



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES *BORRELIA*

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ

Année 2006

CNR

Laboratoire des spirochètes
Institut Pasteur, Paris

Responsables : Danièle Postic
(Murielle Cornet)
Elisabeth Ferquel

Techniciennes : Martine Garnier
Natacha Sertour

Secrétaire : Solange Coueille

Laboratoire associé au CNR

Institut de Bactériologie de Strasbourg
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Responsables : Benoît Jaulhac
Sylvie de Martino

Assistante-Ingénieur : Chantal Delena

PLAN

1/ Introduction et résumé de l'année 2006

2/ Activités d'expertise

2. 1 Capacités techniques

2. 1.1 Capacités techniques du CNR

- Liste des techniques de référence
- Techniques développées en 2006
- Techniques en développement
- Collection de souches

2. 1.2 Capacités techniques du laboratoire associé au CNR

- Liste des techniques de référence
- Techniques en développement
- Collections de souches
- Techniques évaluées
 - Comparaison de deux préparateurs d'acides nucléiques pour l'extraction d'ADN de *Borrelia burgdorferi* à partir de prélèvements tissulaires
 - Comparaison des techniques PCR en temps réel publiées dans la littérature pour la détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato
 - Comparaison de coffrets ELISA recombinants pour la sérologie de *Borrelia burgdorferi*
 - Comparaison des trousses Platelia™ Lyme (Bio-Rad) et Enzygnost® classique (Dade Behring)

2. 2 Activités d'expertise de l'année 2006

2.2.1 Activités d'expertise du CNR

2.2.2 Activités d'expertise du laboratoire associé au CNR

- Sérologies sanguines *Borrelia* réalisées en 2006 (hors CHU de Strasbourg)
- Étude de la synthèse intra-thécale en 2006 (hors CHU de Strasbourg)
- Participation à la surveillance épidémiologique
- Expertise de prélèvements PCR pour la Slovaquie

3/ Activités de surveillance

3. 1 Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le CNR :

3.1.1 Étude clinique prospective en Auvergne

3.1.2 Étude clinique prospective dans la Meuse

3.1.3 Étude clinique prospective en milieu hospitalier :

Centre Hospitalier de Charleville-Mézières
CHU Cochin et CHU de Rennes

3. 1.4 Résultats du laboratoire Pasteur-Cerba

3. 2 Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le laboratoire associé

3. 3 Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* par le CNR

3.3.1 Choix des sites et méthodes

3.3.2 Étude dans le Limousin

3.3.3 Étude en Basse-Normandie

3.3.4 Étude dans le Département de la Meuse

3.3.5 Diversité génétique des souches de *Borrelia burgdorferi* sl.

3.4 Contribution du CNR aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

4/ Activités d'information, de formation et de conseil

4.1 Activités d'information, de formation et de conseil du CNR

4.2 Activités d'information, de formation et de conseil du laboratoire associé au CNR

5/ Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

5.1 Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

5.2 Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du laboratoire associé au CNR

6/ Liste des publications et communications

6.1 Liste des publications et communications du CNR

6.2 Liste des publications et communications du laboratoire associé au CNR

7/ Programme d'activité 2007-2008

7.1 Programme d'activité 2007-2008 du CNR

7.2 Programme d'activité 2007-2008 du laboratoire associé au CNR

1/ Introduction et résumé de l'année 2006 :

Les borrélioses, qui regroupent la borréliose de Lyme et les fièvres récurrentes, sont des zoonoses très largement répandues et sont transmises à l'homme par des arthropodes.

La borréliose de Lyme se répartit dans toutes les zones tempérées de l'hémisphère Nord et est provoquée par des bactéries du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. spielmanii*. Deux autres espèces : *B. valaisiana* et *B. lusitanae* ont été isolées chez des patients mais leur pouvoir pathogène reste discuté. En France, la borréliose de Lyme est transmise par la tique *Ixodes ricinus* retrouvée sur tout le territoire à l'exception de la côte méditerranéenne et des régions de haute altitude. Le réservoir animal, essentiellement sylvestre, est très vaste et serait constitué par les micromammifères (rongeurs), les macromammifères (cervidés et suidés), les oiseaux et les reptiles.

Les fièvres récurrentes sont endémiques dans les pays du pourtour méditerranéen, en Afrique subsaharienne, en Asie et en Amérique. En France, seuls des cas importés sont décrits. De nombreuses espèces, différemment réparties dans le monde, peuvent être à l'origine des fièvres récurrentes. Les principales sont *B. duttonii*, *B. hispanica*, *B. crocidurae*, *B. recurrentis* et *B. persica*. La transmission se fait par des tiques du genre *Ornithodoros* et les rongeurs constituent le principal réservoir (à l'exception de *B. duttonii* pour laquelle l'homme est le seul hôte connu).

La principale mission du Centre National de Référence des *Borrelia* et de son laboratoire associé est de contribuer à la surveillance épidémiologique de ces deux zoonoses en France. Comme toutes les infections à transmission vectorielle, elles sont considérées comme des maladies émergentes et leur répartition pourrait se modifier avec les changements climatiques en cours. Leur surveillance est donc essentielle.

Pour la borréliose de Lyme, la surveillance effectuée par le CNR et son laboratoire associé est basée sur une estimation de l'incidence de la maladie humaine. Grâce à un réseau de médecins libéraux ou hospitaliers qui collaborent avec le CNR et son laboratoire associé, nous avons poursuivi en 2006 l'étude de l'incidence de la maladie dans le département de la Meuse (suivi depuis 5 ans) et dans les régions Auvergne (suivie depuis 3 ans) et Alsace (suivie depuis 5 ans). L'incidence en Auvergne et dans la Meuse a sensiblement augmenté se situant globalement entre 100 et 135/100 000 habitants. Par ailleurs, l'étude menée en Alsace par le CNR nous a permis de montrer que l'incidence de la maladie humaine était corrélée à la densité des tiques infectées par *B. burgdorferi* sl. (Ferquel *et al.* 2006). Dès lors, la surveillance des populations d'*Ixodes ricinus* et de son taux d'infection nous permet d'estimer globalement le risque de borréliose de Lyme dans une région donnée. En 2006, le CNR a évalué la densité et le taux d'infection des tiques dans le Limousin, la Meuse et la Basse-Normandie. Le risque dans ces régions est modéré avec une densité de nymphes infectées autour de 20/100m², soit environ 2 fois moins important qu'en Alsace. La surveillance du vecteur nous permet également d'effectuer une étude des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato circulantes et d'analyser leur diversité génétique, étude impossible à faire avec les souches humaines du fait de leur extrême rareté. En 2006, la proportion de l'espèce pathogène *B. burgdorferi* sensu stricto a augmenté dans le Limousin et est présente en Basse-Normandie à un taux élevé (27 %) jamais rapporté en France.

Le laboratoire associé au CNR des *Borrelia* est l'Institut de Bactériologie de Strasbourg des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. En 2006, les principales activités du laboratoire associé au CNR ont été :

- l'évaluation de tests ELISA : amélioration globale des performances des tests recombinaux.
- l'établissement de la place de l'index de synthèse intra-thécale pour le diagnostic des formes neurologiques de la borréliose de Lyme

- la mise en évidence de la prédominance de *B. afzelii* dans les érythèmes migrants du Nord-Est. Un cas de neuroborréliose à *B. burgdorferi* sensu stricto dans la région toulousaine.
- la description du premier cas d'infection disséminée à *B. lusitaniae* en Europe
- sa participation à la Conférence de Consensus sur les manifestations cliniques, le diagnostic, le traitement et la prévention de la borréliose de Lyme.

Le fait marquant de l'année 2006 a été l'organisation par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) d'une conférence de consensus sur la borréliose de Lyme. Cette conférence a permis des progrès essentiels dans la compréhension de cette pathologie complexe en clarifiant et en précisant les aspects diagnostiques et thérapeutiques ainsi que les mesures préventives. Cette réunion ayant eu lieu en toute fin d'année, les recommandations ainsi que les modifications dans les définitions des cas n'ont pas été prises en compte dans ce bilan.

La surveillance des fièvres récurrentes effectuée par le CNR repose sur l'aide au diagnostic des cas importés en France. De plus, le CNR a poursuivi en 2006 la collaboration avec des équipes des Instituts Pasteur de Tunisie et du Maroc dans le cadre d'un projet d'Action Concertée des Instituts Pasteur (ACIP) sur les fièvres récurrentes en Afrique du Nord.

Le CNR des *Borrelia* fait partie du Laboratoire des Spirochètes de l'Institut Pasteur de Paris dirigé par le Dr I. Saint Girons. Ce laboratoire comprend également le CNR de la leptospirose et une équipe de recherche dont les thématiques principales sont la génétique et la virulence des leptospires. Cette situation permet des collaborations étroites entre les CNR des *Borrelia* et de la leptospirose et le groupe de recherche. Le CNR participe à la surveillance en entretenant et développant le réseau de médecins dans les régions autres que l'Alsace. Il effectue la surveillance du vecteur et l'analyse de la biodiversité des espèces de *Borrelia burgdorferi* *sl.* isolées des tiques. Son activité de recherche consiste à développer des méthodes moléculaires rapides d'identification des espèces, à analyser, en collaborations avec d'autres équipes européennes le rôle de différents vecteurs et réservoirs dans la biodiversité des espèces.

Les missions du laboratoire associé sont :

- Expertise des sérologies réalisées par des laboratoires d'analyse médicale
- Expertise des tests sérologiques commerciaux
- Isolement de souches de *Borrelia* à partir de prélèvements humains
- Détection et identification de *Borrelia burgdorferi* sensu lato par PCR à partir de prélèvements humains
- Surveillance épidémiologique des manifestations humaines de la borréliose de Lyme (en collaboration avec le CNR)
- Formation et aide des professionnels de santé (en collaboration avec le CNR)

2/ Activités d'expertise :

2-1 Capacités techniques

2.1.1 Capacités techniques du CNR (Laboratoire des spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

- Liste des techniques de référence pour le diagnostic/identification, typage :
 - Techniques disponibles pour le diagnostic/identification, typage de la borréliose de Lyme :
 - Culture à partir du sang, de prélèvements de peau, du LCR, de liquide synovial et de tiques sur milieu spécifique BSK (milieu de Kelly modifié par Stoenner et Barbour).
 - Amplification génique à partir des mêmes prélèvements : PCR classique ou PCR nichée avec amplification des gènes *rrs*, *fla* et espace intergénique *rrf-rrl*.
 - Identification et typage des *Borrelia burgdorferi* sl. : par amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl* puis analyse du profil de restriction *MseI* et/ou séquençage du produit d'amplification, par électrophorèse en champ pulsé ou hybridation ADN/ADN qui est la méthode de référence. Cette dernière n'est pas utilisée pour l'identification en routine mais pour la description de nouvelles espèces et elle a été remplacée par la méthode Multi Locus Sequence Analysis (MLSA).
 - Techniques disponibles pour le diagnostic/identification, typage des fièvres récurrentes :
 - Culture à partir du sang et de tiques sur milieu spécifique BSK
 - Amplification génique à partir du sang : PCR classique ou PCR nichée des gènes *rrs*, *fla* et espace intergénique *rrs-rrl* (IGS).
 - Identification par séquençage du produit d'amplification.
 - Techniques disponibles pour le diagnostic/identification, typage des autres bactéries pathogènes transmises par *Ixodes ricinus* :
 - Amplification génique de l'ensemble des pathogènes : *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp, *Wolbachia* sp. et des Rickettsies ou amplification spécifique d'*Anaplasma phagocytophilum*.
 - Identification par séquençage.
- Techniques développées en 2006 :
 - PCR en temps réel ciblée sur le gène *hbb* et hybridation par des sondes fluorescentes : cette méthode permet à la fois le diagnostic et l'identification de 5 espèces du complexe *Borre-*

lia burgdorferi sl. et est donc particulièrement intéressante pour l'identification à partir des tiques (D. Portnoï *et al.* 2006).

- Définition des espèces par analyse MLSA : La mise au point d'une méthode MLSA en collaboration avec une équipe allemande (D. Richter) a permis de définir l'espèce *B. spielmanii* (D. Richter, D. Postic *et al.* 2006) ainsi que 3 nouvelles espèces américaines (D. Postic *et al.*, sous presse). Cette méthode remplace l'hybridation ADN/ADN particulièrement délicate pour des bactéries difficiles à cultiver.
- Techniques en développement :
 - Mise au point d'une méthode Multi Locus Sequence Typing (MLST) pour le typage et l'analyse phylogénétique des souches de *B. lusitaniae* isolées en Allemagne et au Portugal (équipe de D. Richter) et en Afrique du Nord (équipe du CNR).
- Collection de souches :

Le CNR des *Borrelia* possède une collection de 1057 souches comprenant à la fois des souches cliniques humaines et des souches isolées de tiques, des souches de référence et des souches atypiques rares. Environ 900 souches sont européennes, 70 proviennent d'Amérique du Nord, 40 d'Asie et 30 d'Afrique du Nord.

Ces souches sont stockées en plusieurs aliquots à – 80°C. Elles sont mises à disposition après demande écrite précisant l'origine (souche humaine ou issue de tique), les espèces souhaitées et l'utilisation envisagée. Si les souches ont été transmises au CNR par un autre laboratoire, l'autorisation de celui-ci est requise. Ces souches sont envoyées gracieusement dans le cadre d'une collaboration.

