INSTITUT PASTEUR

# CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES BORRELIA

# RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE

## Année 2005


Responsables : Danièle Postic
Elisabeth Ferquel

Techniciens : Martine Garnier
Natacha Sertour
Virginie Hossard

# INTRODUCTION

Les principales actions du CNR des *Borrelia* en 2005, en réponse au cahier des charges fixé par l'InVS, ont concerné la surveillance épidémiologique de la borréliose de Lyme, la surveillance écologique du vecteur et l'expertise s'exerçant à la fois dans les domaines du diagnostic de la maladie, que dans celui de la connaissance du pathogène. Etant donné les difficultés à recueillir les informations cliniques sur une grande échelle, un de nos objectif est de corréler l'incidence de la maladie à la densité du vecteur infecté par les pathogènes à un échelon régional. Cette étude préalable devrait, à terme, nous permettre d'estimer l'incidence de la borréliose de Lyme à partir de l'étude du vecteur *Ixodes ricinus* et de son taux d'infection par *B. burgdorferi* sl dans différentes régions françaises.

Ces principaux points sont présentés dans ce rapport d'activité émanant du CNR des *Borrelia*.

# A. SURVEILLANCE CLINIQUE

## A. 1. ETUDE CLINIQUE PROSPECTIVE DANS LA REGION AUVERGNE

Nous avons poursuivi cette année la surveillance clinique de la borréliose de Lyme dans cette région. Nous avons donc recontacté les médecins de chacun des 4 départements, qui avaient accepté de participer au réseau de surveillance en 2004. En cours d'année, le Dr. E. Ferquel a de nouveau rappelé (éventuellement plusieurs fois) l'ensemble des médecins qui avaient donné leur accord de participation et qui n'avaient pas encore déclaré de cas ou d'absence de cas.

### A. 1. 1. Participation médicale au réseau de surveillance de la borréliose de Lyme en Auvergne

Tableau A1. Participation des médecins au réseau de surveillance de la borréliose de Lyme en Auvergne en 2005.

| | Puy-de-Dôme (63) | Cantal (15) | Allier (03) | Haute Loire (43) |
|---|---|---|---|---|
| Nb médecins contactés initialement. | 763 | 310 | 410 | 227 |
| Nb réponses favorables | 113 | 100 | 61 | 13 |
| Nb médecins ayant déclaré des cas | 33 | 32 | 17 | 3 |
| Nb médecins n'ayant pas vu de cas | 70 | 63 | 41 | 7 |
| Sans suite | 10 | 5 | 3 | 3 |
| Taux de participation | 14 % | 31 % | 14 % | 4 % |

La participation médicale dans 3 des départements de la région Auvergne (Tableau A1) a été beaucoup plus forte cette année qu'en 2004, particulièrement dans le Cantal où le Dr. Malaval a beaucoup contribué à cette mobilisation. C'est toujours dans la Haute-Loire que le plus faible taux de participation a été enregistré, interdisant cette année encore l'estimation de l'incidence de la maladie. Il faut cependant préciser que nous n'avons pas relancé l'ensemble des médecins dans ce département et que seuls les médecins ayant participé en 2004 ont été recontactés en 2005.

Initialement 287 médecins se sont déclarés volontaires pour assurer la surveillance dans la région Auvergne en 2005, mais 21 d'entre eu n'ont finalement pas renvoyé de fiches de renseignements. Ce sont donc en définitive, 266 médecins qui ont réellement participé à cette surveillance. Parmi eux, 80 % étaient des généralistes. Les autres spécialités concernées sont par ordre décroissant les pédiatres (6 %), les dermatologues (5 %), puis les rhumatologues (3 %) et neurologues (2 %). A noter que des médecins hospitaliers ont également participé à ce travail.

### A. 1. 2. Incidence de la borréliose de Lyme

Parmi 266 médecins participants, 85 ont déclaré des cas de borréliose de Lyme au CNR, 54 n'ont vu qu'un seul cas, 16 ont vu 2 cas, 7 ont vu 3 cas, 4 ont vu 4 cas, 1 a vu 5 cas, et 3 ont vu plus de 5 cas (un médecin hospitalier a vu 21 cas). Ce sont donc 162 cas qui ont été déclarés au CNR. Cependant, en

prenant en compte les critères diagnostiques de l'EUCALB, seuls 124 cas parmi ces 162 cas déclarés ont été considérés comme des cas certains.
Cent quatre-vingt-un médecins ont dit ne pas avoir vu de cas au cours de l'année. Comme les années précédentes, la plupart des médecins contactés par téléphone nous ont signalé un grand nombre de consultations motivées par des piqûres de tiques. La majorité des médecins ne traitent pas leurs patients dans cette circonstance.

Tableau A2. Caractéristiques cliniques des cas certains de borréliose de Lyme rapportés dans les 4 départements de la région Auvergne

| | Puy-de-Dôme | Cantal | Allier | Haute-Loire |
|---|---|---|---|---|
| Paramètres | Cas certains (n = 59) | Cas certains (n = 40) | Cas certains (n =21) | Cas certains (n =4) |
| Incidence de la maladie [Intervalle de confiance] | 72/100 000 hab [35-110] | 86/100 000 hab. [35-138] | 43/100 000 hab. [21-65] | |
| | (sur n=55) | (sur n=38) | (sur n=16) | |
| Age | 3-82 | 7-79 | 11-83 | |
| Moyenne ± SD | 47.9±19.9 | 51±18.6 | 57.6±20.4 | |
| Sex ratio | | | | |
| Femme | 33 | 21 | 11 | |
| Homme | 20 | 19 | 6 | |
| Non précisé | 6 | | 4 | |
| Signes Cutanés | | | | |
| EM seul et isolé | 33 | 25 | 15 | 3 |
| EM multiple | | 1 | - | |
| EM + signes d'accompagnement | 19 | 12 | 5 | 1 |
| ACA | 1 | - | | |
| LCB | 1 | - | | |
| Signes Neurologiques | | | | |
| Paralysie faciale | 1 | | | |
| Radiculite | | 1 | | |
| Signes Rhumatologiques | | | | |
| Arthrite | 4 | 1 | 2 | |

Compte tenu de la population de chacun des départements, du nombre de cas certains et du nombre de médecins participants, l'incidence estimée en 2005 va de 43 cas/100 000 habitants dans l'Allier à 86 cas/100 000 habitants dans le Cantal. L'incidence estimée dans ce département et celle estimée dans le Puy-de-Dôme sont très proches. Par contre l'incidence est plus faible dans l'Allier, où le taux de participation médicale était pourtant identique à celui du Puy-de-Dôme.
Dans les deux départements du Puy-de-Dôme et de l'Allier, la participation médicale a été similaire durant les 2 années de surveillance. Cependant, dans le Puy-de-Dôme, même si la différence n'est pas significative, on note une forte baisse de l'incidence de la maladie en 2005 par rapport à l'année précédente. On verra plus loin (chapitre vecteur) que dans le même temps, la densité des nymphes d'*I. ricinus* a aussi considérablement chuté en 2005 dans le Puy-de-Dôme, de même que la densité des nymphes infectées, qui constituent le stade le plus à risque pour l'homme. L'incidence de la maladie a augmenté dans le Cantal en 2005, mais cette augmentation peut être en rapport avec une mobilisation accrue des médecins. Par contre, dans l'Allier, l'incidence en 2005 reste très voisine de celle de 2004.

Les caractéristiques cliniques des cas certains figurent sur le tableau A2. La très grande majorité des patients présentaient un EM (n=113, 91 % des patients), isolé dans 66 % des cas. Dans les autres cas, l'EM était accompagné de signes généraux, manifestations algiques en particulier. Un cas d'EM

inhabituel par la durée de son évolution a été confirmé par PCR qui a mis en évidence l'ADN de *B. afzelii*. Chez 8 patients, l'EM était accompagné de signes neurologiques ayant conduit le médecin à évoquer une neuroborréliose, mais, sans données sur le LCR (PL non effectuée), ces cas n'ont pas été inclus dans les formes neurologiques. Deux cas neurologiques seulement ont été considérés comme certains cette année, il s'agissait d'une paralysie faciale et d'une radiculite. Par contre, 7 cas d'arthrite ont été déclarés, 6 cas de mono-arthrite et un cas de polyarthrite. De plus, dans 3 cas, un EM avait précédé les manifestations articulaires de quelques mois.
La taille de l'EM n'était précisée que dans 35 cas, entre 5-10 cm dans 12 cas, entre 10-15 cm dans 17 cas et >15 cm dans 6 cas.
Les autres manifestations cutanées ont été rares puisque seuls un ACA et un LBC ont été signalés. La PCR effectuée sur la biopsie cutanée du seul cas d'ACA a permis d'identifier l'ADN de *B. afzelii*.

Ont été considérés comme probables 14 cas de neuroborréliose (9 cas de radiculite et 5 cas de paralysie faciale) pour lesquels l'analyse du LCR n'avait pas été réalisée. L'observance des critères de l'EUCALB nous contraint à très vraisemblablement sous-estimer l'incidence de ce type de manifestation de la maladie

### A.1. 3. Caractéristiques épidémiologiques

Tableau A3. Caractéristiques épidémiologiques de l'ensemble des 124 cas certains de borréliose de Lyme rapportés dans les 4 départements de l'Auvergne.

| | |
|---|---|
| Facteurs de risque | |
| Oui | 109 |
| Non | 1 |
| Non précisé | 14 |
| Antécédent de piqûre de tique | |
| oui | 62 |
| non | 31 |
| Non précisé | 31 |
| Piqûre précédant l'épisode actuel | |
| oui | 79 |
| non | 26 |
| Non précisé | 19 |
| Siège de la piqûre | |
| MI | 41 |
| Tête-Sein-Dos-Thorax-Abdomen | 22 |
| MS | 5 |
| Non précisé | 56 |
| Durée d'attachement de la tique | |
| Non précisé | 91 |
| ≤ 12 h | 2 |
| 24 h < < 72 h | 21 |
| > 72 h | 10 |

Les caractéristiques épidémiologiques (tableau A3) sont tout à fait semblables à celles observées en 2004. La moitié des patients signale des antécédents de piqûre de tiques et 64 % rapportent une piqûre précédant l'épisode actuel. Le siège de la piqûre est le plus souvent au niveau des membres inférieurs. L'élément le plus difficile à obtenir reste la durée d'attachement de la tique, très rarement précisée par les patients.

La majorité des diagnostics ont été faits entre juin et septembre, bien que des cas soient diagnostiqués toute l'année (Fig. A1).

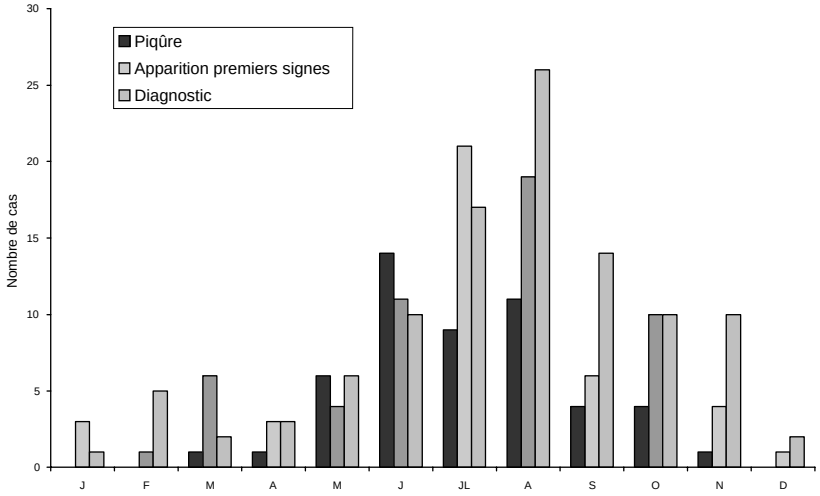


Figure A1. Répartition des cas en Auvergne sur l'année 2005.

