelia garinii</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.
Tardif disséminé	★ Articulation ★ Peau ★ Système Nerveux Central et Périphérique (neuroborréliose)	Arthrites ; <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. Acrodermatite chronique atrophique ; <i>Borrelia afzelii</i> Encéphalomyélites chronique <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.

Borrelia burgdorferi s.s. (sensu stricto)

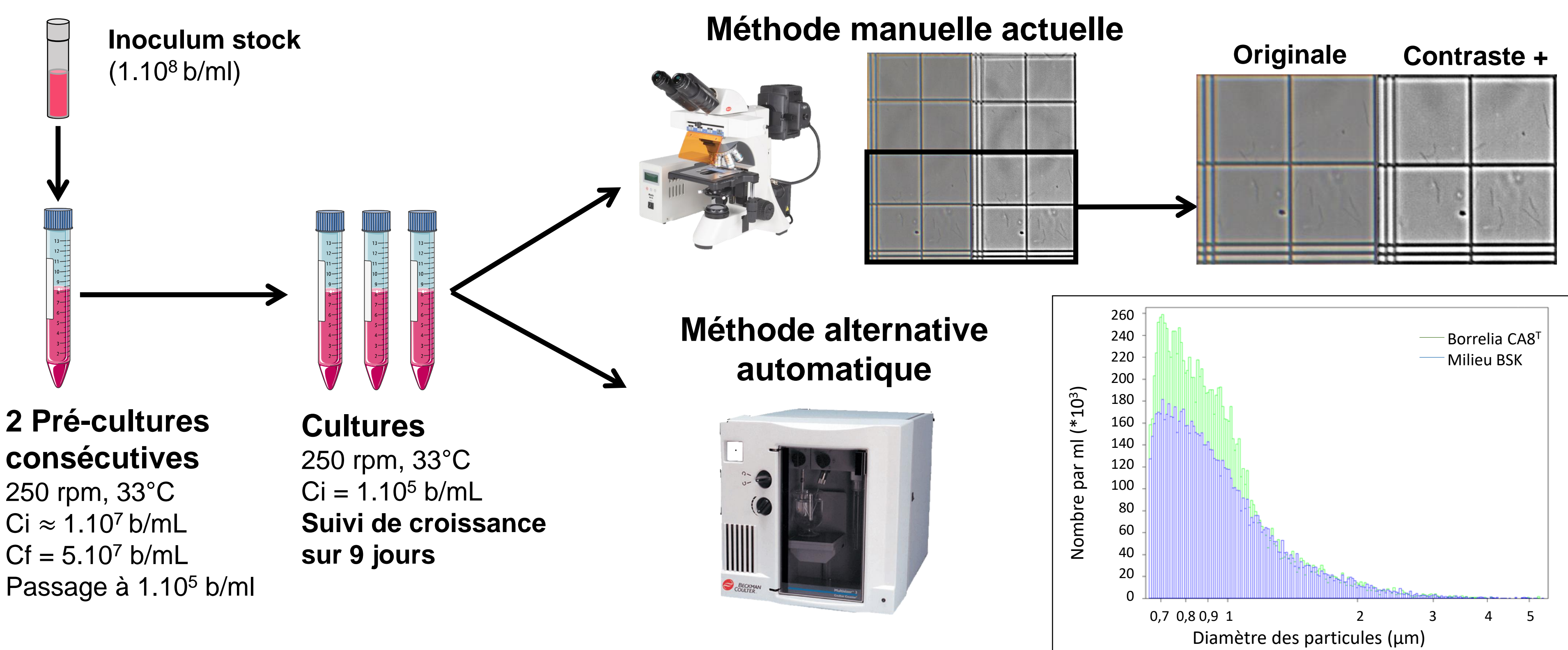
Principales difficultés rencontrées au laboratoire

Comparaison de la culture de *Borrelia burgdorferi* vs culture *Escherichia coli*