2.1.2 Capacités techniques du laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

- Liste des techniques de référence :
 - Culture de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en milieu liquide BSK
 - Culture de *Borrelia burgdorferi* sensu lato sur milieu solide (publication en 2006)
 - Recherche de *Borrelia burgdorferi* par PCR en temps réel et sonde TaqMan sur prélèvements biologiques (cible = gène chromosomique de la flagelline, validée en 2005)
 - Typage direct ou sur culture par sondes fluorescentes spécifiques des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (cible = gène chromosomique de la flagelline, validée en 2005)
 - Immuno-empreinte pour étude des anticorps *Borrelia burgdorferi* sensu lato selon les critères européens de Roberston (J Clin Microbiol, 2001). Calibration à l'aide d'anticorps monoclonaux anti OspA, OspC, P 41, P 66, P 83, fournis par le Dr. M. Bechtel (Allemagne)

- Techniques en développement :

Méthode de confirmation de la détection de *Borrelia burgdorferi* par PCR en temps réel et sonde TaqMan (cible = gène chromosomique d'histone like protein *hbb*). Définition d'amorces reconnaissant avec une même sensibilité 66 souches des six principales espèces de *Borrelia*, spécificité vérifiée, spectre et sensibilité en cours. Validation sur prélèvements à faire.

- Collections de souches, d'antigènes ou immun-sérums de référence :

- Nous possédons une collection de 250 sérums de patients atteints des différentes formes de borréliose de Lyme selon les critères européens de la maladie. Ces sérums ont été confirmés par western-blot. Les sérums sont stockés en aliquotes de 0,5 ml à -30°C (température enregistrée toutes les 10 min). Ces sérums sont disponibles dans le cadre d'études collaboratives.
- Nous possédons une collection de 18 souches humaines à très faible nombre de passages in vitro, isolées au laboratoire, de *B. garinii* et de *B. afzelii*, d'EM, de lymphocytome, d'ACA et de LCR de patients atteints de neuroborréliose. La virulence de toutes ces souches a été contrôlée après isolement, sur modèle expérimental murin. Les souches sont stockées en aliquotes de 1 ml à -80°C (température enregistrée toutes les 10 min). Elles sont adressées gracieusement sur demande. En 2006, nous avons fourni 6 souches humaines à faible passage (< P 5) isolées de lésions d'EM de *B. garinii* et de *B. afzelii* au Pr. Charles Pavia, NY-COM, USA.
- Nous possédons une collection de 62 souches humaines et de 33 souches isolées de tiques des différentes espèces de *Borrelia* agents de la borréliose de Lyme. Ces souches nous ont été fournies par des collègues européens ou américains. Les souches humaines ont été isolées d'EM, de lymphocytome, d'ACA et de LCR de patients atteints de neuroborréliose. Les souches sont stockées en aliquotes de 1 ml à -80°C (température enregistrée toutes les 10 min). Ces souches peuvent être fournies après accord du détenteur initial.

- Liste des techniques évaluées :

- Comparaison de deux préparateurs d'acides nucléiques pour l'extraction d'ADN de *Borrelia burgdorferi* à partir de prélèvements tissulaires

Nous avons comparé deux robots préparateurs d'ADN (MAGNA Pure, Roche et EasyMag, BioMérieux) pour leur capacité à extraire l'ADN de *Borrelia burgdorferi* à partir des différents prélèvements qui nous sont adressés dans le cadre du CNR. Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'infection expérimentale à *Borrelia*, la souris C3H.

Huit souris ont été infectées par voie intra-dermique (voie habituelle d'inoculation de ce modèle) par une souche de *B. burgdorferi* sensu stricto virulente. Les souris ont développé des arthrites, fait une séroconversion et ont été euthanasiées au 30^{ème} jour (correspondant à la dissémination maximale de l'infection). Les cœurs et les deux articulations tibio-tarsiennes murines ont alors été prélevés.

Nous avons ensuite, à partir d'un poids similaire de tissu, comparé les deux automates, en terme de quantité d'ADN obtenue, de pureté de cet ADN et de leur capacité à détecter *Borrelia burgdorferi* par PCR en temps réel permettant une évaluation de la quantité de *Borrelia* présente dans les tissus. Ceci a été fait en utilisant les protocoles d'extraction recommandés

par les fabricants pour les tissus, en réalisant une lyse préalable des tissus avant utilisation de l'automate, par la collagénase pour le tissu synovial et par la protéinase K pour le tissu cardiaque, ainsi que nous l'avons déterminé en 2005.

PRELEVEMENT	RESULTATS EASY MAG					RESULTATS MAGNA PURE					Rendt magna/asymag
	POIDS TISSU	CONC ng/μL	DO 260/280	Rendt ext μg/mg	PCR Bb (CT)	POIDS TISSU	CONC ng/μL	DO 260/280	Rendt ext μg/mg	PCR Bb (CT)	
ART N40 N□6 13/	30,65 mg	57,8	1,77	0,19	33,79	30,65mg	99,3	1,85	0,32	31,62	1,68
ART N40 N□7 13/	35,5 mg	60,1	1,64	0,17	37,33	35,5mg	87,4	1,86	0,25	35,94	1,47
ART N40 N□8 13/	25,75 mg	54,2	1,83	0,21	37,67	25,75mg	74,3	1,9	0,29	35,81	1,38
ART N40 N□9 13/	24,1 mg	59,8	1,63	0,25	37,53	24,1mg	91,1	1,86	0,38	34,78	1,52
ART N40N□10 13/	28,15 mg	55,7	1,74	0,2	37,88	28,15mg	94,1	1,88	0,33	34,88	1,65
ART GF0 12/5/06	27,3 mg	72,4	1,68	0,26	34,95	27,3mg	130	1,86	0,48	33,02	1,85
ART GF1 12/5/06	35,5 mg	77,3	1,79	0,22	32,11	35,5mg	127	1,86	0,36	30,87	1,64
ART GF2 12/5/06	33,25 mg	67,3	1,66	0,2	33,86	33,25mg	110	1,83	0,33	31,05	1,65
Moyenne articul	30,02	63,075	1,7175	0,2125	35,64	30,02	101,65	1,8625	0,3425	33,49625	1,60
CIUR GA0	11,6MG	73,4	1,8	0,63	31,04	8mg	96,3	1,9	1,2	36,56	1,90
CIUR GA2	11,4MG	63,4	1,93	0,56	neg	13,1mg	124	1,96	0,95	40,63	1,70
CIUR GA3	11,8MG	60,3	1,78	0,51	34,47	10,5mg	125	1,94	1,2	36,82	2,35
CIUR FR0	6,7MG	35,7	1,86	0,53	neg	10,2mg	108	1,96	1,06	36,01	2,00
CIUR FR1	10,1MG	54,5	1,89	0,54	neg	12,5mg	122	1,95	0,98	35,16	1,81
CIUR FR2	16,2MG	58,3	1,86	0,36	36,3	9,4mg	85,4	1,98	0,91	38,46	2,53
CIUR FR3	9,8MG	61,6	1,83	0,63	36,35	12,1mg	124	1,93	1,03	38,72	1,63
CIUR FR4	14MG	63,5	1,92	0,45	36,48	12,6mg	116	1,97	0,92	37,65	2,04
Moyenne cLur	11,45	58,8375	1,85875	0,52625		11,05	112,5875	1,94875	1,03125	37,50125	2,00

La pureté de l'ADN obtenu, mesurée par le rapport de D.O. à 260/280 nm, était tout à fait satisfaisante pour les deux automates, quoique supérieure avec le MagNA pure pour les deux types de tissus testés (1,9 en moyenne contre 1,78 pour l'EasyMag). La concentration en ADN obtenu était elle nettement supérieure avec le MagNA pure (de 1,6 à 2 fois les valeurs obtenues avec l'EasyMag).

Tous les tissus articulaires des souris infectées ont été détectés positifs par PCR en temps réel après extraction par les deux automates. Néanmoins, les valeurs de CT étaient plus élevées après extraction par le MAGNA pure, indiquant des concentrations en *Borrelia* plus élevées. Pour les tissus cardiaques, si tous les échantillons testés ont été détectés positifs par PCR en temps réel après extraction par le MAGNA pure, 3 cœurs de souris étaient faussement négatifs après extraction par l'EasyMag.

Il semble donc, après ces premiers essais, qu'il soit nécessaire d'améliorer le protocole d'extraction de l'EasyMag pour pouvoir l'utiliser de façon optimale pour la détection de *Borrelia* dans les tissus de patients infectés.

- Comparaison des techniques PCR en temps réel publiées dans la littérature pour la détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

En France, à l'instar des autres pays européens, plusieurs espèces du complexe *B. burgdorferi* sensu lato sont pathogènes pour l'homme. Aux espèces classiquement décrites comme pathogènes, *B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, se sont rajoutées ces dernières années *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*. A ce polymorphisme, s'ajoute une variabilité intra-espèce importante, notamment pour *B. garinii*. Le choix de la cible moléculaire, devient donc une étape cruciale avant même la mise au point de la méthode à la paillasse et nécessite des bases des données étendues représentatives de ce polymorphisme.

Parmi les cibles chromosomiques, à côté du gène de la flagelline, que nous utilisons déjà, un éventail large de séquences est disponible pour le spacer intergénique 5S-23S ; le nombre de séquences disponibles dans les bases de données pour les autres gènes, hbb et recA, est plus restreint. Les gènes plasmidiques de *B. burgdorferi* sensu lato, sont présents en multi-copie dans la bactérie et participent aux mécanismes d'échappement de la bactérie. Ils sont ainsi le siège de nombreuses variations de séquences intra-espèce. Néanmoins, le gène *ospA* a été très étudié et une base de données de séquences complète existe pour ce gène. Pour les autres gènes de protéines de surface, la variabilité des séquences inter- et

intra-espèces est aussi importante, mais les bases de données de séquences ne sont pas aussi étendues. Au total, après revue extensive de la littérature, nous avons retenu deux cibles alternatives au gène de la flagelline et les articles suivants :

- *ospA* (Rauter, 2002 ; Ivacic, 2006 ; Gooskens, 2006)
- *hbb* (Portnoi, 2006)

Nous avons analysé à l'aide d'un ensemble de logiciel (DNASar, Primer express) la valeur des amorces et sondes TaqMan publiées dans ces études sur un alignement de toutes les séquences disponibles dans GeneBank en 2006 pour ces gènes réalisés à l'aide du logiciel Megalign.

Pour *ospA*, nous avons ainsi testé les amorces et les sondes vis-à-vis de 66 séquences des trois espèces principales de *B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelii* ainsi qu'au moins une séquence pour les autres espèces du complexe.

Les amorces publiées par Rauter et coll. en 2002 montrent ainsi un polymorphisme plus important que celui mentionné par les auteurs avec des mutations pour dix positions différentes sur l'amorce antisens, pour les trois espèces et notamment pour *B. garinii* et *B. afzelii*. Ces mutations ne peuvent se traduire au minimum que par une perte importante de la sensibilité de détection de certains isolats de ces souches, rendant donc ces amorces inappropriées à une utilisation en Europe, où *B. garinii* et *B. afzelii* sont les espèces pathogènes pour l'homme les plus fréquentes.

Le design des amorces proposées par Ivacic et coll. en 2006, part du même étayé par l'expérimentation sur prélèvements humains. Toutefois, leurs amorces montrent aussi un certain polymorphisme avec des mutations pour deux positions différentes sur l'amorce sens, pour *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ainsi qu'une mutation centrale pour plusieurs souches de *B. burgdorferi* et de *B. afzelii*. Ces amorces pourraient constituer un choix intéressant.

Les amorces publiées par Gooskens et coll. en septembre 2006 sont situées dans la même région de *ospA* que Ivacic et coll. et montrent deux mésappariements au niveau de l'amorce antisens. Par ailleurs, ils utilisent une sonde TaqMan dans une région différente de celle de Ivacic et coll. et qui présente plusieurs mésappariements à son extrémité 5' pour l'espèce *B. garinii*.

Pour *hbb*, nous avons testé les amorces et les sondes vis-à-vis de 50 séquences des différentes espèces du complexe *B. burgdorferi* sensu lato. Les variations observées au niveau des séquences des amorces sont minimales et ne concernent que deux espèces dont une actuellement non pathogène pour l'homme, *B. spielmanii* et *B. andersonii*. Par contre, un polymorphisme important existe au niveau de la sonde de FRET, concernant les trois espèces principales de *B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelii*. Nous avons alors testé expérimentalement les amorces et sonde publiées par ces auteurs. La sensibilité de la méthode a été nettement inférieure à celle obtenue par les auteurs. Cela ne semble pas lié au design des amorces mais à celui de la sonde fluorescence, trop proche d'une des amorces pour que le FRET puisse se faire. Nous avons alors décidé de garder ces amorces et de remplacer la sonde par une sonde TaqMan. La mise au point de cette sonde sera réalisée durant l'année 2007.

- Comparaison de coffrets ELISA recombinants pour la sérologie de *Borrelia burgdorferi*

La caractérisation il y a quelques années d'antigènes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato produits uniquement in vivo, particulièrement aux stades précoces de l'infection, est à l'origine du développement actuel de nouveaux coffrets ELISA basés en totalité ou partiellement sur un ou des antigènes recombinants. C'est notamment un fragment constant de l'antigène VlsE qui est souvent utilisé provenant soit d'une seule espèce de *Borrelia* soit de plusieurs espèces. L'objectif des fabricants est, par rapport aux coffrets basés sur un anti-

gène natif, d'obtenir une amélioration tant de la sensibilité aux stades précoces (érythème migrant, neuroborréliose aiguë) que de la spécificité.