## A. 2. ETUDE CLINIQUE PROSPECTIVE DANS LE DEPARTEMENT DE LA MEUSE.

Nous avons poursuivi pour la quatrième année consécutive l'étude prospective de l'incidence de la borréliose de Lyme dans la Meuse. Nous avons obtenu l'accord de 70 médecins du département pour continuer cette surveillance. Huit d'entre eux n'ayant pas renvoyé de fiches de renseignements, ce sont au total 62 médecins qui ont effectivement participé à l'étude, soit 17 % de la population médicale du département.

Parmi les 70 médecins initialement volontaires, 8 n'ont jamais renvoyé de fiches de renseignements. Les médecins généralistes représentent ici encore la grande majorité des participants (66 %), les dermatologues et cardiologues viennent ensuite (chacun représentant 4 % des participants), puis les rhumatologues et les pédiatres (chacun représentant 3 %). Sept médecins hospitaliers ont également participé.
Dix-huit médecins ont déclaré des cas et envoyé les fiches de renseignements cliniques correspondantes:

5 d'entre eux ont vu un seul cas
6 ont vu deux cas
4 a vu 3 cas
3 ont vu 5 cas

Quarante-quatre médecins n'ont vu aucun cas de borréliose de Lyme en 2005.

Au total, 18 médecins ont déclaré 44 cas. Toutefois, en tenant compte strictement des critères de l'EUCALB, nous n'avons retenu que 35 cas certains parmi ces 44 cas déclarés.
Parmi les cas non retenus, figuraient essentiellement des cas suspects de neuroborréliose, mais pour lesquels manquait la confirmation par l'examen du LCR. Deux cas associaient asthénie et syndrome fébrile, pour lesquels la sérologie positive ne reflétait que la séroprévalence.

Si on considère que 62 médecins ont participé à la déclaration de 35 cas, l'incidence des cas certains de borréliose de Lyme dans le département de la Meuse en 2005 peut donc être estimée à 106/100 000 habitants (intervalle de confiance à 95 %: 55-157).

L'incidence a donc diminué par rapport à l'année précédente où elle avait été estimée à 156/100 000 hab., mais elle reste supérieure à l'incidence estimée en 2002 et 2003, respectivement de 79 et 84 cas /100 000 hab. Cette diminution va de pair avec la diminution du nombre des nymphes collectées en 2005 par rapport à 2004 (cf. chapitre vecteur). Comme on l'a observé dans le Puy-de-Dôme, la diminution de la densité des nymphes infectées est parallèle à la diminution de l'incidence de la maladie.
Par ailleurs, comme les années précédentes une majorité des médecins participants signalent un nombre de consultations annuelles pour piqûre de tique allant en moyenne de 10 à 20.

Les caractéristiques cliniques des 35 cas certains figurent sur le tableau A4. Seules des manifestations cutanées ont été déclarées cette année. Parmi les 33 cas d'EM, 85 % étaient isolés, les autres s'accompagnaient d'asthénie et de manifestations algiques. Dans 16 cas, la taille de l'EM était précisée, entre 5-10 cm dans 3 cas, entre 10-15 cm dans 8 cas et > 15 cm dans 5 cas.
Parmi les 2 cas d'ACA, un était accompagné de myalgies et d'asthénie.
Aucune manifestation neurologique n'a été retenue parmi les cas certains. En effet, cette année encore, nous n'avons considéré que comme probables deux cas de possible neuroborréliose pour lesquels manquait l'examen du LCR.

Tableau A4. Caractéristiques cliniques des 36 cas certains de borréliose de Lyme rapportés dans le département de la Meuse.

| Paramètres | Cas certains (n = 35) |
|---|---|
| Age (sur n = 31) | 14-85 |
| Moyenne ± SD | 56 ±15.5 |
| Sex ratio | |
| Femme | 17 |
| Homme | 17 |
| Non précisé | 1 |
| Signes cutanés | |
| EM seul | 28 |
| EM avec signes d'accompagnement | 5 |
| ACA | 2 |

Les caractéristiques épidémiologiques des cas certains figurent sur le tableau A5. La très grande majorité des patients signalent des antécédents de piqûre de tiques et une piqûre précédant l'épisode clinique actuel. Les piqûres siègent le plus souvent au niveau des membres inférieurs.
Ici encore la durée d'attachement est rarement précisée.
Si une majorité des diagnostics est portée pendant la période estivale, on observe cependant un étalement assez inhabituel tout au long de l'année (Fig. A2).

Tableau A5. Caractéristiques épidémiologiques des 35 cas certains de borréliose de Lyme rapportés en 2005 dans le département de la Meuse.

| | |
|---|---|
| Facteurs de risque | |
| oui | 34 |
| non | 0 |
| Non précisé | 1 |
| Antécédents de piqûre de tique | |
| oui | 19 |
| non | 12 |
| Non précisé | 4 |
| Piqûre précédant l'épisode actuel | |
| oui | 25 |
| non | 9 |
| Non précisé | 1 |
| Siège de la piqûre | |
| MI | 14 |
| Abdomen-Dos-Lombes | 6 |
| MS | 4 |
| Non précisé | 11 |
| Durée d'attachement | |
| ≤ 24 h | 3 |
| 24 h < <48 h | 3 |
| ≥ 48 h | 1 |
| Non précisé | 28 |

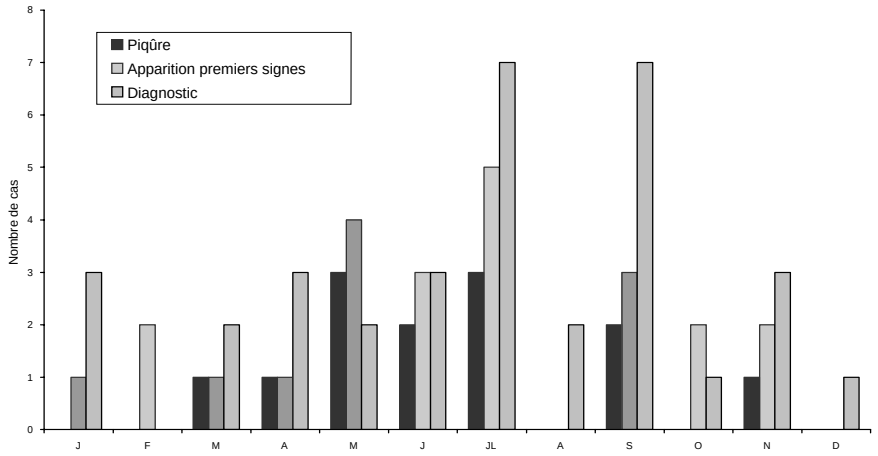


Figure A2. Répartition des cas dans la Meuse sur l'année 2005.

## A. 3. CAS DE BORRELIOSE DE LYME DIAGNOSTIQUES EN MILIEU HOSPITALIER

Les résultats de sérologie ainsi que les fiches de renseignements épidémio-cliniques nous ont été fournis par le Dr. Nadget Benhaddou, biologiste à l'hôpital Cochin à Paris, et le Dr. Brigitte Degeilh, biologiste au CHU de Rennes.

Tableau A6. Caractéristiques des cas certains de borréliose de Lyme observés en milieu hospitalier.

| Paramètres | Paris (CHU Cochin) Cas certains (n =9) | CHU Rennes Cas certains (n = 10) |
|---|---|---|
| Age | 13-69 | 26-68 |
| Moyenne ± SD | 42.9±22.8 | 51.4±11.2 |
| Sex ratio | | |
| Femme | 5 | 3 |
| Homme | 4 | 7 |
| Facteurs de risque | | |
| Oui | 9 | 9 |
| Non | | - |
| Non précisé | | 1 |
| Antécédent de piqûre de tique | | |
| Oui | 5 | 1 |
| Non | | 2 |
| Non précisé | 4 | 7 |
| Piqûre précédant l'épisode actuel | | |
| Oui | 8 | 6 |
| Non | | 2 |
| Non précisé | 1 | 2 |
| Signes Cutanés | | |
| EM isolé | | 1 |
| EM avec signes d'accompagnement | 2 | 5 |
| ACA | 1 | - |
| Signes Neurologiques | | |
| Paralysie faciale | | 1 |
| Méningoradiculite | 2 | 3 |
| Signes Rhumatologiques | | |
| Arthrite | 4 | - |

Au CHU de Cochin, 4207 demandes de sérologie de Lyme (3566 sérums et 641 LCR) ont permis de retenir 20 dossiers pour lesquels la sérologie était positive. Parmi ces 20 cas, 9 ont été considérés comme certains selon les critères de l'EUCALB. En effet 6 patients présentaient des manifestations cliniques évocatrices de neuroborréliose, mais pour 5 d'entre eux, nous ne disposions pas des données sérologiques du LCR et pour un sixièm patient la sérologie était négative dans le sérum et limite dans le LCR. Ces cas n'ont donc pu être considérés que comme probables. Par ailleurs, pour 4 patients ayant une sérologie positive, les manifestations cliniques signalées étaient des arthralgies. Ces cas ne correspondent pas aux critères de l'EUCALB et n'ont donc pas été retenus. Six cas ont été diagnostiqués entre juin et novembre, et pour 3 cas les premiers signes sont apparus en février et mars, il s'agissait de monoarthrite du genou dans les 3 cas. Un des 3 patients signalait avoir présenté un EM un an plus tôt.

Au CHU de Rennes, 607 sérums et 161 LCR ont fait l'objet d'une demande de sérologie de Lyme, émanant essentiellement des services de neurologie, d'ophtalmologie et d'infectiologie. Ceci a permis d'identifier 16 patients avec une sérologie positive dont 10 ont été retenus comme cas certains. Six patients présentaient un EM, accompagné de signes généraux, et d'arthralgies pour l'un d'entre eux A signaler que nous avons considéré comme cas certain un patient ayant une profession à risque et qui présentait une radiculite, survenant après un EM, et pour lequel la sérologie dans le LCR était positive en IgG, confirmée par western-blot, mais nous n'avions pas de sérologie dans le sérum. Quatre patients avaient une neuroborréliose, 3 cas de méningoradiculite dont une s'accompagnait d'une paralysie faciale et une paralysie faciale isolée. Deux patients supplémentaires ont été considérés comme des cas probables de neuroborréliose (une paralysie faciale et une méningoradiculonévrite), car il manquait l'analyse du LCR pour confirmation. Quatre cas faisaient l'objet d'une suspicion clinique de neuroborréliose, mais ont été écartés, un sur la présentation clinique (troubles isolés du comportement), les autres devant l'absence de lymphocytose et une sérologie négative dans le LCR. Les diagnostics des 10 cas certains ont été faits entre juillet et novembre et un cas en mars.