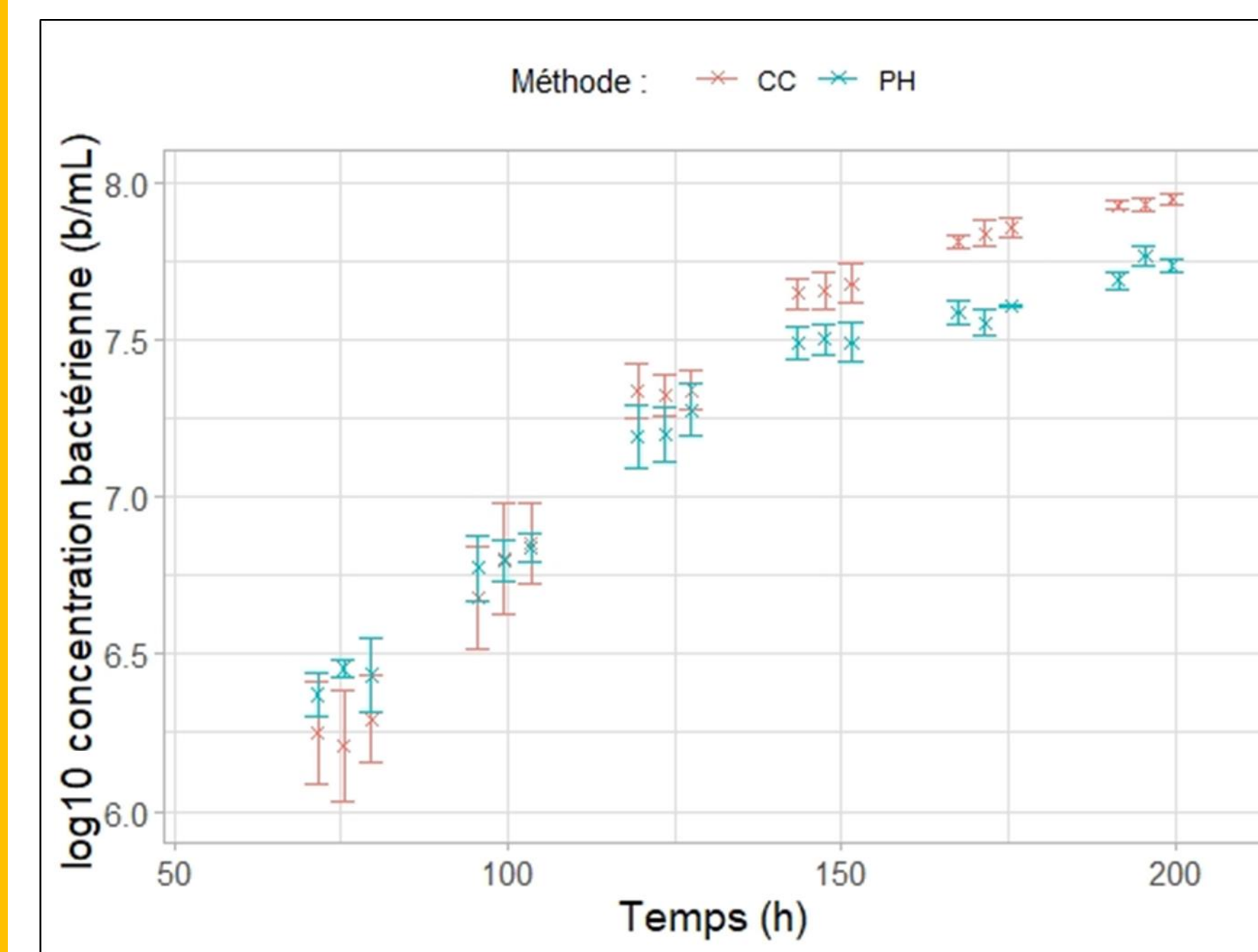
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	<i>Escherichia coli</i>
<ul style="list-style-type: none"> Milieu riche et complexe indispensable Temps de division long (5-16h selon souche) Dénombrement via hématimètre, manuel, long Difficulté à reproduire les inocula 	<ul style="list-style-type: none"> Milieu simple possible Temps de croissance rapide (environ 20 minutes) Dénombrement automatique par mesure de DO, rapide Facilité à reproduire les inocula
<ul style="list-style-type: none"> → Peu étudiée et peu utilisée au laboratoire (infectiologie) 	<ul style="list-style-type: none"> → Largement étudiée et utilisée au laboratoire (e.g. développement technologique, infectiologie, pharmacologie)

→ Mise au point d'une méthode automatique, reproductible et rapide du dénombrement de *Borrelia burgdorferi*
→ Permettre une utilisation plus importante de *Borrelia burgdorferi* au laboratoire