Pour évaluer les performances de ces coffrets, nous avons utilisé plusieurs populations de sérums :

- Groupe 1 : 45 sérums d'érythème migrant (EM) correspondant aux critères de l'EUCALB c'est-à-dire indépendamment de tout résultat sérologique. Certains de ces sérums correspondaient à des cas d'EM positifs en culture ou en PCR ; d'autres étaient positifs en ELISA traditionnel IgM, confirmés par western-blot.

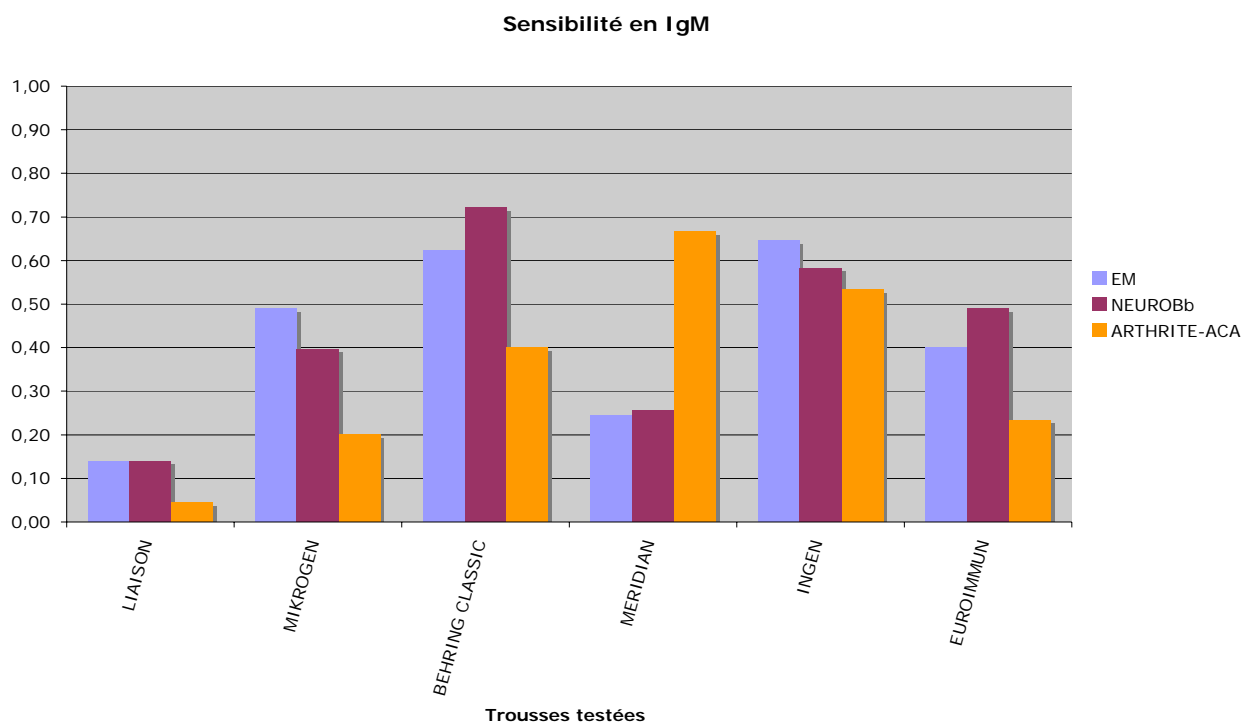
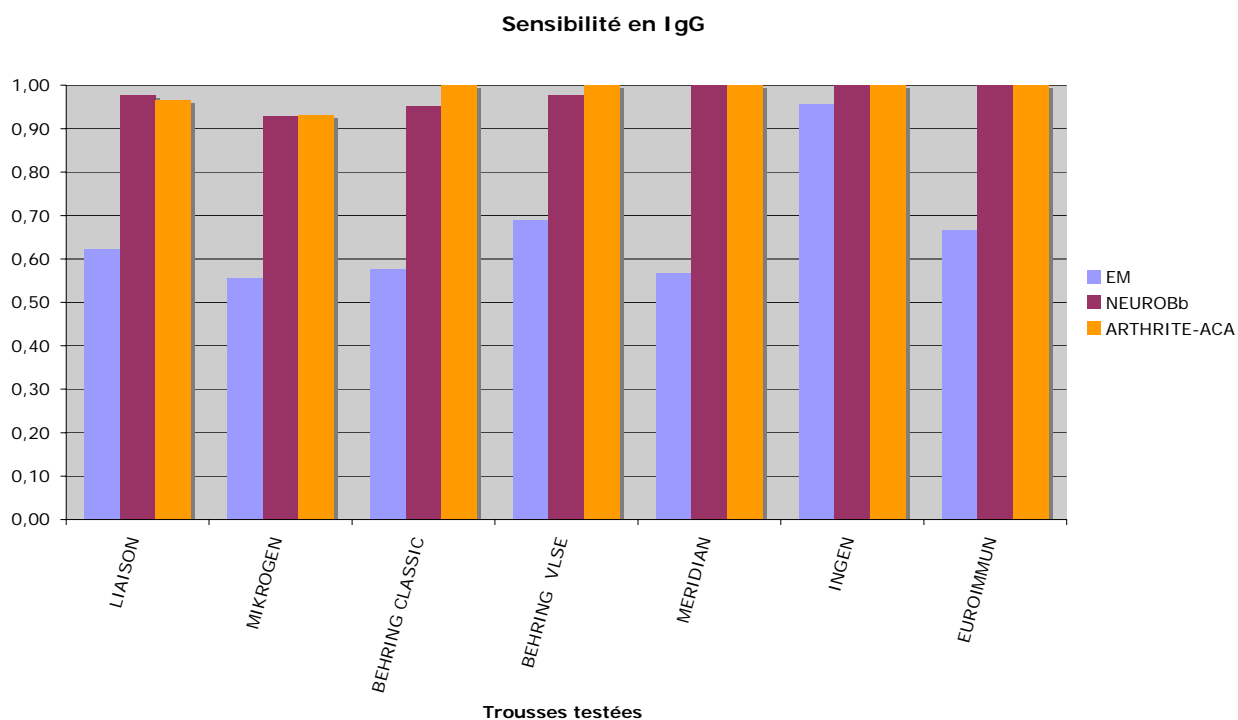
Nous avons testé cette population de sérums bien que la sérologie *Borrelia* ne soit pas indiquée pour le diagnostic de cette forme clinique de la maladie car c'est à ce stade de l'infection que la sérologie est le plus souvent prise en défaut (50 % de sensibilité en moyenne). De plus, l'antigène VlsE étant produit précocement d'après les données de la littérature, l'amélioration de la sensibilité devrait être maximale en testant les sérums de patients atteints d'EM.

- Groupe 2 : 43 sérums de patients atteints de neuroborréliose. Il s'agissait de sérums de patients ayant présenté un tableau clinique typique associé à une synthèse intrathécale spécifique dans le LCR correspondant et une lymphocytose dans le LCR, indépendamment du résultat de la sérologie sanguine.
- Groupe 3 : 30 sérums de patients présentant des manifestations tardives de borréliose de Lyme (arthrite de Lyme ou acrodermatite chronique atrophique) correspondant aux critères de l'EUCALB (sérologie sanguine positive)
- Groupe 4 : 186 sérums de donneurs de sang citadins (Strasbourg), sans notion de piqûre de tiques et indemnes de signes cliniques de borréliose de Lyme au moment du don du sang
- Groupe 5 : 149 sérums de patients atteints de pathologies donnant fréquemment des réactions croisées avec la sérologie de Lyme : EBV, syphilis, leptospirose.

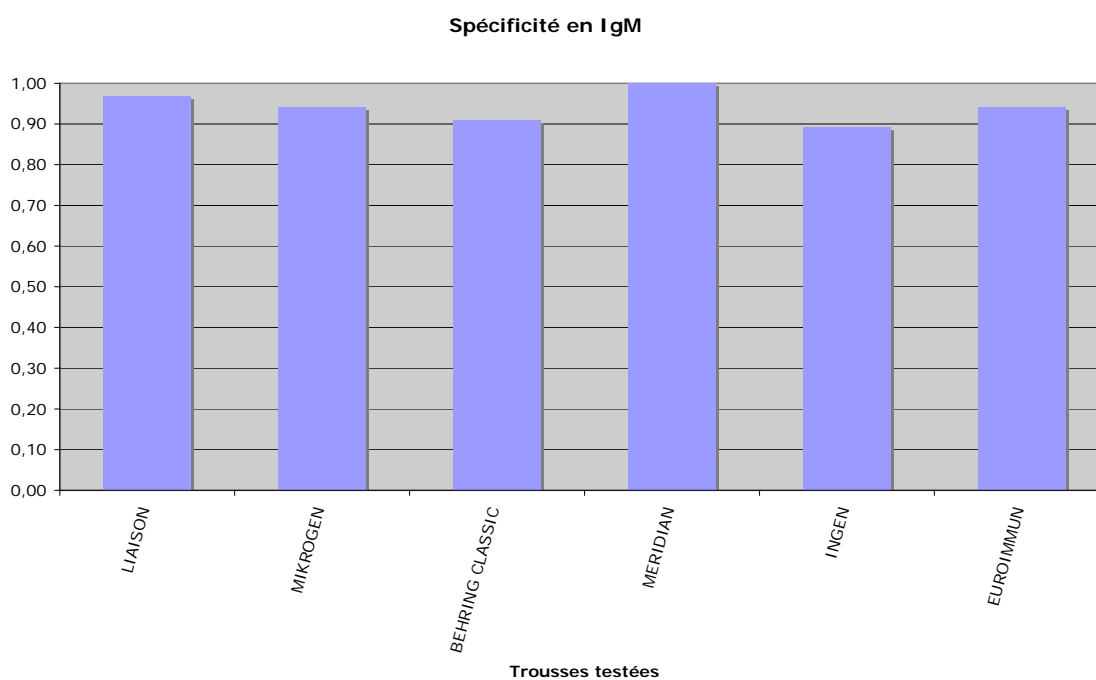
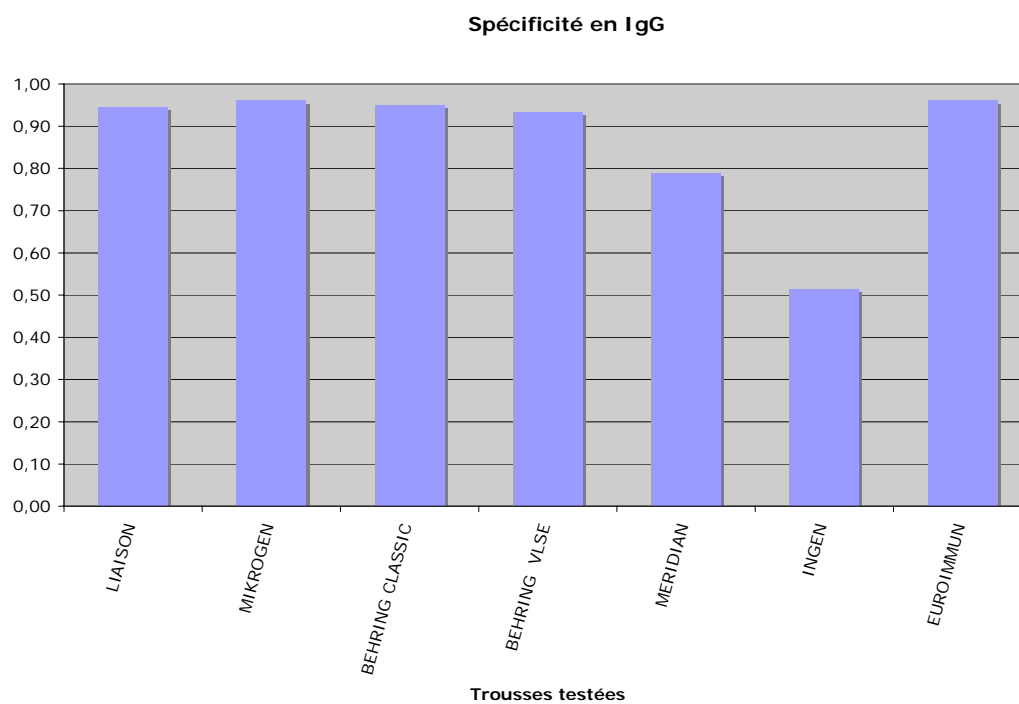
Nous avons poursuivi en 2006 ce travail commencé en 2005 et contrôlé par western-blot IgG et/ou IgM toutes les discordances observées. Ces western-blots, réalisés selon la méthode utilisée au laboratoire, ont ensuite été interprétés en utilisant comme critères de positivité tant pour les IgG que pour les IgM, la règle n°7, règle la plus stricte parmi celles proposées dans les recommandations européennes multicentriques pour l'interprétation des western-blots *Borrelia* (Robertson, J Clin Microbiol 2001).