Les caractéristiques cliniques et épidémiologiques des cas certains retenus figurent sur le tableau A6. Au total, en milieu hospitalier, si on peut suspecter que les formes disséminées ont été plus nombreuses (manifestations cliniques évocatrices chez des patients ayant une sérologie positive dans le sérum), on peut cependant déplorer que, faute d'analyse du LCR, un certain nombre de formes neurologiques échappent au diagnostic.
Par ailleurs, il faut insister sur le fait que les arthralgies isolées, même en cas de sérologie de Lyme positive, ne constituent pas un critère diagnostique suffisant.pour l'inclusion de ces cas.

## A. 4. ANALYSES EFFECTUEES PAR LE LABORATOIRE PASTEUR-CERBA

Cette année encore le laboratoire Pasteur-Cerba (PC) nous a transmis l'ensemble des résultats d'analyses positives en sérologie de Lyme pour l'année 2005.

Un total de 3232 sérologies positives chez 1206 patients a été enregistré. La répartition géographique des patients ayant une sérologie positive est indiquée sur la figure A3.
La sérologie était positive dans 23 LCR prélevés chez 20 patients. Pour 10 d'entre eux, la sérologie dans le sérum était également positive, mais 10 LCR n'étaient pas accompagnés du sérum correspondant. La recherche de synthèse intrathécale n'a pu être mise en place comme prévu.

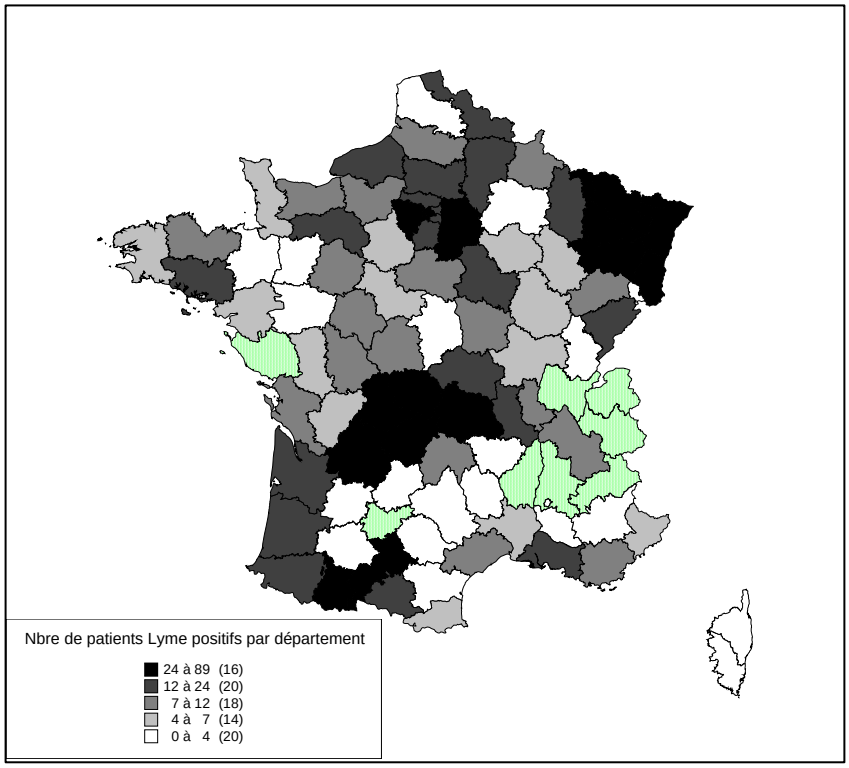


Figure A3. Répartition géographique des patients ayant eu une sérologie de Lyme positive en 2005 (données du laboratoire Pasteur-Cerba). Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de départements correspondant à la fourchette du nombre de patients

# CONCLUSION

Une surveillance prospective des cas de borréliose de Lyme a été entreprise par le CNR des *Borrelia* depuis l'année 2002, basée sur les déclarations de médecins volontaires. La Meuse a servi de département pilote avec lequel, nous avons pu suivre l'évolution de l'incidence de la maladie et la mettre en relation avec l'évolution de la densité du vecteur et son taux d'infection qui étaient suivis parallèlement (chapitre suivant). Depuis 2004 nous avons élargi la surveillance clinique à deux régions, le Limousin à l'initiative et sous la responsabilité de la CIRE-Centre et l'Auvergne sous la responsabilité du CNR.
Nous avons, pour la deuxième année de surveillance en Auvergne, obtenu un taux satisfaisant de participation des médecins, supérieur à celui de l'année précédente et variable selon les départements. Globalement ce sont les mêmes médecins qui ont accepté de poursuivre la surveillance pour la deuxième année consécutive, hormis le Cantal où de nouveaux médecins se sont ajoutés au réseau préexistant. Le Puy-de-Dôme et le Cantal ont vu le plus fort taux de participation sous l'impulsion du Pr. Beytout dans le premier et du Dr. Malaval dans le second.

Plus encore que les années précédentes, l'EM est la principale manifestation clinique observée puisqu'il représente 88 % des formes cliniques déclarées en 2005. Les autres manifestations cutanées de la maladie sont très rares, 5 cas d'ACA et seulement un cas de LBC ont été signalés. Les formes de la maladie traduisant une dissémination du pathogène ont également été très rares cette année, avec 8 cas de neuroborréliose et 11 cas d'arthrite.
Le caractère saisonnier de la borréliose de Lyme est net, même si des cas ont été diagnostiqués tout au long de l'année.

Ces caractéristiques cliniques soulèvent cependant quelques remarques. D'abord, l'EM est une manifestation dont le diagnostic est uniquement clinique, puisque la sérologie à ce stade est négative dans plus de 50 % des cas. Ce diagnostic suppose donc une bonne reconnaissance de cette manifestation par les médecins. Le diamètre de l'érythème, qui doit être > 5 cm selon la définition de cas donnée par l'EUCALB, est un paramètre qui n'était renseigné que dans 33 % des fiches reçues au CNR et signalant un EM. Il faut souligner le fait que nous avons cependant considéré comme EM les cas signalés comme tels, mais sans la notion de diamètre de la lésion érythémateuse. Dans ces conditions, il est possible que l'incidence de ce type de manifestation ait été surestimée dans ce travail.
Inversement, il est important de rappeler également que la stricte observance des critères EUCALB pour la définition des cas nous a très probablement conduit à sous-évaluer l'incidence des manifestations neurologiques. En effet, si la pratique d'une PL et donc d'un examen du LCR pour confirmer le diagnostic est difficile en cabinet médical de ville, de façon plus inattendue, l'examen du LCR est souvent négligé en milieu hospitalier devant des cas cliniquement évocateurs avec une sérologie positive dans le sérum.
Enfin, soulignons l'importance de respecter les critères de l'EUCALB, également en présence de manifestations articulaires où de simples arthralgies sont trop souvent considérées comme une manifestation de la borréliose de Lyme dès lors que la sérologie de Lyme est positive.

# B. SURVEILLANCE DU VECTEUR IXODES RICINUS

## B. 1. CHOIX DES SITES ET METHODOLOGIE UTILISEE POUR L'ETUDE DU VECTEUR

### B. 1. 1. Choix des sites et collecte des tiques

Nous avons poursuivi depuis la création du CNR des *Borrelia*, le même but, avec la même méthodologie, consistant à comparer les densités du vecteur *I. ricinus* et son taux d'infection à l'incidence humaine de la borréliose de Lyme, dans certaines régions de France. Nous avons donc poursuivi cette année l'étude clinique et écologique dans le département de la Meuse. Au cours de l'année 2004, nous avions initié une étude clinique dans la région Auvergne et commencé les collectes de tiques dans un des départements de cette région, le Puy-de-Dôme. Nous avons poursuivi cette étude en 2005 et étendu les investigations dans cette région en étudiant le vecteur dans une zone forestière de l'Allier qui avait été ponctuellement investiguée en 2002, la forêt de Tronçais.
Enfin, en raison de la surveillance clinique initiée en 2005 par la CIRE Centre dans la région Limousin, nous avons décidé d'entreprendre sur la même période une surveillance du vecteur, comme nous l'avions fait en Alsace. Ceci, dans le but d'établir une corrélation entre la densité des tiques infectées par *B. burgdorferi* sl et l'incidence de la borréliose de Lyme dans une région donnée.
La méthodologie choisie pour les collectes de tiques, sur l'ensemble des sites, est celle de l'allotissement systématique des forêts sélectionnées, comme décrite dans les précédents rapports.

### B. 1. 2. Détection des agents pathogènes

La méthodologie utilisée pour la détection et l'identification des *Borrelia* est la même que celle utilisée les années précédentes (cible espace intergénique *rrf-rrl*).
Par contre pour la détection des *Anaplasmataceae*, nous avons utilisé au cours de l'année deux stratégies successives. En mars, avril et mai, nous avons utilisé pour l'amplification, comme en 2004, des amorces non spécifiques ciblant le gène *rrs*, l'identification étant assurée secondairement par le séquençage systématique de tous les amplicons obtenus. Devant le grand nombre d'amplifications non spécifiques, à partir du mois de juin, nous avons privilégié la seule détection d'*A. phagocytophilum* et utilisé des amorces spécifiques de cette espèce.

### B. 1. 3. Analyses statistiques

Nous avons sur ce point bénéficié de la collaboration de Claire Bernède-Bauduin,, de l'Unité d'Epidémiologie et Pharmaco-Epidémiologie, INSERM U657, de l'Institut Pasteur.
Pour la surveillance, nous avons utilisé une méthode d'échantillonnage à deux niveaux, avec le site d'échantillonnage comme premier niveau et la parcelle de 10 m de long comme deuxième niveau, ces deux paramètres étant sélectionnés au hasard. La densité des tiques (d) a été estimée à partir du nombre total de tiques collectées dans chaque forêt:

$$d = \frac{1}{S}\hat{t}_y = \frac{1}{S}\frac{M}{m}\sum_{i=1}^{m}\frac{N_i}{n_i}\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} ,$$

où S est la surface de la forêt étudiée, $\hat{t}_y$ le nombre total de tiques estimé, m le nombre de sites d'échantillonnage sélectionnés, M le nombre total de sites d'échantillonnage, $n_i$ le nombre de parcelles sélectionnées dans le site d'échantillonnage i, $N_i$ le nombre total de parcelles dans le site i et $y_{ij}$ le nombre de tiques collectées dans la parcelle j du site i.
Pour comparer la distribution des tiques collectées entre les différents sites et saisons, nous avons calculé un intervalle de confiance à 95 % pour chaque collecte :

$$CI_{95\%}(\hat{t}_y) = \left[\hat{t}_y - 1{,}96.\sqrt{\hat{V}(\hat{t}_y)}; \hat{t}_y + 1{,}96.\sqrt{\hat{V}(\hat{t}_y)}\right]$$

où: $$\hat{V}(\hat{t}_y) = M^2 \frac{M-m}{Mm} \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^{m} \left( \frac{\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}}{\frac{n_i}{N_i}} - \frac{\hat{t}_y}{M} \right)^2 + \frac{M}{m} \sum_{i=1}^{m} N_i^2 \frac{N_i - n_i}{n_i N_i} \sum_{j=1}^{n_i} \frac{1}{n_i - 1} \left( y_{ij} - \frac{\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}}{n_i} \right)^2$$

L'intervalle de confiance à 95 % pour la densité des tiques d est obtenu en divisant les limites du précédent intervalle par la surface S.
Une analyse de variance à deux facteurs, incluant le collecteur et le site d'échantillonnage comme principaux paramètres et l'interaction des deux variables, a été effectuée pour chaque collecte afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'influence du collecteur sur les résultats.
Le test du $\chi^2$ a été utilisé pour juger de la significativité des différences observées dans les taux d'infection des tiques selon les stades des tiques, selon les sites et les saisons. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.
Le coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé pour établir les corrélations entre la densité de tiques et la densité de tiques infectées et entre la densité des tiques et leur taux d'infection.