Matériel & Méthodes



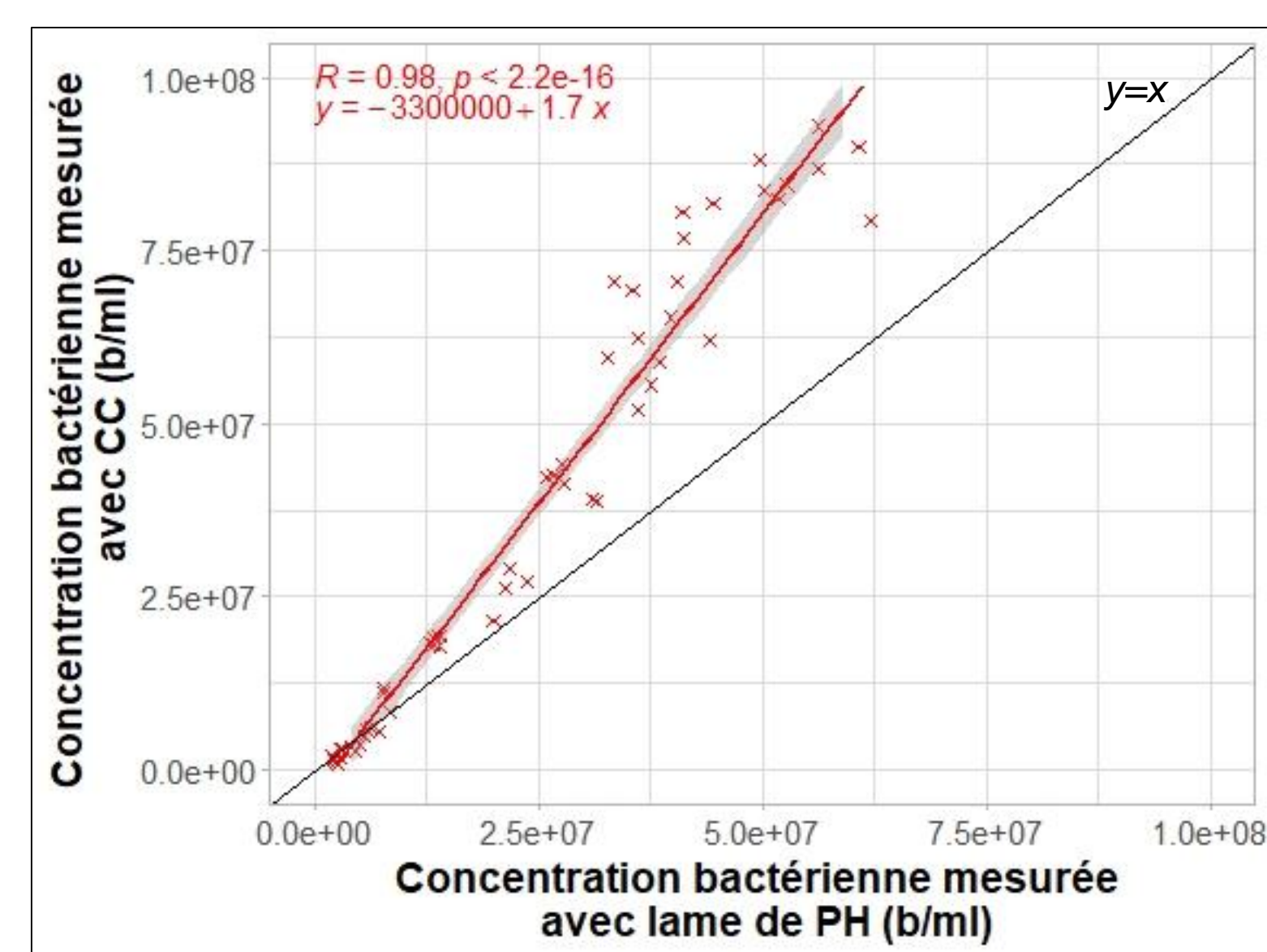
Croissance bactérienne



Echantillons	Temps_gen (h)	Temps_gen_moyen (h)
CC1	13,33	
CC2	14,86	13,63 ± 0,82
CC3	12,69	
PH1	15,97	
PH2	13,77	16,79 ± 2,56
PH3	20,62	

CC : Coulter Counter
PH : Lame de Petroff Hausser

Etude de la corrélation et de la concordance des résultats obtenus via les 2 méthodes utilisées



Comparaison des résultats obtenus par dénombrement au Coulter Counter et par dénombrement via la lame de Petroff Hausser

Observation	Test utilisé	Résultats	Conclusion associée
Corrélation entre les méthodes de dénombrements	Corrélation de Spearman	Rho = 0,95	Forte corrélation positive observée entre les résultats des 2 méthodes
Concordance entre les méthodes de dénombrements	Coefficient de concordance de Lin	Lin's CCC = 0,75	Concordance satisfaisante observée entre les résultats des 2 méthodes

Loïc L. Desquilbet. Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure : répétabilité, reproductibilité, et concordance. 2012. hal-02103716v5

Acquisition des données

Lame Neubauer improved (Petroff Hausser)

→ dépôt solution bactérienne sans dilution
Microscope Motic, BA410E
→ acquisition grossissement 20X
Camera TIS DFK 33UX226, The Imaging Source
Logiciel IC Capture, The Imaging Source

Coulter Counter Multisizer 3, Beckman Coulter

→ Dilution 1/800
→ Aperture : 30µm
→ Taille observée: 0-10 µm
Logiciel Multisizer 3, Beckman Coulter

Discussion et conclusion

L'utilisation du Coulter Counter tel que présentée dans notre étude règle en partie certaines difficultés observées lors du dénombrement de *Borrelia burgdorferi*. Cette technique permet notamment d'augmenter l'homogénéité des temps de croissance obtenus et se révèle beaucoup moins complexe et plus rapide à mettre en œuvre. Nous observons cependant dans nos conditions que jusqu'à 60h de croissance, le nombre de cellules bactériennes limité empêche un dénombrement efficace. Ainsi, l'utilisation du Coulter Counter dans nos conditions ne peut être appliquée qu'après un temps minimale de croissance pour permettre un dénombrement efficace ce qui représente le temps minimale utilisé pour nos manipulations. A ce temps là, le nombre de bactérie est en dessous du nombre minimale conseillé pour l'utilisation de la lame de Petroff Hausser. La corrélation entre les résultats obtenus par microscopie et ceux obtenus via le Coulter Counter est forte (Rho = 0,95) montrant une forte précision de l'analyse. La concordance testée avec le coefficient de concordance de Lin a elle montré un résultat satisfaisant (Lin's CCC = 0,75).