Seules les sérologies positives selon ces critères ont été prises en compte. Les sérums de donneurs de sang (groupe 4), détectés positifs en western-blot *Borrelia*, correspondant donc à une infection asymptomatique à *Borrelia* indépendamment de la pathologie dont était atteint le patient, ont été éliminés pour le calcul final du taux de faux positifs observé dans les différentes populations de sérums de réactions croisées.

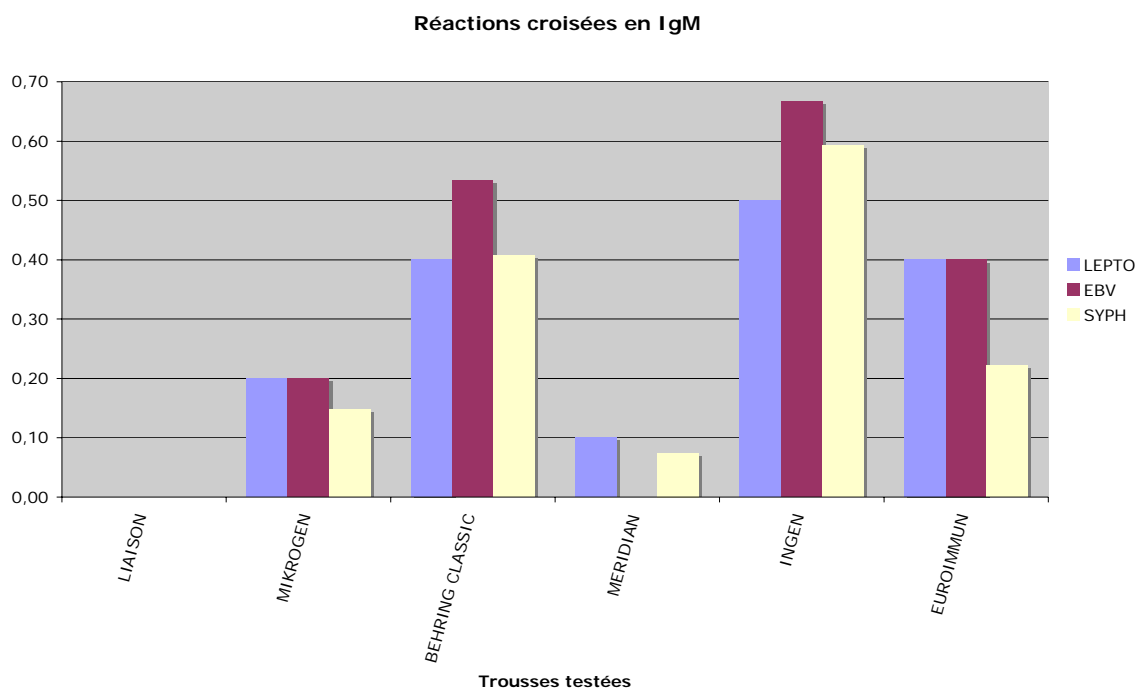
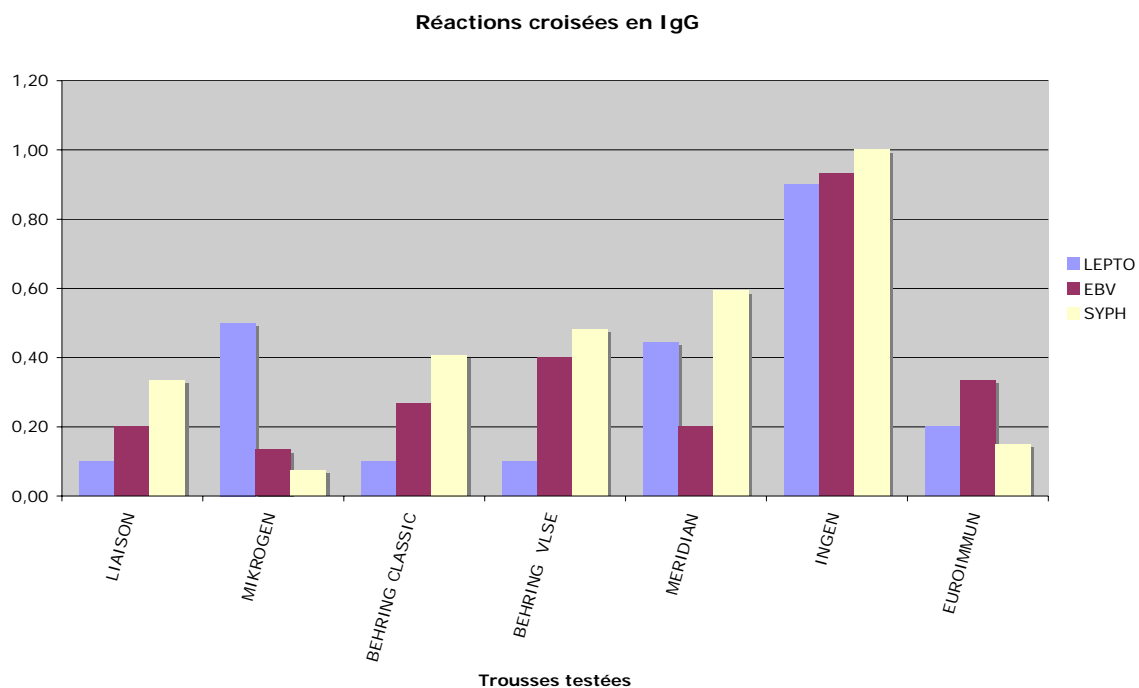
Sensibilité des trousses



Spécificité des trousses



Fréquence des réactions croisées



Différents commentaires généraux peuvent être extraits de ces résultats :

- Les performances de ces coffrets recombinants peuvent être très variables d'un coffret à l'autre. On constate des variations aussi importantes que celles que nous avons observées lors d'une étude précédente de coffrets basés sur des antigènes natifs.
- Ces variations sont observées alors que les différents fabricants utilisent tous, soit de façon pure soit en tant qu'antigène associé, un recombinant de l'antigène VIsE. La présence de cet antigène n'est donc pas à elle seule un gage de qualité

- Globalement, en IgG :
 - o le gain par rapport au test natif utilisé comme référence dans cette étude est réel mais modéré : de 0 à 10 % de sensibilité en IgG sur les EM. Un coffret (Mikrogen) révèle même une sensibilité inférieure au test natif
 - o un coffret (Ingen) présente une spécificité tout à fait inacceptable en utilisation (50%). Ce coffret n'est pas encore sur le marché français mais a déjà obtenu le marquage CE. Le fabricant s'est engagé à ne pas le vendre en France sans avoir revu le coffret.
 - o Les gains en spécificité sont nuls ou très faibles par rapport au test natif utilisé comme référence dans cette étude, contrairement à ce qu'annonçaient les fournisseurs. La confirmation des sérologies positives réalisées avec ces coffrets par une méthode d'immuno-empreinte (western-blot) reste donc nécessaire.
- Globalement, en IgM :
 - o On note une réelle augmentation de la spécificité par rapport au coffret natif utilisé comme référence, sauf pour la trousse Ingen.
 - o Il n'y a pas de gain en IgM en terme de sensibilité, que ce soit au stade d'EM ou au stade plus tardif de l'infection. On observe au contraire une baisse importante de la sensibilité avec plusieurs coffrets (Liaison, Meridian) au stade de neuroborréliose et au stade d'EM. Un fabricant (Behring) a d'ailleurs abandonné l'utilisation de cet antigène VlsE dans sa trousse IgM.
- Comparaison des trousse Platelia™ Lyme (Bio-Rad) et Enzygnost® classique (Dade Behring)

Les trousse d'ELISA Platelia™ Lyme IgM et IgG (Bio-Rad) Enzygnost® Borreliosis IgM et IgG (Dade Behring) ont été comparées.

Un total de 476 sérums documentés a été analysé en parallèle par les deux trousse. La spécificité a été étudiée sur 100 donneurs de sang, sans antécédent de borréliose. Les réactions croisées ont été étudiées sur sérums de patients atteints d'infection à CMV (n = 20), de toxoplasmose (n = 28), d'infection à HSV (n = 20), d'infection à EBV (n = 7), de syphilis (n = 49), de leptospirose (n = 15), de paludisme (n = 20), et de patients présentant des anticorps antinucléaires (ANA, n = 12) ou des facteurs rhumatoïdes (n = 35). La sensibilité des trousse a été étudiée sur sérums de patients atteints d'érythème migrants (EM, n = 17), de neuroborréliose (NB, n = 33), d'arthrite de Lyme (AL, n = 15) ou d'acrodermatite chronique atrophique (ACA, n = 20).

Sensibilité

Sur un total de 70 sérums de patients présentant une infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato, à la phase primaire cutanée, secondaire neurologique ou tardive articulaire ou cutanée, la sensibilité totale en IgG est supérieure avec la trousse Platelia™ Lyme, 93%, contre 87% pour Enzygnost®, notamment pour la détection des patients en phase primaire de l'infection (érythème migrant) (Fig. 3 IgG). En IgM, la sensibilité est meilleure pour la trousse Enzygnost®, 58% contre 37% pour la trousse Platelia™ Lyme, la différence étant observée avec toutes les catégories de patients atteints de borréliose de Lyme (Fig. 3 IgM).




Figure 3 : Sensibilité en IgG et en IgM des trousse Platelia™ Lyme (Bio-Rad) et Enzygnost® Dade Behring pour la détection d'anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* si dans le sérum de patients atteints de borréliose de Lyme (EM = érythème migrant, NB = neuroborréliose, AL = arthrite de Lyme, ACA = acrodermatite chronique atrophiante).

Spécificité

Sur un panel de 100 donneurs de sang, 97% étaient négatifs par la trousse Bio-Rad et 93% par la trousse Dade Behring. La spécificité entre les deux trousse diffère de 4% en IgG et de 2% en IgM, et ce en faveur de la trousse Platelia™ Lyme (fig. 1)



Figure 1 : Spécificité des trousse Platelia™ Lyme (Bio-Rad) et Enzygnost® Dade Behring testées sur 100 donneurs de sang sans antécédents de borréliose de Lyme.

Fréquence des réactions croisées

Sur un panel de 206 sérums générateurs de réactions croisées, 24 sérums ont été détectés positifs ou douteux par la trousse Platelia™ Lyme (13 en IgG et 11 en IgM), contre 52 sérums par la trousse Enzygnost® (21 en IgG et 31 en IgM). Ces différences sont observées pour la majorité des catégories de sérums (fig. 2).

Figure 2 : Pourcentage de réactions croisées observées en IgG et en IgM avec les trousse Platelia™ Lyme (Bio-Rad) et Enzygnost® Dade Behring sur sérums de patients présentant différentes pathologies (CMV, toxoplasmose, HSV, EBV, syphilis, leptospirose, paludisme, facteurs rhumatoïdes, anticorps anti-nucléaires).

2.2 Activités d'expertise de l'année 2006

2.2.1 Activités d'expertise du CNR (Laboratoire des spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

- Diagnostics bactériologiques et moléculaires

Le CNR effectue la recherche de *B. burgdorferi* sl. par culture et PCR dans les prélèvements biologiques (peau, liquide articulaire, LCR et sang) ainsi que celle des *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes dans le sang.

Tableau 2: Echantillons biologiques reçus au CNR en 2006

	Nombre de demandes reçues	Nombre d'échantillons positifs
Prélèvements humains pour recherche de <i>B. burgdorferi</i> sl.	9	1 <i>B. valaisiana</i> atyp.2
Tiques prélevées chez des patients	3	0
Prélèvements sanguins humains pour diagnostic des fièvres récurrentes	8	2 <i>B. crocidurae</i>

En 2006, le CNR a reçu 6 biopsies cutanées et 3 autres prélèvements (LCR, liquide synovial). Une biopsie cutanée s'est révélée positive à *B. valaisiana*, ce qui est exceptionnel. *B. valaisiana* est une espèce dont la pathogénicité n'est pas complètement établie. Il s'agissait d'une patiente rési-

nant dans le Puy-de-Dôme, présentant une acrodermatite chronique atrophique (ACA) du membre inférieur plusieurs mois après une piqûre de tique. Une première biopsie avait évoqué le diagnostic mais seul l'examen histologique avait été réalisé. La sérologie était positive avec des IgG. La PCR effectuée sur le thermolysat de la culture de la deuxième biopsie adressée au CNR a révélé la présence d'ADN de *B. valaisiana* atyp. 2. Dans l'intervalle, la patiente avait reçu un traitement antibiotique.

Aucune des cultures n'a abouti à un isolement de souche.

Les diagnostics de fièvre récurrente (Tableau 2) à *B. crocidurae* ont été faits chez des patients au retour du Mali et du Sénégal.

- Décrire le nombre de souches ou d'échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués

2 souches : au Dr. Marina CINCO, Lab. Spirochete, Universita di Trieste TRIESTE, Italie.

3 souches de référence à M. Gaël CHAMPIER, Laboratoire de Physiologie moléculaire de la Réponse immunitaire et des Lymphoproliférations, Faculté de Médecine de Limoges.

ADN de tiques au Dr. Caroline BURRI, Institut de Zoologie – Faculté des Sciences Université de Neuchâtel, Suisse.

ADN de *Borrelia* : 3 souches de référence au Pr. Rosa MONNO, Dipartimento di Medicina interna e Medicina pubblica, Università di Bari, Italie.