## B. 2. ETUDE MENEE DANS LA REGION LIMOUSIN

Nous avons démarré en 2005 l'étude écologique sur deux départements du Limousin, la Creuse et la Haute-Vienne. Les tiques ont été collectées dans 4 parcelles de la Creuse et 3 parcelles de la Haute-vienne dont les coordonnées sont fournies sur les tableaux B1 et B2.

Tableau B1. Parcelles étudiées dans le département de la Creuse en 2005

| **Creuse** | Parcelle CR2 | Parcelle CR6 | Parcelle CR9 | Parcelle CR10 |
|---|---|---|---|---|
| Fuseau | 31 | 31 | 31 | 31 |
| Zone | T | T | T | T |
| Longitude | 0402600 | 0410600 | 0404210 | 0410400 |
| Latitude | 5121000 | 5112450 | 5119431 | 5111550 |
| Altitude (m) | 537 | 522 | 534 | 631 |
| Végétation | chênes<br>châtaigniers<br>hêtres bouleaux | pins<br>chênes<br>fougère | châtaigniers<br>hêtres<br>ronces | sapins<br>hêtres<br>fougère, ronces |

Tableau B2. Parcelles étudiées dans le département de la Haute-Vienne en 2005

| **Haute -Vienne** | Parcelle HV1 | Parcelle HV2 | Parcelle HV8 |
|---|---|---|---|
| Fuseau | 31 | 31 | 31 |
| Zone | T | T | T |
| Longitude | 0367300 | 0367862 | 0377302 |
| Latitude | 5098900 | 5096350 | 5095082 |
| Altitude (m) | 365 | 393 | 615 |
| Végétation | Chênes<br>sapins<br>bouleaux<br>ronces | Châtaigniers<br>sapins | Chênes<br>hêtres<br>ronces |

### B. 2. 1. Densité d'*I. ricinus*

L'évolution des populations de tiques au cours de l'année 2005 est très parallèle dans les deux départements (tableaux B3 et B4). La densité des nymphes est toutefois plus élevée dans la Creuse, mais en raison d'un très grand intervalle de confiance, particulièrement en mai et juin dans la Haute-Vienne, la différence entre les deux départements n'est pas significative (hormis en octobre). Ce large intervalle n'est pas dû à un effet collecteur, mais à une très grande disparité entre le nombre de tiques collectées d'un tirage à l'autre au sein d'une même parcelle.
Dans les deux départements, le pic d'activité des nymphes se situe en mai-juin, et l'activité diminue en juillet dans les deux départements, mais beaucoup plus brutalement dans la Haute-Vienne.
Si on compare avec les densités de nymphes et d'adultes que nous avions enregistrées en Alsace les années précédentes, on constate que la densité d'*I. ricinus* est environ deux fois moindre dans le Limousin.

Tableau B3. Densité des tiques *I. ricinus* observée dans la Creuse en 2005 (N : nombre d'individus collectés. IC : intervalle de confiance).

| Creuse | Mars | Avril | Mai | Juin | Juil | Août | Sep | Oct | Nov | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes(N)** | 416 | 739 | 1246 | 1496 | 764 | 540 | 476 | 335 | 23 | 6035 |
| Dens/100 $m^2$ | 65 | 115 | 195 | 234 | 119 | 84 | 74 | 52 | 4 | 105 |
| IC | [10-120] | [86-144] | [137-252] | [147-321] | [40-199] | [54-115] | {53-96] | [40-64] | [1-6] | |
| **Adultes (N)** | 64 | 80 | 153 | 88 | 55 | 20 | 49 | 31 | 0 | 540 |
| Dens/100 $m^2$ | 10 | 12 | 24 | 14 | 9 | 3 | 8 | 5 | | 9 |
| IC | [1-19] | [5-20] | [5-43] | [5-23] | [6-11] | [2-4] | [3-12] | [2-7] | | |

Tableau B4. Densité des tiques *I. ricinus* observée dans la Haute-Vienne en 2005.

| Haute-Vienne | Mars | Avril | Mai | Juin | Juil | Août | Sep | Oct | Nov | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes(N)** | 89 | 255 | 903 | 848 | 174 | 200 | 163 | 74 | 29 | 2735 |
| Dens/100 $m^2$ | 28 | 53 | 188 | 177 | 36 | 42 | 34 | 15 | 6 | 64 |
| IC | [0-79] | [0-106] | [0-377] | [14-339] | [1-72] | [5-79] | [5-63] | [2-29] | [0-14] | |
| **Adultes (N)** | 7 | 18 | 76 | 73 | 7 | 4 | 13 | 5 | 0 | 203 |
| Dens/100 $m^2$ | 2 | 4 | 16 | 15 | 1 | 1 | 3 | 1 | | 5 |
| IC | [0-4] | [0-7] | [0-34] | [10-20] | [0-3] | [0-2] | [2-3] | [0-2] | | |

### B. 2. 2. Taux d'infection des tiques par *B. burgdorferi* sensu lato

Tableau B5. Taux d'infection des tiques par *B. b* sl dans la Creuse (Nombre d'individus positifs/Nombre d'individus testés et taux d'infection)

| Creuse | Mars | Avril | Mai | Juin | Juil | Août | Sep | Oct | Nov | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes** | 18/87<br>21 % | 11/81<br>14 % | 7/80<br>9 % | 5/80<br>6 % | 12/80<br>15 % | 7/80<br>9 % | 10/117<br>9 % | 12/90<br>13 % | 4/22<br>18 % | 86/717<br>12 % |
| **Adultes** | 12/64<br>19 % | 16/73<br>22 % | 17/86<br>20 % | 3/72<br>4 % | 12/54<br>22 % | 3/18<br>17 % | 5/49<br>10 % | 5/31<br>16 % | 0 | 73/447<br>16 % |

Globalement sur l'année, 12 % des nymphes sont infectées par *B. burgdorferi* sl aussi bien dans la Creuse (Tableau B5), que dans la Haute-Vienne (Tableau B6). Par contre les adultes sont plus infectées dans la Haute-Vienne. Il semble que la différence soit en rapport avec une plus grande prévalence d'infection des femelles dans ce département ($P$=0.012) (Tableau B7). Sur l'ensemble des deux sites, il n'y a cependant aucune différence significative entre les taux d'infection des mâles et des femelles (18 %).

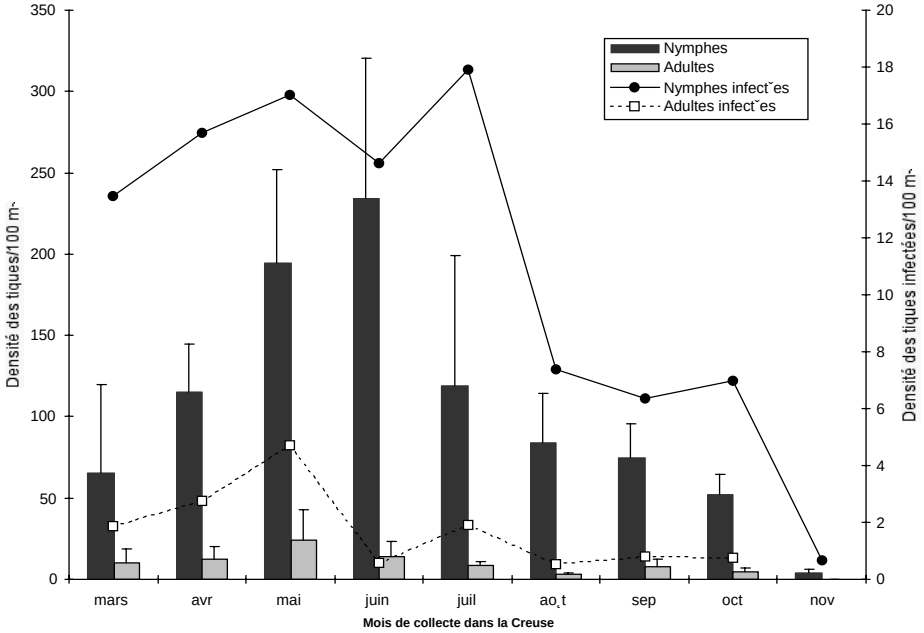


Figure B1. Densité des tiques et densité des tiques infectées dans le département de la Creuse en 2005.

D'importantes fluctuations mensuelles sont observées dans les taux d'infection des tiques, aussi bien dans la Creuse que dans la Haute-Vienne. Il semble cependant vraisemblable que ces fluctuations soient davantage liées à une distribution aléatoire de l'infection dans les séries de tiques analysées qu'à de réelles variations mensuelles des taux d'infection. Les très faibles taux d'infection des nymphes observé en avril dans la Haute-Vienne et des adultes en juin dans la Creuse restent inexpliqués et concourent vraisemblablement à une sous-estimation des taux moyens d'infection sur l'année. Si on rapporte le taux d'infection à la densité des tiques, on obtient une densité de nymphes infectées qui culmine à 18/100 $m^2$ dans la Creuse (Fig. B1) et à 28 /100 $m^2$ en Haute-Vienne (Fig. B2). Si on considère que cette valeur de densité des nymphes infectées reflète le risque de contamination pour l'homme, on peut estimer que, dans la Haute-Vienne, le risque est surtout important pendant les mois de mai et juin, alors qu'il est plus étalé dans le temps, de mars à juillet, dans la Creuse. Il sera intéressant de voir si les données d'incidence clinique recensées par la CIRE sont corrélées avec ces données écologiques.