6 souches de référence au Dr. Amir MOGHADDAM, Først Medisinsk Laboratorium, Oslo, Norvège

Milieu de culture BSK au CHRU Gabriel Montpied, CLERMONT-FERRAND

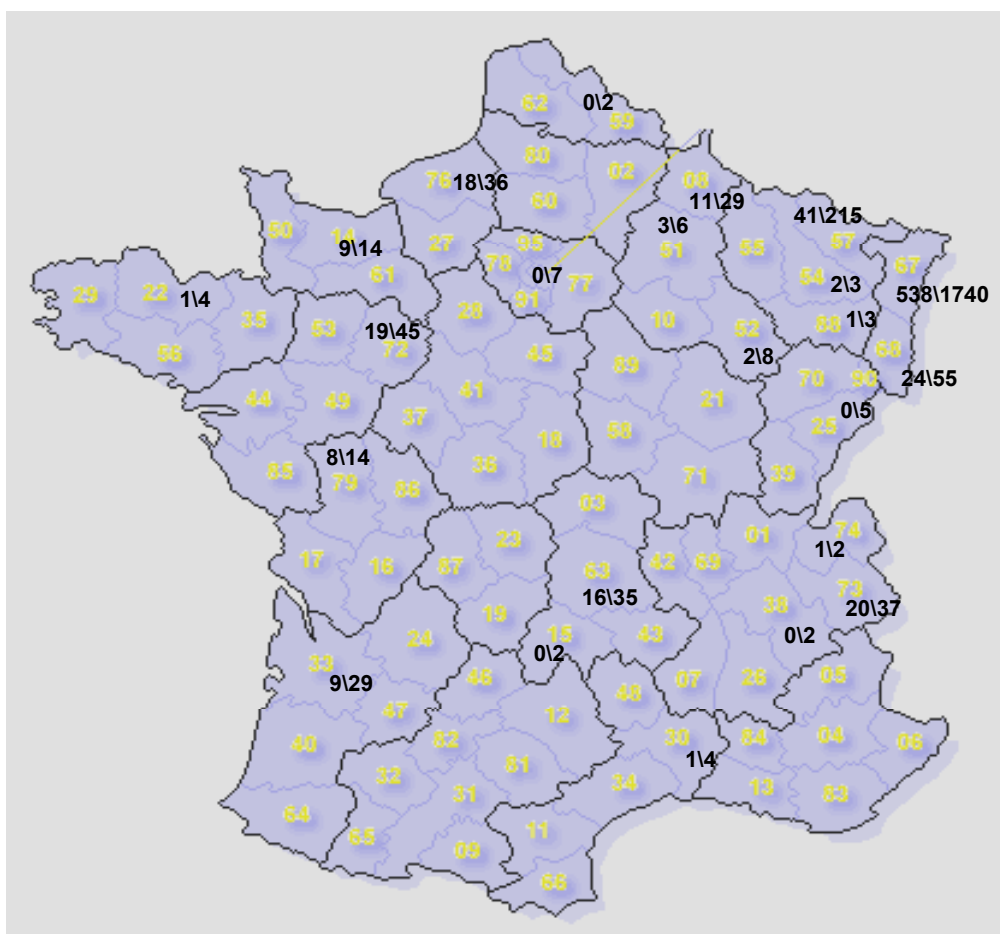
2.2.2 Activité d'expertise du laboratoire associé au CNR des *Borrelia* (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

Les échantillons ont été analysés à titre gracieux par le laboratoire associé au CNR *Borrelia* si le prélèvement était accompagné d'une fiche de renseignements remplie. Cette activité est analysée au chapitre 3 « Activités de surveillance ».

En l'absence de cette fiche, l'analyse payante a été réalisée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Strasbourg.

- Sérologies sanguines *Borrelia* réalisées en 2006 (hors CHU de Strasbourg)

Nous avons réalisé 2299 sérologies *B. burgdorferi* (par ELISA et western-blot sur les sérologies positives ou douteuses par ELISA) pour différents laboratoires privés, de CH et de CHU (hors CHU de Strasbourg) dont l'origine géographique figure sur la carte ci-dessous, 722 ont été confirmées positives.

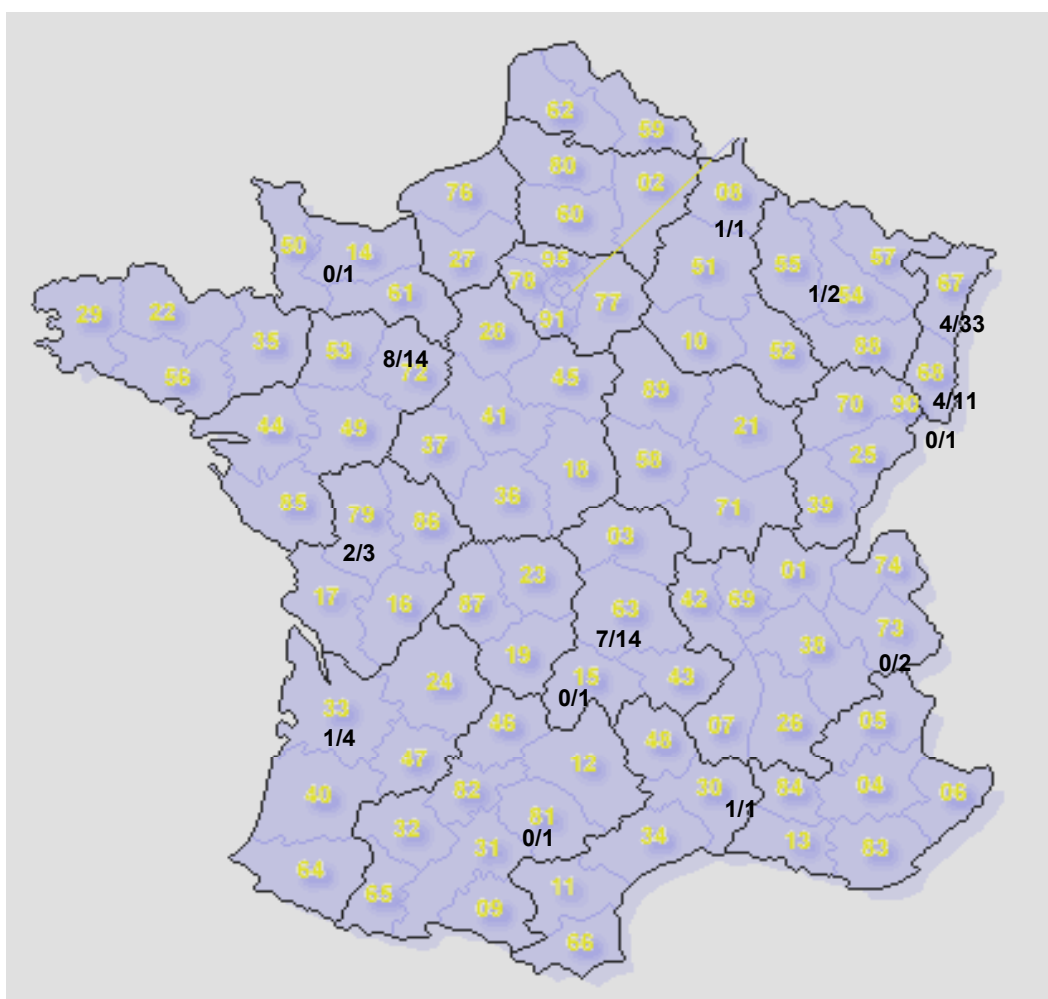


N.B. : x/y = nombre de sérums positifs / nombre total de sérums testés (hors CHU de Strasbourg)

- Étude de la synthèse intra-thécale en 2006 (hors CHU de Strasbourg)

Les neuroborrélioses représentent en France et en Europe la forme disséminée la plus fréquente de la borréliose de Lyme, soit environ 50% des formes disséminées de borréliose de Lyme. C'est aussi le stade clinique où le diagnostic clinique est le plus difficile suite à la diversité des signes cliniques. La biologie peut être d'une grande aide pour poser ce diagnostic car la mise en évidence d'une synthèse intra-thécale spécifique de *B. burgdorferi* permet de différencier une infection asymptomatique (cicatrice sérologique avec passage passif d'anticorps dans le LCR) d'une neuroborréliose et fait partie des critères européens nécessaires pour poser ce diagnostic.

Nous avons montré en 2005 que l'étude de la synthèse intra-thécale anti *B. burgdorferi* avait une excellente spécificité (97%) et une bonne sensibilité (80%) et que c'est actuellement le paramètre biologique le plus sensible pour diagnostiquer une neuroborréliose. Dans le cadre de nos conseils aux professionnels de santé, nous avons diffusé l'intérêt de cet outil et le protocole pour le réaliser. Parallèlement à la diffusion de ce protocole, nous avons réalisé en 2006, 89 études de ce paramètre pour différents laboratoires (principalement CH et CHU, hors CHU de Strasbourg) dont l'origine géographique figure sur la carte ci-dessous contre, 41 analyses faites en 2005, soit une augmentation de ce paramètre de 46% en un an.



N.B. : x/y = nombre de synthèses intra-thécales positives / nombre total de synthèses intra-thécales testées (hors CHU de Strasbourg)

La proportion de positif est restée la même, autour de 25% permettant en 2006 de poser un diagnostic de certitude de neuroborréliose pour 21 patients. Les valeurs d'index s'échelonnaient entre 0,8 et 40 (normale $\leq 1,5$).

- Participation à la surveillance épidémiologique

Nous avons participé en 2006 à l'observatoire de la borréliose de Lyme en Limousin mis en place et piloté par la CIRE d'Orléans. Dans ce cadre, nous avons contrôlé pour les laboratoires libéraux et hospitaliers qui le désiraient, les sérologies de Lyme qu'ils nous ont adressées.

Nous avons aussi réalisé les sérologies complémentaires en effectuant notamment pour eux la recherche d'une synthèse intra-thécale spécifique anti-*Borrelia* afin de mieux documenter les cas de neuroborrélioses qui seront inclus dans l'étude. Quarante-neuf sérologies par ELISA et/ou par immuno-empreinte ont ainsi été réalisées gracieusement pour les LABM de cette région.

- Expertise de prélèvements PCR pour la Slovénie

Les méthodes de détection d'ADN de *B. burgdorferi* sensu lato par PCR en temps réel et de typage de *Borrelia* par sondes fluorescentes que nous avons mises au point et validées l'an dernier ont été appliquées à des ADN extraits de prélèvements humains de patients infectés en Slovénie. Au total, 85 échantillons de LCR provenant de patients atteints de neuroborréliose et de plasma de patients prélevés au stade précoce de la maladie ont été testés. Nous avons obtenu 6 ADN de LCR positifs et 19 échantillons de plasma positifs, validant notre méthode sur ce type d'échantillon peu utilisé dans la littérature.

Parmi les 6 LCR positifs, 4 étaient positifs à *B. garinii*, 2 étaient positifs à *B. afzelii* et pour un LCR, l'espèce n'a pu être déterminée. Cette répartition de la fréquence des espèces est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature en Europe avec une prédominance de *B. garinii* dans la neuroborréliose dans un pays où *B. afzelii* est l'espèce prédominante présente dans les tiques, comme dans le Nord-Est de la France.

Parmi les 19 plasma positifs, 11 étaient positifs à *B. afzelii*, 4 étaient positifs à *B. garinii*, un était positif à *B. lusitaniae* et pour 3 LCR, l'espèce n'a pu être déterminée. Cette répartition de la fréquence des espèces est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature concernant ce pays où *B. afzelii* est l'espèce prédominante présente dans les tiques. Nous avons par ailleurs montré pour la première fois que *B. lusitaniae* pouvait être détectée dans le sang circulant. Ceci indique que cette espèce nouvellement décrite comme pathogène pour l'homme (impliquée dans l'érythème migrant) peut vraisemblablement être à l'origine de manifestations disséminées et doit donc être recherchée dans les manifestations secondaires de la maladie.

3/ Activités de surveillance:

3.1. Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le CNR (Laboratoire des spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

Définitions des cas certains: selon les recommandations de l'EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis)

- Érythème migrant : Lésion cutanée érythémateuse ≥ 5 cm , avec centre clair et s'étendant de façon concentrique avec une bordure intensément colorée.
Pas de sérologie exigée pour la confirmation.

Ou

- Manifestation disséminée typique ou compatible ET sérologie *Borrelia* positive :
 - Lymphocytome cutané bénin
 - Acrodermatite chronique atrophiante
 - Neuroborréliose : Méningo-radiculite douloureuse, atteinte des nerfs crâniens en particulier le VII. Pléiocytose dans le LCR, sérologie positive dans le sérum et le LCR et production intra-thécale d'anticorps spécifiques (*).
 - Arthrite : monoarthrite le plus souvent, et siégeant préférentiellement au niveau des grosses articulations.
 - Manifestations cardiaques
 - Manifestations oculaires

(*) La synthèse intra-thécale d'anticorps spécifiques n'a pas pu être réalisée pour tous les cas de neuroborréliose considérés comme certains dans ce rapport. L'existence d'une pléiocytose du LCR associée à une sérologie positive dans le LCR et le sérum a été considérée comme critère suffisant.

3.1.1 Étude clinique prospective en Auvergne (données recueillies par le CNR, Laboratoire des spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

Le réseau de médecins initié en 2004 dans les 4 départements de la région a été maintenu et les correspondants ont été à nouveau sollicités pour la transmission de leurs données au CNR.