Tableau B6. Taux d'infection des tiques par *B. b* sl dans la Haute-Vienne (Nombre d'individus positifs/Nombre d'individus testés et taux d'infection)

| Haute-Vienne | Mars | Avril | Mai | Juin | Juil | Août | Sep | Oct | Nov | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes** | 5/40<br>12 % | 2/60<br>3 % | 9/60<br>15 % | 6/60<br>10 % | 13/60<br>22 % | 10/60<br>17 % | 8/60<br>13 % | 3/56<br>5 % | 4/27<br>15 % | 60/483<br>12 % |
| **Adultes** | 2/6<br>33 % | 3/18<br>17 % | 13/55<br>24 % | 14/68<br>21 % | 1/7<br>14 % | 0/4 | 3/13<br>23 % | 3/5<br>60 % | 0 | 39/176<br>22 % |

Tableau B7. Répartition des taux d'infection selon le sexe (Nombre d'individus infectés/Nombre total d'individus étudiés. Pourcentage de positifs)

| Tiques adultes infectées | Creuse | Haute-Vienne | **Total** |
|---|---|---|---|
| **Mâles** | 46/257<br>18 % | 16/90<br>18 % | 62/347<br>18 % |
| **Femelles** | 27/190<br>14 % | 23/86<br>27 % | 50/276<br>18 % |

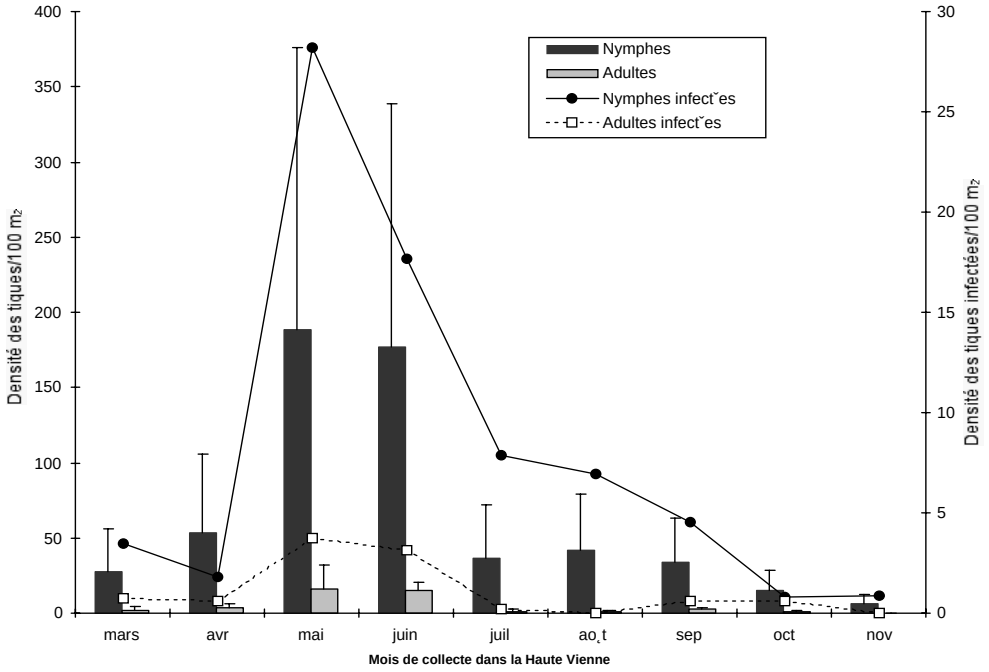


Figure B2. Densité des tiques et densité des tiques infectées dans le département de la Haute-Vienne en 2005.

### B. 2. 3. Influence des conditions météorologiques sur la densité des tiques infectées.

Nous avons obtenu auprès de Météo France, les valeurs quotidiennes de température, d'hygrométrie et de pluviométrie relevées durant les années 2004 et 2005 dans les stations météo de Guéret pour la Creuse et de Nantiat pour la Haute-Vienne, situées à proximité des sites étudiés (Fig. B3 A et B4). L'analyse de ces paramètres ne nous permet malheureusement pas dans un intervalle de temps aussi étroit d'établir des liens avec les densités de tiques.

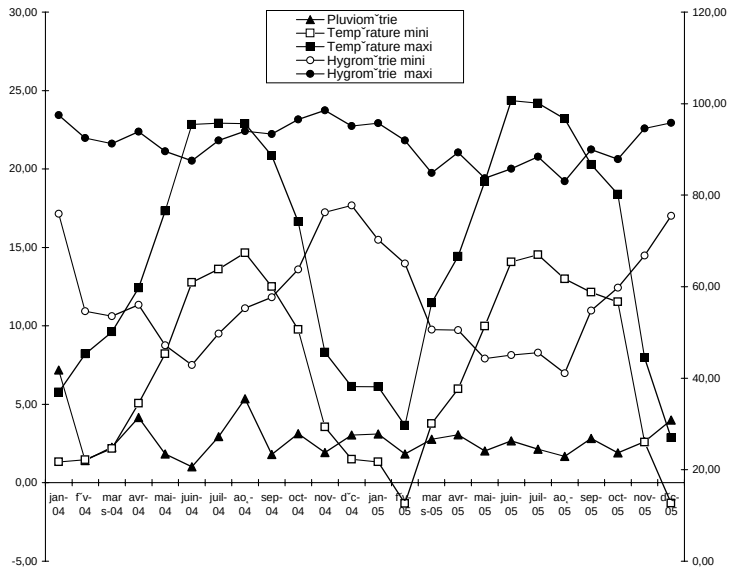


Figure B3. Paramètres météo enregistrés dans la Creuse en 2005

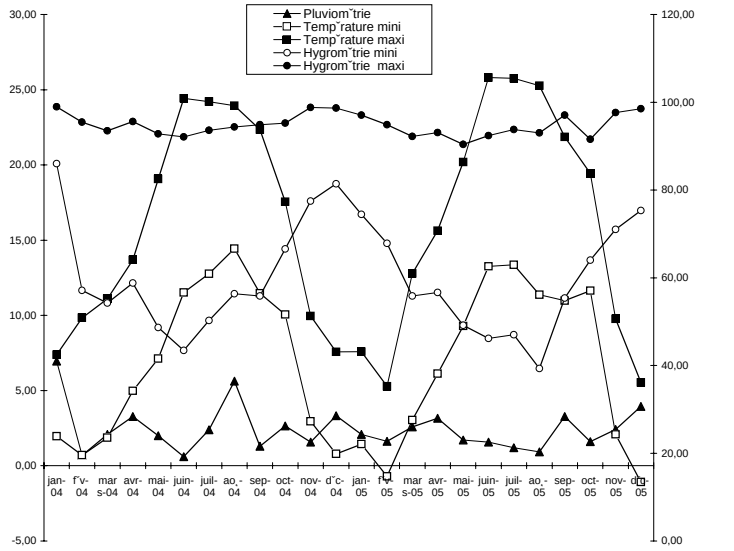


Figure B4. Paramètres météo enregistrés dans la Haute-Vienne en 2005

### B. 2. 4. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques

On observe en Limousin, comme cela avait été le cas en Alsace, une répartition différente des espèces de *B. burgdorferi* sl selon les stades du développement des tiques (Fig. B8). Toutefois, ici, les données varient entre les deux départements. Si on constate que *B. garinii* prédomine chez les adultes dans les deux départements, *B. afzelii* n'est pas l'espèce prédominante chez les nymphes dans la Haute-Vienne, où elle ne concerne que 10 % des nymphes infectées, alors que dans la Creuse elle concerne 53 % des nymphes infectées. Dans la Haute-Vienne ce sont donc *B. garinii* et *B. valaisiana* qui infectent majoritairement les nymphes. *Bb* ss est toujours rare tant chez les nymphes que chez les adultes. A noter que *B. spielmanii* infectait 3 nymphes collectées dans la Creuse.
Les coinfections les plus fréquemment retrouvées associent *B. garinii* et *B. valaisiana* (15/20) puis *B. afzelii* et *Bb* ss (2/20).

Nous n'avons pas observé de différence mensuelle dans la répartition des espèces de *Borrelia*, chacune étant identifiée dans les mêmes proportions chaque mois de l'étude.

### B. 2. 5. Taux d'infection des tiques par les membres de la famille des *Anaplasmataceae*

Sur les tiques collectées aux mois de mars, avril et mai, nous avons recherché l'ensemble des *Anaplasmataceae* en utilisant les amorces Ehr521 et Ehr747. Sur les 563 tiques analysées, 70 ont donné un signal PCR et les produits obtenus ont été séquencés. Quarante-huit séquences correspondaient à de l'ADN de *Rickettsia*, 14 à de l'ADN de *Wolbachia* et 8 à de l'ADN d'*A. phagocytophilum*. Aucune *Ehrlichia* n'a ainsi été détectée.
Pendant les mois suivants, seule *A. phagocytophilum* a été recherchée. Au total, sur l'année, sur 1574 tiques analysées, 0.7 % des nymphes (8/1200) et 3.2 % des adultes (12/374) étaient infectées par ce pathogène (Tableau B8). Ces taux, bien que faibles, sont supérieurs à ce qui avait été observé en Alsace.
La prévalence paraît stable tout au long de l'année bien que les variations soient difficiles à analyser du fait du petit nombre de tiques infectées.

Tableau B8. Taux d'infection des tiques *I. ricinus* par *Anaplasma phagocytophilum* dans les 2 départements du Limousin étudiés (Nombre d'individus positifs/Nombre d'individus testés)

| ***A. phago*** | Mars | Avril | Mai | Juin | Juil | Août | Sep | Oct | Nov | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Creuse** | 2/114 | 0/121 | 5/120 | 3/120 | 0/119 | 1/98 | 1/149 | 3/121 | 0/22 | 15/984<br>1.5 % |
| **Haute-Vienne** | 0/46 | 0/78 | 1/84 | 0/90 | 0/67 | 2/64 | 1/73 | 1/61 | 0/27 | 5/590<br>0.8 % |

## Conclusion

Au total on peut estimer que le risque de contracter une borréliose de Lyme est de 4 à 5 fois moins grand dans les sites étudiés dans la région Limousin qu'il ne l'était en Alsace, où le pic de densité des tiques infectées était supérieur à 100/100 $m^2$.
La prévalence d'infection des tiques par *A. phagocytophilum* est faible chez les nymphes surtout, le risque de contamination pour l'homme est donc peu important.

## B. 3. ETUDE MENEE DANS LA REGION AUVERGNE

Dans cette région, nous avons étudié des sites situés dans deux départements, le Puy-de-Dôme et l'Allier.
Cette année encore, nous avons bénéficié dans le Puy de Dôme, de l'aide particulièrement efficace de Madame Martine Beytout pour la collecte des tiques. Les collectes ont été menées dans les trois mêmes parcelles qu'en 2004 (CF1, CF2 et CF3).
Dans l'Allier, nous avons collecté dans deux parcelles sélectionnées dans la forêt de Tronçais (Tableau B9). Cette forêt avait déjà été investiguée en 2002 où une collecte avait été effectuée sur 16 parcelles en avril 2002. Nous avons décidé de prolonger cette étude par une collecte mensuelle qui a été menée cette année sur deux de ces 16 parcelles.

Tableau B9. Parcelles étudiées dans la forêt de Tronçais (Allier) en 2005

| **Tronçais** | Parcelle L1 | Parcelle M4 |
|---|---|---|
| Fuseau | 31 | 31 |
| Zone | T | T |
| Longitude | 0479650 | 0483050 |
| Latitude | 5169300 | 5167850 |
| Altitude | 227 | 238 |
| Végétation | Forêt de chênes | Chênes, sapins, fougère |

### B. 3. 1. Densité d'*I. ricinus*

**Dans le Puy de Dôme**, comme il apparaît sur le tableau B10, le pic de densité aussi bien des nymphes que des adultes est retardé cette année, puisqu'il se situe entre juillet et septembre.
Mais, cette année, la densité des nymphes est considérablement plus faible qu'en 2004, avec un pic en septembre de 24 nymphes/100 m2, alors que le pic en juin 2004 était à 72 nymphes/100 m2.

Tableau B10. Densité des tiques *I. ricinus* observée dans les 3 parcelles du Puy-de-Dôme en 2005

| Puy-de-Dôme | Collecte du 11/04 | Collecte du 10/05 | Collecte du 15/06 | Collecte du 11/07 | Collecte du 15/09 | Collecte du 11/10 | Collecte du 17/11 | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes (N)** | 10 | 111 | 78 | 106 | 116 | 58 | 2 | 481 |
| Densité/100 $m^2$ | 2 | 23 | 16 | 22 | 24 | 12 | 0.6 | 14 |
| IC | [0-4] | [3-43] | [0-39] | [16-28] | [4-44] | [4-20] | [0-1] | |
| **Adultes (N)** | 11 | 153 | 47 | 73 | 69 | 31 | 3 | 387 |
| Densité/100 $m^2$ | 2 | 32 | 10 | 15 | 14 | 6 | 0.4 | 11 |
| IC | [0-5] | [9-54] | [5-14] | [12-18] | [4-25] | [4-9] | [0-1] | |

Contrairement à ce que nous avions remarqué en 2004, si la répartition des tiques est toujours très irrégulière sur les 3 parcelles étudiées, la plus forte densité ne se retrouve pas systématiquement sur la parcelle CF2. Lors de deux collectes, en juin et septembre, la densité est significativement plus élevée sur la parcelle CF3. Par contre, comme en 2004, les adultes sont généralement plus nombreux sur la parcelle CF1, même si la différence n'est pas toujours significative.
Le fait très marquant cette année est la diminution considérable du nombre des nymphes contrastant avec l'augmentation du nombre des adultes collectés dans le Puy de Dôme. Si on compare aux valeurs obtenues en 2004 sur le même nombre de mois de collecte, la densité moyenne des nymphes passe de 36.7 à 14.7/100 $m^2$, quand la densité moyenne des adultes passe de 8.8 à 12.3/100 $m^2$.

**Dans l'Allier**, plus précisément dans la forêt de Tronçais, les densités constatées diffèrent considérablement. La densité des nymphes y est importante et comparable à celle observée dans la Creuse en 2005, mais les tiques apparaissent plus tôt et sont surtout présentes sur les 4 premiers mois étudiés. On observe une chute brutale de la densité à partir de juillet, même si l'on constate un léger rebond en novembre. Par contre la densité des adultes est particulièrement faible (tableau B11).

Tableau B11. Densité des tiques *I. ricinus* observée dans les 2 parcelles de l'Allier en 2005

| Tronçais | Mars | Avril | Mai | Juin | Juil | Août | Sep | Oct | Nov | Dec | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes(N)** | 276 | 215 | 286 | 361 | 126 | 30 | 57 | 50 | 84 | 25 | 1510 |
| Dens/100 $m^2$ | 86 | 67 | 89 | 113 | 40 | 10 | 18 | 16 | 26 | 8 | 47 |
| IC | [19-154] | [30-105] | [31-148] | [80-145] | [28-50] | [9-9] | [0-37] | [3-28] | [25-127] | [3-12] | |
| **Adultes (N)** | 8 | 15 | 15 | 23 | 4 | 3 | 6 | 0 | 2 | 1 | 77 |
| Dens/100 $m^2$ | 2 | 5 | 5 | 7 | 1 | 1 | 2 | | 0.6 | 0.3 | 2 |
| IC | [1-4] | [3-6] | [2-8] | [3-11] | [0-4] | [0-2] | [1-3] | | [0-2] | [0-1] | |

Il est par ailleurs intéressant de noter que, lors de collecte ponctuelle qui avait été réalisée en avril 2002 dans ces deux mêmes parcelles, la densité des nymphes était de 69/100 $m^2$ et celle des adultes de 2 /100 $m^2$, témoignant d'une remarquable constance des taux observés.

### B. 3. 2. Taux d'infection des tiques par *B. burgdorferi* sensu lato

Un total de 618 tiques, collectées dans le Puy de Dôme, ont été examinées pour la présence de *B. burgdorferi* sl, 163 par culture, et 455 par PCR directe sur des extraits d'ADN de tiques.

Tableau B12. Taux d'infection des tiques par *B. b* sl dans le Puy-de-Dôme en 2005 (Nombre d'individus positifs/Nombre d'individus testés et taux d'infection)

| Puy-de-Dôme | Collecte 11/04 | Collecte 10/05 | Collecte 15/06 | Collecte 11/07 | Collecte 15/09 | Collecte 11/10 | Collecte 17/11 | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes** | 4/10<br>40 % | 8/49<br>16 % | 10/39<br>26 % | 9/60<br>15 % | 13/60<br>22 % | 10/52<br>19 % | 1/3 | 55/273<br>20 % |
| **Adultes** | 3/11<br>27 % | 24/89<br>27 % | 21/59<br>36 % | 22/78<br>28 % | 19/75<br>25 % | 12/31<br>39 % | 1/2 | 102/345<br>30 % |

Globalement, 25.4 % des tiques étaient infectées. Aucune variation mensuelle nette n'est observée dans les taux d'infection (Tableau B12). Les femelles étaient significativement plus infectées (61/177, 34 %) que les mâles (41/168, 24 %) ($P$=0.041).
L'allure des courbes de densités de tiques infectées diffère par rapport à 2004 et est tout à fait inhabituelle. En effet, on observe une inversion des courbes, avec une courbe des adultes infectées qui se situe au-dessus de celle des nymphes, sauf sur les 3 derniers mois de collecte, où les courbes sont superposées (Fig. B4). Ceci est dû autant à la diminution de la densité des nymphes qu'à l'augmentation de celle des adultes, puisque les taux d'infection quant à eux, varient peu par rapport à l'année précédente.

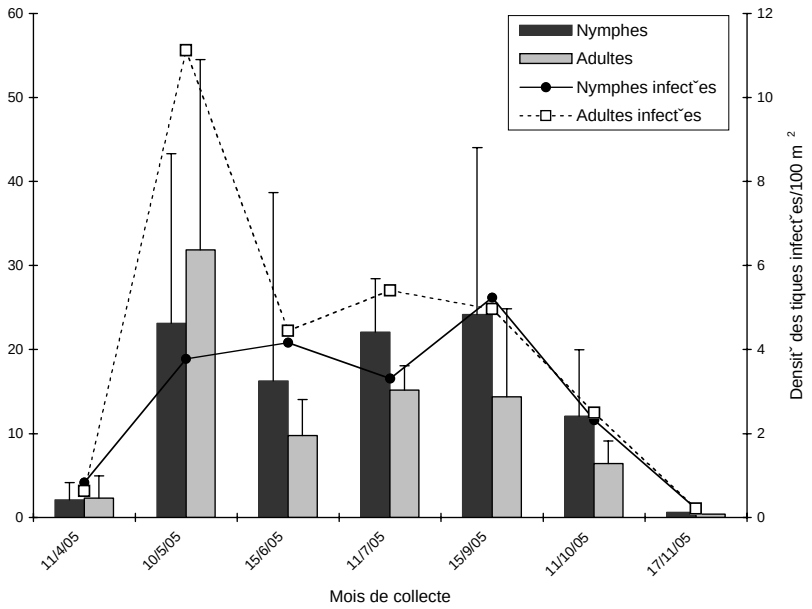


Figure B4. Densité des tiques *I. ricinus* et densité des tiques infectées dans le Puy-de-Dôme en 2005

**Dans la forêt de Tronçais**, les taux d'infection, comme les densités, diffèrent totalement des données du Puy de Dôme. Globalement, les taux d'infection des nymphes et des adultes sont équivalents et faibles (Tableau B13), Toutefois, si le taux d'infection des nymphes est quasi constant tout au long de l'année, les variations importantes observées chez les adultes sont essentiellement dues à la petite taille de l'échantillonnage. L'infection est également répartie entre les mâles (4/39, 10 %) et les femelles (4/45, 9 %).
En effet, compte tenu de la très faible densité des adultes, la densité des adultes infectées (Fig. B5) est parmi les plus faibles enregistrées sur l'ensemble des régions étudiées. Par contre, en raison du faible taux d'infection, et en dépit de la forte densité des nymphes, la densité des nymphes infectées reste à un faible niveau, en dessous des taux observés en Haute-Vienne par exemple. L'évolution de cette densité est cependant tout à fait comparable à celle de ce département. La densité des nymphes infectées est parallèle à la densité des tiques, avec un pic au mois de juin, suivi d'une très nette diminution (Fig. B5). Le risque de contamination pour l'homme diminue fortement en juillet et devient très faible dès le mois d'août.

Tableau B13. Taux d'infection des tiques par *B. b* sl dans la forêt de Tronçais (Allier) en 2005 (Nombre d'individus positifs/Nombre d'individus testés et taux d'infection).

| Tronçais | Mars | Avril | Mai | Juin | Juil | Août | Sep | Oct | Nov | Dec | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes** | 4/48<br>8 % | 2/40<br>5 % | 4/40<br>10 % | 5/40<br>12 % | 6/40<br>15 % | 4/28<br>14 % | 3/33<br>9 % | 4/32<br>12 % | 2/40<br>5 % | 2/25<br>8 % | 36/366<br>10 % |
| **Adultes** | 3/8<br>37 % | 3/24<br>12 % | 0/15 | 1/21<br>5 % | 0/4 | 1/3 | 0/6 | 0 | 0/2 | 0/1 | 8/84<br>9 % |

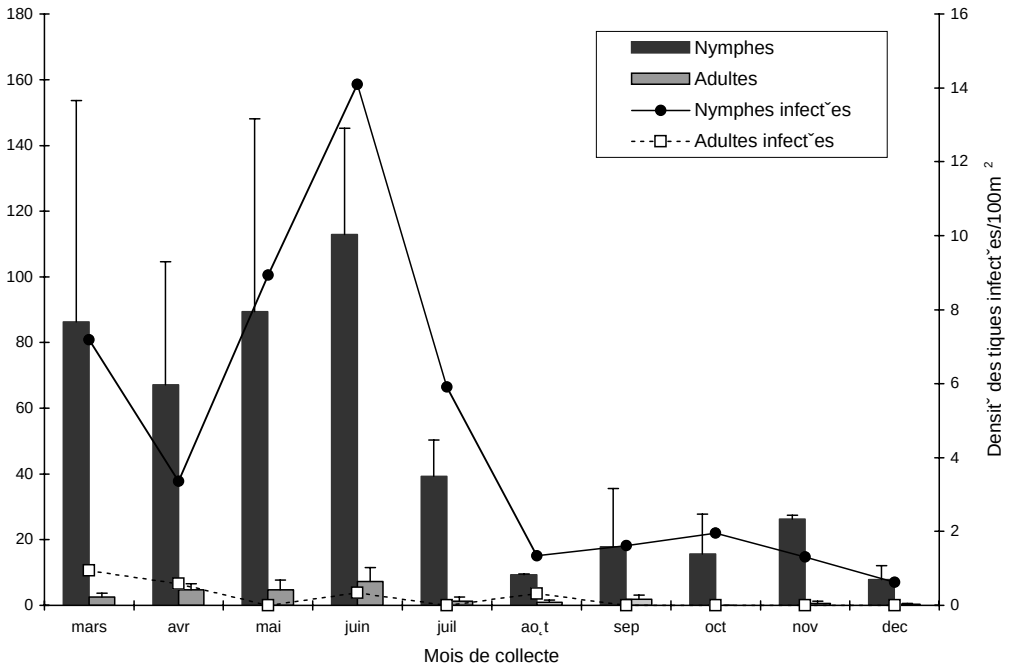


Figure B5. Densité des tiques *I. ricinus* et densité des tiques infectées dans la forêt de Tronçais en 2005

### B. 3. 3. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques

On ne retrouve pas dans le Puy-de-Dôme (Fig. B8) la répartition des espèces de *B. burgdorferi* sl selon le stade des tiques comme cela avait été observé en Alsace. Ainsi, si *B. afzelii* prédomine très nettement chez les nymphes (39/55, 71 %), elle est aussi très présente chez les adultes (35/102, 34 %). *B. garinii* infecte les adultes dans 24 % des cas (25/102) et *B. valaisiana* dans 19 % des cas (19/102). *B. burgdorferi* ss infecte 5 % des nymphes et 9 % des adultes. A noter la présence d'une souche variante de *B. burgdorferi* ss (cf chapitre "Expertise") dans une tique adulte et de *B. spielmanii* dans 3 tiques. Douze adultes et 3 nymphes contenaient deux espèces différentes. Dans 9 cas, il s'agissait de *B. garinii* et *B. valaisiana* et, dans 6 cas de *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss.