Tableau 3.1.1a: Participation des médecins en Auvergne

		Puy-de-Dôme (63)	Cantal (15)	Allier (03)	Haute-Loire (43)
lors que la parti- cipa- tion médi- cale en Au-	A				
	Médecins contactés	763	310	410	227
	Réponses favorables	115	98	63	8
	Médecins ayant déclaré des cas	42	29	26	2
	Médecins n'ayant pas vu de cas	60	60	33	4
	Sans suite	13	9	4	2
	Taux de participation	13,4 %	28,7 %	14,4 %	-

vergne (Tableau 3.1.1a) a été équivalente par rapport à 2005, le nombre de cas déclarés a augmenté (151 cas certains en 2006 *versus* 124 en 2005). C'est toujours dans la Haute-Loire que le taux de participation des médecins est le plus faible, empêchant cette année encore l'estimation de l'incidence de la maladie dans ce département (2 cas certains avec érythème migrant ont été déclarés en 2006 en Haute-Loire).

Initialement 284 médecins se sont déclarés volontaires pour assurer la surveillance dans la région Auvergne en 2006, mais 28 d'entre eux n'ont finalement pas renvoyé de fiches de renseignements. 78 % des médecins participant étaient des généralistes, 6 % des pédiatres 5% des dermatologues, 3 % des rhumatologues et 2 % des neurologues. A noter que des médecins et biologistes hospitaliers ont également participé à ce travail.

En Auvergne, sur les 157 médecins n'ayant pas vu de cas de borréliose de Lyme, 106 ont signalé avoir suivi des patients après piqûres de tiques. La très grande majorité d'entre eux (89 %) a effectué une simple surveillance, sans traitement antibiotique.

Tableau 3.1.1b Incidence et caractéristiques cliniques de la borréliose de Lyme en Auvergne

Caractéristiques	Puy-de-Dôme (n = 83)	Cantal (n = 44)	Allier (n = 22)
Incidence de la maladie / 100 000 hab. [Intervalle de confiance]	103 [69-136]	102 [70-133]	44 [29-60]
Âge			
Moyenne [extrêmes]	50 [1-88]	50 [8-81]	51 [16-66]
Sexe Homme (%)	32 (39)	20 (45)	5 (23)
Signes Cutanés (%)			
Érythème Migrant (EM)	46 (55)	33 (75)	14 (64)
EM avec signes accompagnants	19 (23)	6	5
Acrodermatite Chronique Atrophiante (ACA)	1	-	2
Lymphocytome Cutané Bénin (LCB)	1	-	-
EM multiple	1	-	-
EM + signes neurologiques certains	3	2	-
EM + Radiculite probable LCR non fait	4	-	1
Signes Neurologiques			
Paralysie faciale	1	-	-
Radiculite	2	-	-
Méningoradiculite	2	4	-
Polyradiculonévrite	1	-	-
Signes Rhumatologiques			
Arthrite genou	3	-	-
Polyarthrite	1	1	-
Arthrite+ Radiculite possible LCR non fait	1	-	-
Piqûre de tique précédant le diagnostic (%)	55 (66)	30 (68)	9 (41)
Siège de la piqûre			
Membre inférieur	27 (50)	12 (40)	4 (44)
Membre supérieur	7 (13)	1	1
Autres	10 (18)	5(17)	-
Non précisé	11 (20)	12 (40)	4
Durée d'attachement			
<12 h	3 (5)	0	-
12 h-24 h	8 (15)	1	2 (22)
24-72h	6 (11)	1	2
Non précisée	38 (69)	28 (93)	3

Compte tenu de la population de chacun des départements, du nombre de cas certains et du nombre de médecins participants, l'incidence estimée en 2006 va de 44/100 000 habitants dans l'Allier à 103 /100 000 habitants dans le Puy-de-Dôme. Dans les deux départements du Cantal et du Puy-de-Dôme, l'incidence estimée a sensiblement augmenté par rapport à 2005 (respectivement 86 et 72/100 000 en 2005), alors qu'elle est restée stable dans l'Allier.

Les caractéristiques cliniques des 149 cas certains recensés dans 3 départements d'Auvergne figurent dans le tableau 3.1.1b.

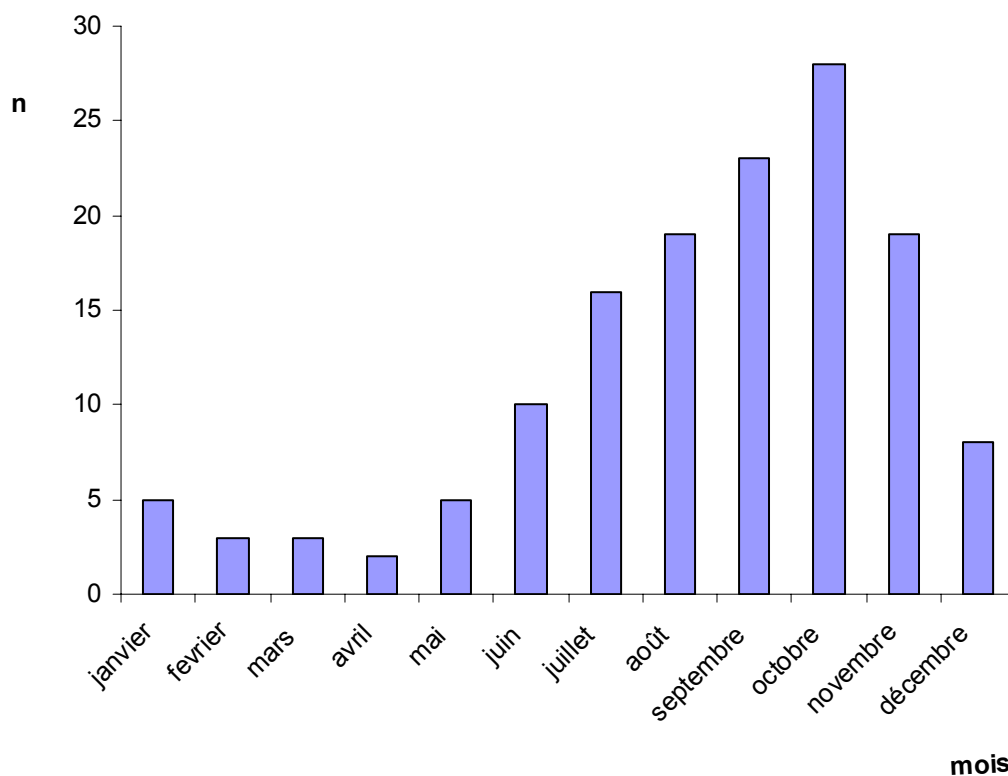
Dix cas certains de neuroborréliose (6,7 %), 6 cas avec arthrite ont été signalés et la très grande majorité des patients présentait un EM (89 % des patients) isolé ou associé à d'autres signes. Les autres manifestations cutanées ont été rares puisque seuls trois ACA et un LCB ont été signalés.

Dix autres cas de neuroborréliose ont été considérés comme probables car l'analyse du LCR n'avait pas été réalisée. L'observance des critères de l'EUCALB nous contraint très vraisemblablement à sous-estimer l'incidence de ce type de manifestation.

Sur les 136 cas avec EM, 71 (53 %) ont eu une demande de sérologie qui s'est révélée positive en ELISA dans 47 cas (66 %), le plus souvent sans confirmation par un WB. La taille de l'EM (entre 5 et 30 cm) était renseignée dans 54 % des cas.

Lorsque le patient rapporte un antécédent de piqûre, la durée d'attachement de la tique est inférieure à 24h dans 15 % des cas.

Figure 3.1.1c Répartition des cas de borréliose de Lyme en Auvergne



La majorité des diagnostics ont été faits entre juillet et novembre. Le pic de fréquence en 2006 apparaît donc un peu retardé par rapport à l'année 2005 pendant laquelle le pic était survenu entre juin et septembre.

3.1.2 Étude clinique prospective dans la Meuse (données recueillies par le CNR, Laboratoire des spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

Nous avons poursuivi pour la cinquième 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, soit un taux de participation de 17 %. Comme en Auvergne, le taux de participation des médecins est comparable à celui de 2005 et le nombre de cas certains déclarés en augmentation (44 versus 35). Les médecins généralistes représentent la majorité (63 %) des médecins participants.

Tableau 3.1.2 : Incidence et caractéristiques cliniques de la borréliose de Lyme dans la Meuse

Caractéristiques	Meuse (n = 44)
Incidence de la maladie / 100 000 hab. [Intervalle de confiance]	135 [84-187]
Age Moyenne [extrêmes]	57 [6-84]
Sexe Homme (%)	29 (66)
Signes Cutanés (%)	
EM	31 (70)
EM avec signes accompagnants	5 (11)
ACA	-
LCB	-
EM multiple	-
EM + signes neurologiques certains	2
EM + Radiculite probable LCR non fait	-
Signes Neurologiques	
Paralysie faciale	-
Radiculite	-
Méningoradiculite	7
Polyradiculonévrite	1
Signes Rhumatologiques	-
Piqûre de tique précédant le diagnostic (%)	29 (66)
Siège de la piqûre	
Membre inférieur	14 (48)
Membre supérieur	4 (14)
Autres	5 (17)
Non précisé	6 (21)
Durée d'attachement	
<12 h	1 (3)
12 h-24 h	4 (14)
24-72h	3 (10)
Non précisé	21(72)

Comme dans le Puy-de-Dôme et le Cantal, l'incidence dans la Meuse a augmenté par rapport à 2005 année pendant laquelle elle était estimée à 106 /100 000 habitants. Cette augmentation s'associe à une augmentation du nombre des nymphes collectées en 2006 par rapport à 2005 (cf. chapitre sur la surveillance du vecteur).

Comme en Auvergne, la majorité des médecins ayant suivi des patients après piqure de tiques n'ont pas traité.

Les caractéristiques cliniques des 44 cas certains figurent sur le tableau 3.1.2 Un taux élevé de neuroborréliose (8 cas soit 18 %) a été déclaré et 86 % des patients ont présenté un EM. Un cas probable de radiculite n'a pas pu être retenu faute d'analyse du LCR.

Sur les 38 cas avec EM, 20 (53 %) ont eu une sérologie qui s'est révélée positive en ELISA dans 14 cas (70 %). Comme en Auvergne, la confirmation par WB a rarement été obtenue. La taille de l'EM (entre 5 et 30 cm) était renseignée dans 55 % des cas.

Là encore le nombre de cas pour lesquels la tique est restée attachée moins de 24h n'est pas négligeable (17%).

3.1.3 Étude clinique prospective en milieu hospitalier :

Centre Hospitalier de Charleville-Mézières :

En 2006, nous avons bénéficié de l'aide du Dr. Penalba qui nous a envoyé les cas de borréliose de Lyme du service de médecine A du CH de Charleville-Mézières.

Sur 11 cas certains, 4 patients présentaient une forme neurologique. Sur ces 4 neuroborrélioses, 3 ont été diagnostiquées par la synthèse intra-thécale qui est effectuée localement. La collaboration avec ce centre hospitalier va être poursuivie.

Région parisienne et Bretagne

Les résultats de sérologie ainsi que les fiches de renseignements épidémiocliniques nous ont été fournis par le Dr. Nadget Benhaddou, biologiste du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Cochin à Paris et le Dr. Brigitte Degeilh, biologiste du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes.

Tableau 3.1.3 : Caractéristiques des cas certains de borréliose de Lyme observés en milieu hospitalier en région parisienne et Bretagne

Caractéristiques	CHU Cochin (n = 51)	CHU Rennes (n=24)
Age		
Moyenne [extremes]	45 [3-85]	41 [2-75]
Sexe Homme (%)	19 (37)	10 (42)
Signes Cutanés (%)		
Érythème Migrant (EM)	15 (29)	6 (25)
EM avec signes accompagnants	12 (23)	4
Acrodermatite Chronique Atrophiante (ACA)	2	1
Lymphocytome Cutané Bénin (LCB)	1	-
EM multiple	-	1
EM + signes neurologiques certains	2	4
EM + Radiculite probable LCR non fait	5	-
Signes Neurologiques		
Paralysie faciale	-	2
Radiculite	-	1
Méningo-encéphalite	2	-
Méningoradiculite	5	8
Méningite	1	-
Radiculonévrite	1	-
Signes Rhumatologiques		
Arthrite	7	1
Piqûre de tique précédant le diagnostic (%)	39 (76)	10 (42)

Le laboratoire de microbiologie du CHU Cochin reçoit la plupart des demandes des hôpitaux de l'AP-HP, sauf Henri-Mondor et Saint-Antoine. Les 3932 demandes de sérologie de Lyme (3179 sérums et 753 LCR) ont permis de retenir 51 cas comme certains selon les critères de l'EUCALB. Neuf cas de neuroborréliose ont pu être confirmés par un examen du LCR alors que 5 autres patients qui présentaient des manifestations cliniques évocatrices de neuroborréliose n'ont pas eu de ponction lombaire.

Au CHU de Rennes, 667 sérums et 119 LCR ont fait l'objet d'une demande de sérologie de Lyme. Vingt-quatre cas ont été retenus comme certains. Onze patients avaient une neuroborréliose certaine et 3 une neuroborréliose probable.

Comme les années précédentes, si on peut suspecter que les formes disséminées ont été plus nombreuses en milieu hospitalier, on peut cependant regretter que, faute d'analyse du LCR, un certain nombre de formes neurologiques échappe au diagnostic.

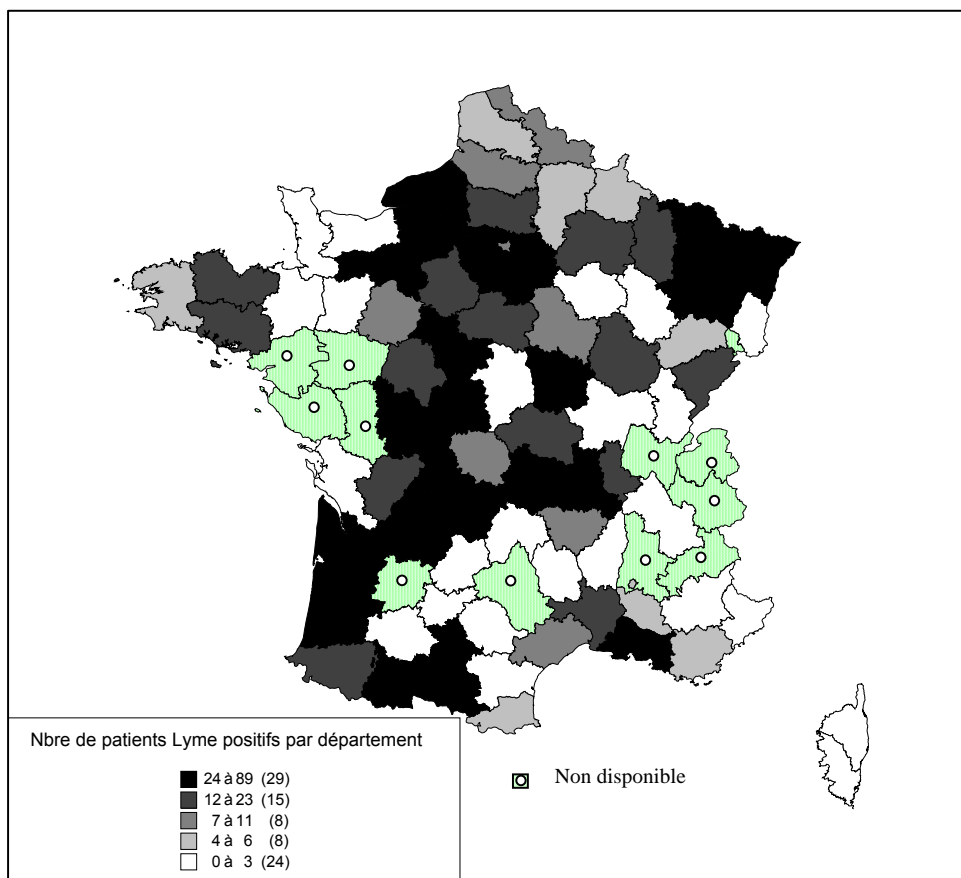
L'inclusion des patients dans notre étude en milieu hospitalier se faisant sur la demande de sérologie, tous les cas avec EM ont eu une demande de sérologie qui s'est révélée positive dans 92 % des cas. Il existe probablement un biais de recrutement en milieu hospitalier, les consultations pour borréliose de Lyme étant souvent des consultations de deuxième intention, à distance de l'épisode d'EM.

3. 1.4 Résultats du laboratoire Pasteur-Cerba

En 2006, le laboratoire Pasteur-Cerba (Dr. S. Trombert) nous a transmis les résultats des sérologies positives (ELISA et confirmation par immunoempreinte=WB). Cependant, suite à un changement de logiciel, les résultats des WB n'ont pas pu être transmis à partir du mois d'août.

Un total de 2340 sérologies correspondant à 1138 patients a été effectué. 1935 sérums ou LCR (83 %) chez 924 patients (81 %) ont été positifs (ELISA + WB). La sérologie a été positive dans 17 LCR chez 13 patients.

La répartition géographique des patients ayant une sérologie de borréliose de Lyme positive est indiquée dans la figure suivante. Il s'agit de sérologies effectuées chez des patients présentant une symptomatologie compatible et non pas d'une enquête de séroprévalence.



3. 2. Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

Cette surveillance s'effectue par analyse des fiches de renseignements cliniques et épidémiologiques qui accompagnent les échantillons qui sont adressés. Ces analyses sont alors effectuées à titre gracieux.

Ces fiches de renseignements nous ont été envoyées par des correspondants de 23 départements français métropolitains. Certaines (6%) provenaient de praticiens libéraux (médecins généralistes et dermatologues). La grande majorité des fiches, soit 94% (soit 129/137), provenait de centres hospitaliers et de disciplines cliniques variées (figure 1).

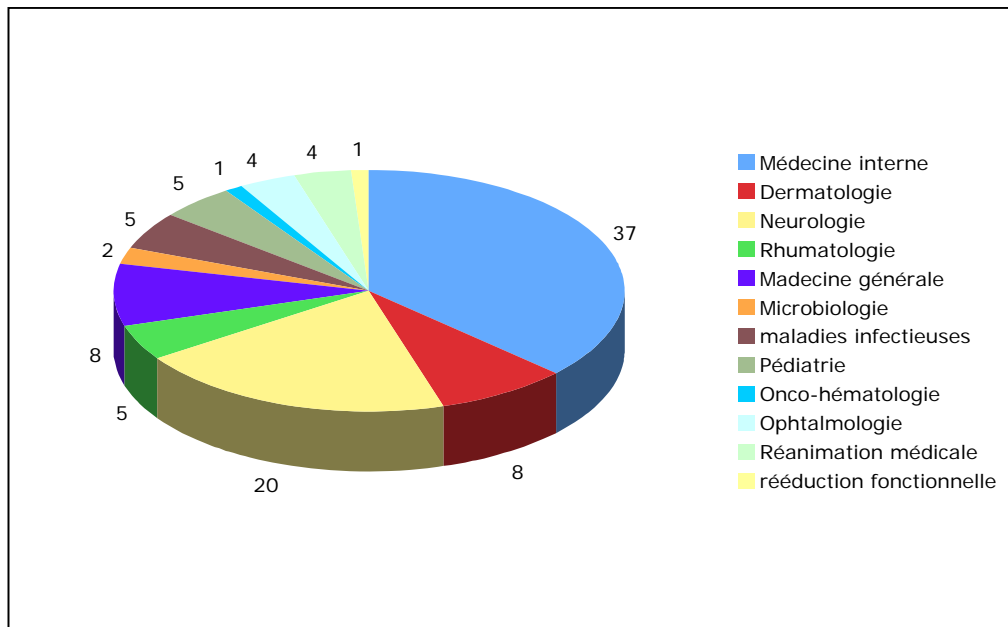


Figure 1 : Pourcentage de fiches de renseignements reçues par type de service clinique.

Au cours de l'année 2006, 145 fiches de renseignements (soit +10% par rapport à 2005) ont été reçues par le laboratoire associé au CNR des *Borrelia*. Parmi celles-ci, 135 (93%, soit + 55% par rapport à 2005) étaient exploitables, ce qui représente une amélioration notable du taux de bon remplissage des fiches, améliorant la représentativité des informations recueillies.

L'analyse de ces 135 fiches montre que le sexe ratio des patients était de 1,3, avec 55% (74/135) de cas masculins et 42% (57/135) de cas féminins. Dans 3% (4/135) des cas, cette notion n'était pas précisée sur la fiche de renseignements accompagnant l'échantillon. L'âge des patients variait de 5 à 92 ans avec une moyenne de 56 ans et une prédominance nette de cas dans les tranches d'âge de 50 à 70 ans (figure. 2).

Figure 2 : Nombre de cas renseignés par tranche d'âge des patients.

En fonction de leur contenu, ces fiches ont été réparties dans deux groupes « borréliose » ou « non borréliose », sur la base des critères diagnostiques de l'EUCALB. Au total, 56 fiches (42%) ont été retenues dans le groupe « non borréliose », et 79 fiches, retenues dans le groupe « borréliose ». Ce pourcentage de cas « non borréliose », reste élevé mais, pour la première fois depuis la mise en place de ces fiches il y a 4 ans, est inférieur au pourcentage de cas retenus dans le groupe « borréliose ». Ce résultat traduit de la part des participants, une meilleure connaissance de la maladie. La diffusion des critères diagnostiques établis par la conférence de consensus sur la borréliose de Lyme de décembre 2006, devrait permettre d'améliorer encore ces résultats en 2007.

1) Les cas de « non borréliose »

Les 56 fiches du groupe « non borréliose » proviennent de 16 départements différents. Elles correspondent à 29 hommes et à 26 femmes (1 de sexe non précisé), âgé de 12 à 86 ans (moyenne 56 ans) avec une légère prédominance des cas sexagénaires (figure 3).

Figure 3 : Nombre de patients analysés « non borréliose » par tranche d'âge

Au sein de ce groupe, 48% pratiquaient des loisirs en pleine nature (randonnée, jardinage...) et 28,5% ont des contacts avec les animaux, domestiques la plupart du temps (chat, chien). On note que 41% se disent exposés aux tiques et 32% rapportent des antécédents de piqûre de tiques, dont 2/3 de piqûre unique et 1/3 de piqûres multiples. C'est pro-

blement cette exposition et/ou ces piqûres de tiques, qui ont conduit, malgré l'absence de signes cliniques compatibles avec une borréliose de Lyme, à évoquer ce diagnostic et à nous adresser un échantillon.

Les zones anatomiques piquées étaient variées, sans prédominance d'une partie particulière du corps (tête, dos, coude, pli inguinal, scrotum, cuisse, creux poplité, jambe...). Lorsque le patient s'en souvenait, il relatait une piqûre de tiques entre le mois de février et de juillet 2006. A noter que dans environ 10% des cas, les patients relataient des piqûres de tique anciennes, datant de 2 à 15 ans. En général, la durée d'attachement des tiques n'est pas renseignée ni la présence d'un antécédent d'érythème migrant.

Concernant les symptômes observés, 23% des patients disent que leurs symptômes durent depuis plus d'un an. Pour les cas plus récents de l'année 2006, le début de la symptomatologie s'étalait de janvier 2006 à septembre 2006 et le diagnostic était évoqué en moyenne au bout de 3,5 mois.

Les symptômes observés étaient les suivants :

- Les signes généraux tels que algies, fièvre et/ou asthénie étaient rapportés par 25% au moins des patients.
- Les signes cutanés consistaient en des lésions cutanées cliniquement non compatibles avec une borréliose de Lyme : érythème fixe évoluant vers la desquamation, érythème palmo-plantaire, lésion ecchymotique, ou des lésions atypiques (lésions sclérodermiformes). Ces lésions étaient rapportées dans seulement 7% des cas. Un patient présentait une lésion à type de lymphome cutané borrélien et 2 cas étaient étiquetés à tort acrodermatite chronique atrophiante (ACA), bien que ces cas n'aient été confirmés ni par culture ou PCR ni par une sérologie positive.
- Les signes neurologiques étaient rapportés dans près de 50% des cas, dont 5% d'atteinte méningée clinique avec une lymphorachie souvent associée. Près de 45% des atteintes neurologiques consistaient en des atteintes périphériques dont 4 paralysies faciales et 17 radiculites ou polyneuropathies. Dans 10% des cas avec symptomatologie neurologique, nous avons réalisé, devant une sérologie *Borrelia* positive dans le LCR, la recherche de synthèse intra-thécale d'anticorps spécifiques anti-*Borrelia*. Les valeurs d'index, comprises entre 0,4 et 1,6, ne montraient pas de synthèse intra-thécale spécifique.

Cependant, dans un cas, l'index était nettement positif, à 3,5. Après étude de ce cas, cette positivité était une réaction croisée et était en fait due à une synthèse intra-thécale d'anticorps spécifiques anti-*Treponema pallidum*, correspondant à une neuro-syphilis. Cela illustre la nécessité de confirmer la spécificité des anticorps anti-*Borrelia* par western-blot dans le LCR aussi.

- Les signes articulaires étaient rapportés dans plus d'1/3 des cas. Il s'agissait majoritairement d'arthralgies isolées, sans arthrites (chevilles, poignets, genoux) qui ne rentrent pas, isolément, dans les critères de borréliose de Lyme. Les cas de monoarthrite, oligoarthrite ou polyarthrite étaient rarement rapportés. Les atteintes articulaires s'exprimaient par ailleurs plutôt sur le mode chronique.