A Tronçais (Fig. B8), si c'est bien *B. afzelii* qui est prédominante chez les nymphes (19/36, 53 %), il faut souligner la prévalence importante de *B. spielmanii* qui infecte 22 % des nymphes (8/36). *B. valaisiana, B. garinii* et *B. lusitaniae* viennent ensuite, chacune responsable de 11 % (4/36), 8 % (3/36) et 5 % (2/36) des infections. Quant aux 8 tiques adultes infectées, 3 l'étaient par *B. lusitaniae,* 3 par *B. afzelii* et 2 par *B. garinii.* A l'exception de *B. burgdorferi* ss, toutes les espèces européennes de *B. burgdorferi* sl sont donc présentes sur ce site, y compris les espèces très rares ailleurs en France comme *B. lusitaniae* et *B. spielmanii*.

### B. 3. 4. Taux d'infection des tiques par les membres de la famille des *Anaplasmataceae*

Le taux d'infection des tiques collectées dans le Puy-de-Dôme est extrêmement faible. En effet, sur 455 tiques étudiées pour la présence d'ADN d'*Anaplasmataceae*, 273 nymphes et 182 adultes, seulement 1 nymphe et 1 adulte étaient infectées par *A. phagocytophilum*. A signaler que ces deux tiques étaient infectées conjointement par *B. afzelii* et *A. phagocytophilum*.

A Tronçais, 447 tiques ont été analysées, 366 nymphes et 81 adultes. Globalement, 4.9 % de ces tiques étaient infectées par *A. phagocytophilum,* 4.6 % des nymphes (17/366) et 6.2 % des adultes (5/81). Pendant les mois de mars, avril et mai, la détection de ces bactéries a été faite en utilisant les amorces non spécifiques. Le séquençage des produits amplifiés nous a permis d'identifier, à côté de 13 *A. phagocytophilum,* 8 *Wolbachia* sp, 3 *Ehrlichia* sp. et 7 *Rickettsia*.

Il est intéressant de noter que le seul polymorphisme observé au niveau des séquences *rrs* d'*Anaplasma* concernait des souches identifiées à partir de tiques collectée dans ce site de Tronçais (cf. chap. Expertises).
Tant au niveau des densités de tiques, de leur répartition selon les stades, qu'au niveau des bactéries infectant ces tiques, les deux sites sélectionnés dans la forêt de Tronçais nous fournissent des données tout à fait particulières et différentes des autres régions étudiées aussi bien les régions voisines du centre de la France, que les régions plus lointaines comme l'Alsace. Il serait très intéressant d'en explorer les raisons (notamment au niveau de la faune) et les conséquences, en terme d'incidence de la maladie dans cette région. D'autant que les données partielles obtenues en 2002 sur 39 nymphes montraient 10 % d'infection par *B. burgdorferi* sl et 5 % d'infection par *A. phagocytophilum,* ce qui suggère une certaine stabilité des conditions écologiques.

**B. 3. 5. Influence des conditions météorologiques sur la densité des tiques infectées.**

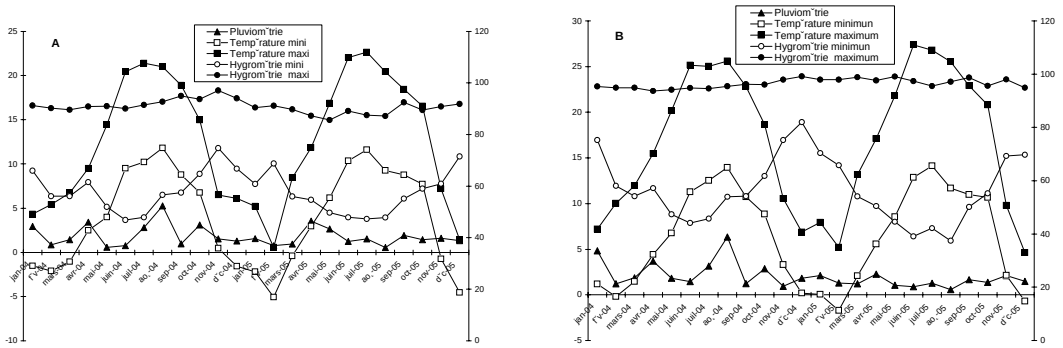


Figure B6. Paramètres météo enregistrés dans le Puy-de-Dôme (A) et dans l'Allier à Tronçais (B) en 2004-2005.

L'analyse des paramètres météorologiques enregistrés dans les deux sites de l'Auvergne (Fig. B6) montre un parallélisme frappant entre les données de Tronçais et celles vues plus hauts dans la Creuse et la Haute-Vienne, la pluviométrie semblant cependant plus basse à Tronçais en 2005. Ces données ne permettent donc pas d'expliquer les différences importantes dans les densités de tiques et surtout dans les taux et la nature de l'infection des tiques observées à Tronçais. Par contre, en accord avec la situation plus en altitude des sites de collecte dans le Puy-de-Dôme, les niveaux de température et d'hygrométrie sont systématiquement plus bas. A part, ici aussi, une pluviométrie sensiblement plus basse en 2005, la comparaison des données météorologiques entre 2004 et 2005 ne permet pas d'expliquer les différences observées entre ces deux années.

## B. 4. ETUDE MENEE DANS LE DEPARTEMENT DE LA MEUSE

Pour la troisième année consécutive, le CNR a bénéficié de la collaboration active du Dr. J.C. Georges qui a effectué les collectes de tiques dans le département de la Meuse. Depuis 2003, les trois mêmes parcelles ont fait l'objet d'une étude continue (cf rapports précédents).

### B. 4. 1. Densité d'*I. ricinus*

Sept collectes ont été effectuées d'avril à octobre 2005. Les résultats figurent sur le tableau B14.

Tableau B14. Densité mensuelle des tiques *I. ricinus* collectées dans le département de la Meuse en 2005 (Densité/100m$^2$ et [Intervalle de confiance])

| Mois de collecte | Avril | Mai | Juin | Juillet | Août | Sept | Octobre | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nymphes (N)** | 40 | 69 | 62 | 64 | 42 | 60 | 22 | 359 |
| Dens/100 m$^2$ | 33 | 57 | 52 | 53 | 35 | 50 | 55 | 48 |
| IC | [0-96] | [15-100] | [19-84] | [18-89] | [17-53] | [0-106] | | |
| **Adultes (N)** | 19 | 59 | 47 | 40 | 19 | 7 | 13 | 204 |
| Dens/100 m$^2$ | 16 | 49 | 39 | 33 | 16 | 6 | 32 | 27 |
| IC | [0-46] | [0-123] | [11-67] | [0-69] | [0-42] | [0-13] | | |

Si, sur toute l'année les collectes ont été effectuées sur les trois parcelles, en octobre, en raison des conditions météorologiques, une seule parcelle a été étudiée, interdisant par conséquent d'établir un intervalle de confiance pour ce mois.
Deux faits marquants méritent d'être soulignés en 2005. D'abord, la densité globale des tiques (Tableau B14) a diminué en 2005 par rapport à ce qui avait été observé en 2004 et même en 2003, mais cette diminution affecte essentiellement les nymphes collectées au cours de cette année. Au contraire le nombre de tiques adultes a beaucoup augmenté au point de presque égaler celui des nymphes. Il n'y a d'ailleurs pas de différence significative entre la densité des nymphes et celle des adultes quel que soit le mois de collecte considéré. Ensuite, nous n'avons pas observé, cette année, de réel pic de densité des tiques, dont le nombre a été très voisin tout au cours de l'année. Ceci contraste également avec les observations faites l'année précédente.
A signaler une grande disparité entre les parcelles étudiées, la parcelle 2 offrant une densité de tiques plus importante que les 2 autres.

### B. 4. 2. Taux d'infection des tiques par *B. burgdorferi* sensu lato

La présence d'ADN de *Borrelia* a été recherchée sur 224 nymphes et 129 adultes (71 mâles et 58 femelles) (Tableau B15). Les variations mensuelles des taux d'infection s'échelonnent de 4 % à 15 % pour les nymphes et de 8 % à 29 % pour les adultes. La figure B7 objective les disparités mensuelles importantes observées cette année, tant chez les adultes que chez les nymphes. Le taux d'infection global en 2005 est de 12 %, identique à celui observé en 2003 et supérieur à celui de 2004 (9 %). Sur l'ensemble de l'année, 8 % des nymphes et 19 % des adultes étaient infectées. Ces taux sont donc comparables à ceux observés l'an dernier, mais, cette année, la densité des adultes infectées a été égale voir supérieure à celle des nymphes. Les femelles étaient plus infectées (13/58, 22 %) que les mâles (11/71, 15 %), sans que la différence ne soit significative. Si on considère que le principal risque pour l'homme est directement lié à la densité des nymphes infectées, on peut en déduire qu'en 2005, le risque de contamination a été moins important que les années précédentes.
Comme en 2004, il n'y a pas de corrélation entre la densité des nymphes et leur taux d'infection d'une part et la densité des nymphes infectées d'autre part.
Pour les adultes, par contre il y a une corrélation entre leur densité et la densité des adultes infectés. Ceci a d'ailleurs été observé également en 2003 et 2004.

Tableau B15. Taux d'infection des tiques dans la Meuse en 2005 (Nombre d'individus positifs/Nombre d'individus testés et taux d'infection).

| Mois de collecte | Avril | Mai | Juin | Juillet | Août | Septembre | Octobre | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Adultes** | 5/19<br>26 % | 7/29<br>24 % | 5/31<br>16 % | 4/30<br>13 % | nd | 2/7<br>29 % | 1/13<br>8 % | 24/129<br>19 % |
| **Nymphes** | 3/20<br>15 % | 2/52<br>4 % | 6/49<br>12 % | 3/47<br>6 % | nd | 2/37<br>5 % | 2/19<br>10 % | 18/224<br>8 % |

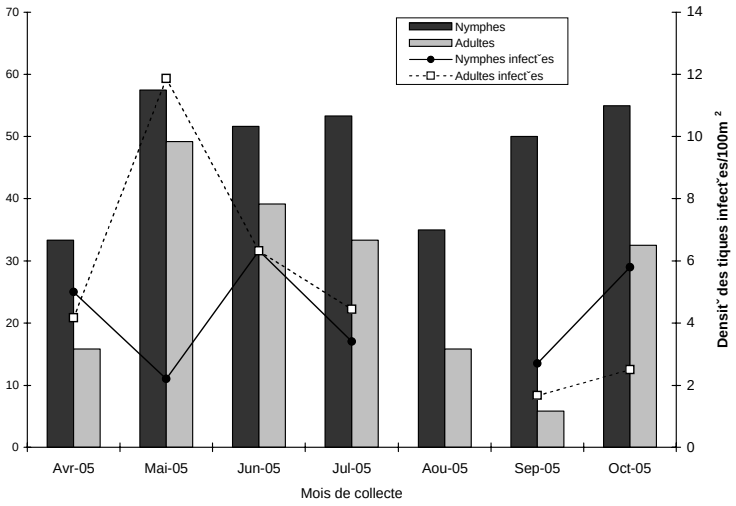


Figure B7. *I. ricinus* collectées en Meuse en 2005 : Densité des tiques et densité des tiques infectées.

### B. 4. 3. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques

En 2005, *B. afzelii* n'a été retrouvée que chez les nymphes (8/18, 44 %), celles-ci étant par ailleurs infectées par *B. garinii* dans 39 % (7/18) et dans 11 % par *B. valaisiana* (2/18) (Fig. B8). Par contre, *B. garinii* et *B. valaisiana* infectent les adultes dans respectivement 29 % et 46 % des cas. Deux tiques (une nymphe et une adulte) étaient infectées par *B. burgdorferi* ss. Une infection mixte associant *B garinii* et *B. valaisiana* a été retrouvée dans 5 tiques adultes (12 % des tiques infectées, mais 21 % des adultes infectées).
Ainsi, en raison de l'inversion du rapport densité adultes / densité nymphes, *B. garinii* et *B. valaisiana* deviennent les espèces les plus fréquemment retrouvées chez les tiques dans la Meuse.

**Au total,** la diminution de la densité des nymphes et de la densité des nymphes infectées, puisque le taux d'infection n'a pas évolué significativement, ajoutée à l'augmentation de la densité des adultes majoritairement infectés par *B. valaisiana,* permet de rendre compte d'une incidence moindre de la borréliose de Lyme observée cette année dans le département de la Meuse.

### B. 4. 4. Taux d'infection des tiques par les membres de la famille des *Anaplasmataceae*

La recherche de membres de la famille des *Anaplasmataceae* a été effectuée sur 349 extraits d'ADN de tiques collectées dans la Meuse, 220 nymphes et 129 adultes.
Sur les 116 PCR effectuées en mars, avril et mai avec les amorces Ehr521-Ehr747, 15 ont donné lieu à un signal intense (éventuellement après ré-amplification) et permis le séquençage. Seulement 2 produits de PCR (issus d'une adulte et d'une nymphe) correspondaient à de l'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum*. Par ailleurs, de l'ADN d'*Ehrlichia* sp a été identifié à partir de 2 nymphes. Par contre les séquences des autres produits d'amplification présentaient dans 6 cas une homologie avec de l'ADN de *Rickettsia* et dans 5 cas avec de l'ADN d'eubactéries ou de bactéries non cultivables dont l'identification n'a pu être précisée.
Durant les mois suivants, avec l'utilisation d'amorces spécifiques, sur les 233 tiques analysées, 3 ont donné lieu à un signal correspondant à de l'ADN d'*A. phagocytophilum* (2 nymphes et 1 adulte).
Au total, sur l'ensemble de l'année, 1.4 % des nymphes et 1.6 % des adultes étaient infectées par *A. phagocytophilum.*
Aucune des tiques infectées par *A. phagocytophilum* ne l'était conjointement par *B. burgdorferi* sl.

## B. 5. CONCLUSIONS

**Densité d'*I. ricinus* selon les sites.**
De très importantes disparités dans la densité des tiques ont été constatées d'une région à l'autre. Ainsi le pic de densité des nymphes varie de 24/100 $m^2$ dans le Puy-de-Dôme à 234/100 $m^2$ dans la Creuse. Les adultes étant moins nombreux, la fourchette de variation est moins large, allant de 7/100 $m^2$ dans l'Allier à 49/100 $m^2$ dans la Meuse. Par ailleurs, le rapport entre la densité moyenne des nymphes et celle des adultes varie aussi considérablement, de 1.3 dans le Puy-de-Dôme et 1.8 dans la Meuse à 12 dans le Limousin et 23 dans l'Allier. Il est intéressant de noter le parallélisme entre deux départements éloignés, le Puy-de-Dôme et la Meuse, où nous avons observé un phénomène identique avec une diminution notable de la densité des nymphes et une augmentation de la densité des adultes par rapport à l'année précédente, à tel point que, dans ces deux départements, la densité des adultes infectées dépasse celle des nymphes. Il n'y a d'ailleurs aucune différence significative entre les densités mensuelles des nymphes et des adultes quel que soit le mois de collecte. Ceci n'était pas le cas en 2004 où la différence a toujours été significative dans les deux départements.
Sur tous les sites, les trois stades d'*I. ricinus*, larves, nymphes et adultes coexistent sur l'ensemble de l'année et leur évolution est parallèle.
Enfin sur l'ensemble des sites étudiés, comme nous l'avions constaté les années précédentes dans d'autres régions, il existe d'importantes disparités dans la répartition des tiques dans le temps et dans l'espace, au sein d'une même parcelle, à des distances très proches.
Une même disparité existe dans les taux d'infection des tiques par *B. burgdorferi* sl selon les régions étudiées, allant de 8 % de nymphes infectées dans la Meuse à 20 % dans le Puy-de-Dôme.
Les taux d'infection par *A. phagocytophilum* sont très faibles sur l'ensemble des régions.
Les particularités du site de Tronçais, dans l'Allier, méritent d'être soulignées. En effet dans cette forêt, la densité des tiques est assez modérée, le taux d'infection aussi bien des adultes que des nymphes par *B. burgdorferi* sl est parmi les plus faibles de tous les sites étudiés, mais surtout on ne retrouve pas du tout la même distribution des espèces, puisque *B. spielmanii* et *B. lusitaniae*, ailleurs très rares voire absentes, sont ici en première place. De la même façon, c'est sur ce site que le taux d'infection des tiques par *A. phagocytophilum* est le plus élevé. Seule, une exploration de la faune présente dans cette forêt pourrait fournir des explications à ces observations.

**Répartition des espèces de *B. burgdorferi* sl.**
Cette répartition varie selon les stades des tiques mais également selon les régions et, dans une même région, selon les sites de collecte (Fig. B8). *B. afzelii* prédomine globalement chez les nymphes, à l'exception de la Haute-Vienne, et dans la Meuse la prévalence d'infection des nymphes par *B. afzelii* et *B. garinii* est très voisine. Par contre, chez les adultes, on observe une plus grande variabilité selon les sites considérés. *B. garinii* infecte majoritairement les adultes collectées dans le Limousin, *B. valaisiana* est prédominante chez les adultes collectées dans la Meuse, et dans la forêt de Tronçais, de façon tout à fait inhabituelle, ce sont à égalité *B. afzelii* et *B. lusitaniae* qui infectent le plus souvent les adultes. Sur ce même site, *B. spielmanii* est la deuxième espèce, par ordre de fréquence, identifiée dans les nymphes.

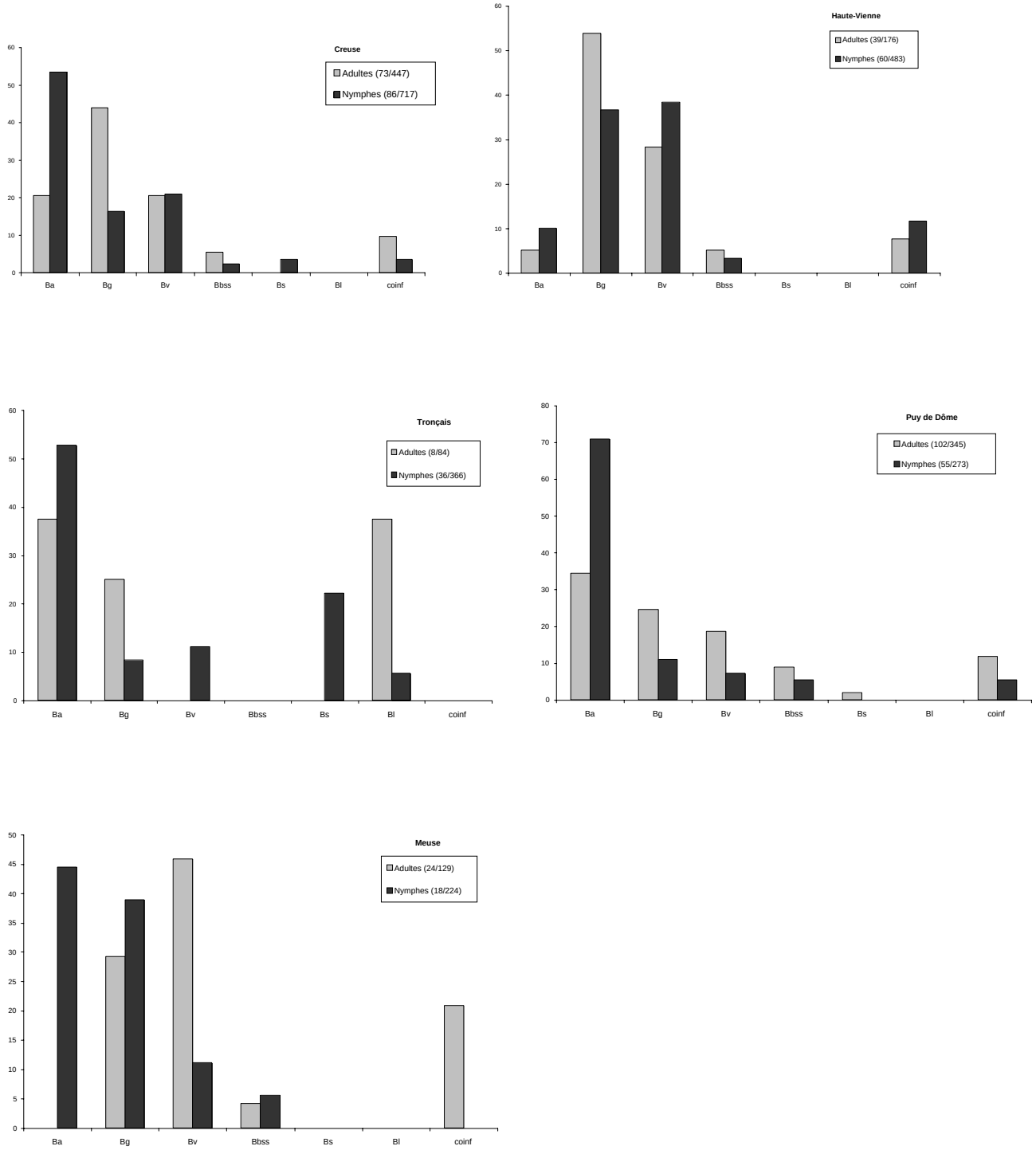


Figure B8 . Part relative de chacune des espèces de *B. burgdorferi* sl dans l'infection des tiques, selon les stades des tiques et selon les sites étudiés.