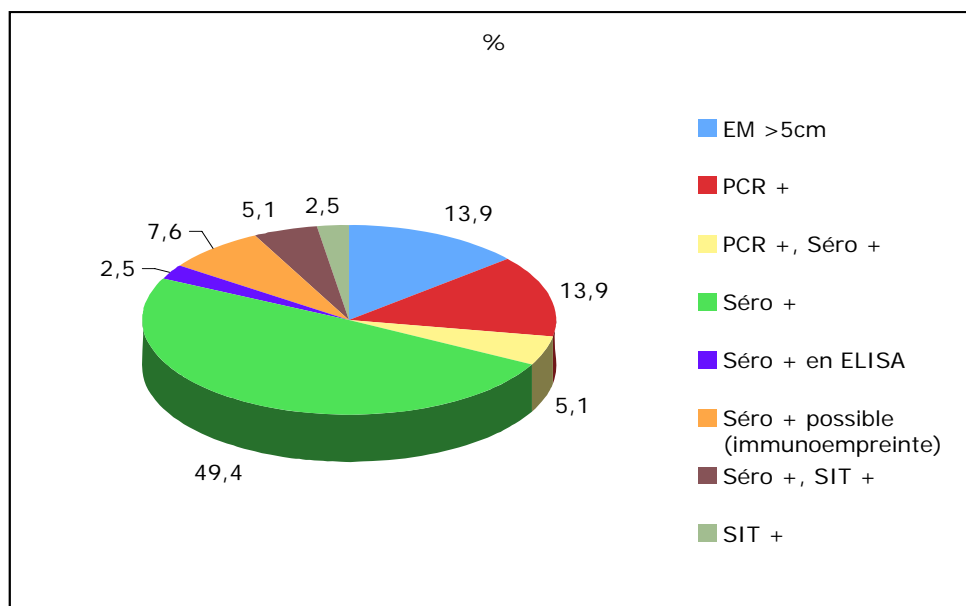
Ces cas que nous avons classés « non borréliose », étaient le plus souvent séronégatifs dans le sérum et dans le LCR. Toutes les biopsies réalisées (20%) ont été négatives tant par culture que par PCR.

Dans l'ensemble, 50% de ces cas « non borréliose » n'ont pas été traités pour une borréliose. Environ 30% des cas ont été traités par diverses antibiothérapies : amoxicilline seule ou en association, à raison d'au moins 2g/j, Augmentin à 4g/j, ceftriaxone à 2g/j, cyclines pour une durée de 10 à 30 jours.

2) Les cas de « borréliose »

Un total de 79 cas de borréliose que nous avons classés comme certains, probables ou possibles, selon les critères cliniques et biologiques collectés ont été retenus lors de l'analyse des fiches de renseignements. Parmi ces cas, la valeur des arguments bactériologiques directs et indirects dans le faisceau d'argument diagnostique est variable en fonction des techniques (neuroborréliose notamment) (fig. 4).

Plus de 70% des cas présentaient une sérologie anti *B. burgdorferi* positive. Le nombre de cas avec un diagnostic biologique direct positif était plus réduit, permettant cependant un diagnostic de certitude dans 19% des cas de borréliose. Près de 14% ont été diagnostiqués cliniquement comme certains par la présence d'un érythème migrant spécifique de l'infection à *B. burgdorferi* sensu lato.



Fréquence des critères biologiques de positivité (SIT = synthèse intra-thécale)

Dans 72,2% des cas, la sérologie intervenait ainsi dans le diagnostic :

- Comme signe associé :
 - 49,4% présentaient une sérologie + confirmée par WB
 - 0,1 % avaient une sérologie non confirmée par WB (non réalisée ou nombre de bandes insuffisant)
- Comme élément de certitude
 - 7,6 % présentaient une SIT positive isolée (index de 2 à 13)
 - 13,9% ont été diagnostiqués par EM seul
 - 18,9% ont été diagnostiqués par PCR, 5,1% avaient aussi une sérologie positive associée

Les 79 cas de ce groupe borréliose correspondaient à 45 hommes (57%), 31 femmes (39%) et de 3 patients de sexe non précisé (4%). L'âge des patients variait de 5 à 92 ans avec une moyenne d'âge de 56 ans et une prédominance nette de cas dans des tranches d'âge de 50 à 70 ans (figure. 2) et parmi les mineurs, une fréquence plus importante pour les jeunes enfants. Cette répartition correspond bien à la pyramide d'âge des patients atteints par la borréliose de Lyme en Europe.

Répartition des cas « borréliose » par tranche d'âge

Au sein de ce groupe, 66% pratiquaient une activité de loisir en pleine nature, 19% étaient en contact avec des animaux (domestiques le plus souvent). Un antécédent de piqûre de tiques était signalé par 57% des patients. Près de 31% des patients disaient s'être fait piquer par un ou plusieurs tiques avant leur infection. Il s'agissait d'une piqûre unique dans 38% des cas et de piqûres multiples dans 62% des cas. Dans la majorité des cas, ces piqûres de tique ont eu lieu entre avril et octobre de l'année 2006. Les zones anatomiques piquées étaient variées allant de la tête aux pieds sans prédominance nette. L'estimation de la durée d'attachement des tiques variait de quelques heures à quelques jours.

Seulement 14% des patients rapportaient des antécédents d'érythème migrant. Le début des premiers symptômes pouvait remonter, dans environ 6% des cas, à plusieurs années (jusqu'à 14 ans). Dans la majorité des cas, le début des symptômes datait de l'année 2006, de février à décembre. Pour ces cas d'apparition récente, le diagnostic était posé en moyenne en moins de 2 mois.

Les symptômes observés étaient les suivants :

- Les signes généraux étaient présents dans moins d'un cas sur trois : 28% se plaignaient d'asthénie, 22% de douleurs et 13% de fièvre entre 38°C et 40°C.
- Les manifestations cutanées à type d'érythème migrant étaient présentes dans près de 32% des cas (25/79). Près de 60% (14/25) des érythèmes migrants ont été biopsiés et 1/3 de ceux-ci se sont révélés positifs en PCR. Il s'agissait dans les cas de *Borrelia afzelii* après typage. Rarement, dans 16% des cas, en l'occurrence pour 4 patients sur 25, des troubles neurologiques étaient associés, à type de paralysie faciale, de radiculite ou de méningite. Ces troubles étaient associés à une lymphorachie à 100 cellules/mm³ de LCR en moyenne.

Lorsqu'il était renseigné, le traitement de ces érythèmes migrants, isolés ou non, consistait le plus souvent en une cure d'amoxicilline, 1 à 3 g/j, pendant 21 à 30 jours. La doxycycline était utilisée trois fois moins souvent, à des doses de 200 mg/j, pour une durée pouvant aller de 15 à 21 jours. La ceftriaxone était utilisée dans la même proportion, à 1x2g/j pendant 15 à 30 jours, notamment pour les cas avec troubles neurologiques associés.

- Sur l'ensemble des cas du groupe « borréliose », 45% (36/79) présentaient des manifestations neurologiques. Parmi les 30 cas ayant fait l'objet d'une analyse du LCR, on observait 5 cas avec méningite clinique dont 3 avec des signes biologiques associés, 1 cas d'atteinte méningée biologique sans signe clinique et 19 cas d'atteinte périphérique dont 4 cas de paralysie faciale et 13 cas de radiculite pré-

dominante aux membres inférieurs, et 5 atteintes centrales à type d'encéphalite, de démence ou de comitialité. Chez 60% de ces 36 patients, la sérologie anti-*Borrelia burgdorferi* était positive en ELISA, confirmée par immuno-empreinte. Chez 25% de ces 36 patients, la recherche d'une synthèse intra-thécale spécifique d'anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* a été pratiquée. Sa positivité, dans 70% des cas, a permis de confirmer le diagnostic, notamment en cas d'atteinte neurologique périphérique, peu spécifique de la borréliose de Lyme.

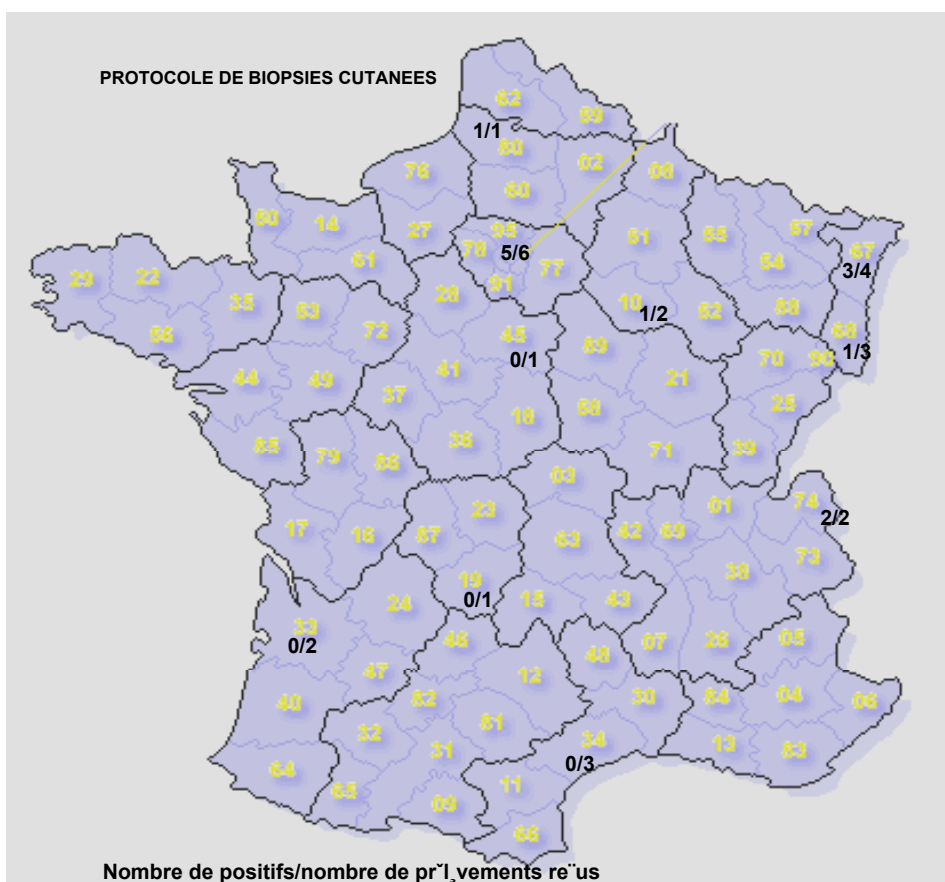
Un traitement a été administré à 58% de ces patients. Il s'agissait de ceftriaxone dans 2/3 des cas, à 2g/l pendant 15 à 30 jours. Le deuxième traitement par ordre de fréquence décroissante, était l'amoxicilline, à 2 à 3 g/j pendant 15 à 20 jours.

- Des manifestations articulaires étaient signalées par 24% des patients du groupe « borréliose ». Dans plus de la moitié des cas, il s'agissait d'arthralgies seules, ne rentrant pas à elles seules dans les critères de maladie de Lyme. Dans l'autre moitié des cas, il s'agissait de mono- ou d'oligo-arthrite, un seul cas de polyarthrite a été signalé. Le mode d'évolution de ces arthrites, aiguë ou chronique, n'était pas souvent renseigné. Dans près de 74% des cas (18/79), la sérologie était positive, confirmée par immuno-empreinte. Près de 84% des patients ont été traités par antibiothérapie. Il s'agissait d'amoxicilline dans la moitié des cas, à 2g/j et pour au moins 21 jours. Dans 25% des cas, les patients ont été traités par cyclines et dans 25% des cas, par ceftriaxone, 1 x 2g/j pendant un minimum de 21 jours.

Recherche de Borrelia burgdorferi sensu lato dans les biopsies cutanées humaines par culture sur milieu spécifique BSK et par PCR

Ces prélèvements ont été analysés dans le cadre du protocole « biopsie cutanée ». Chaque prélèvement analysé dans le cadre de ce protocole était accompagné d'une fiche de données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques.

Durant l'année 2006, nous avons mis en culture et testé par PCR, 25 prélèvements de lésions suspectes soit d'érythème migrant (EM) (18 cas), soit d'acrodermatite chronique atrophique (ACA) (3 cas), de lymphocytome cutané bénin (2 cas) ou de lésions de morphee (2 cas). Cinq des 25 prélèvements analysés nous ont été adressés par des dermatologues libéraux. L'origine géographique des prélèvements qui nous ont été adressés dans ce cadre est représentée sur la carte ci-dessous.



N.B. : x/y = nombre de positifs / nombre total de prélèvements testés

Parmi les prélèvements reçus, la culture n'a été positive que dans un cas, elle était contaminée dans 3 cas, les autres biopsies sont restées négatives malgré une culture pendant 8 semaines. Une souche a été isolée d'une lésion d'EM. Cette biopsie cutanée était aussi positive en PCR pour *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Ce patient de 53 ans, habitant dans l'Essonne, exposé aux tiques mais sans notion de piqûre de tiques récente, présentait un EM de 40 cm de diamètre au niveau du dos évoluant depuis plus de 3 mois, sans manifestation associée. La souche isolée a été adressée au CNR des *Borrelia* pour identification. Il s'agissait d'une souche de *Borrelia afzelii*.

A l'inverse, la recherche de *Borrelia burgdorferi* sensu lato par PCR a été nettement plus sensible. Ainsi 13 des 25 prélèvements testés (52%) étaient positifs par PCR.

Parmi les 18 biopsies d'EM testées, 12 (66 %) étaient positives par PCR en temps réel selon la méthode mise au point au laboratoire associé au CNR *Borrelia*, alors qu'une seule était conjointement positive en culture. Cette sensibilité de la PCR sur biopsie d'EM correspond à ce qui est rapporté dans la littérature où la sensibilité de la PCR sur biopsie d'EM chez des patients européens varie de 40 à 70%. Ce résultat est aussi en faveur d'une authenticité du diagnostic d'EM porté par les médecins préleveurs. Dans tous les cas analysés ici, le diagnostic avait été posé par un dermatologue. Nous avons ensuite typé par hybridation avec les sondes spécifiques des différentes espèces de *Borrelia*, l'espèce responsable de ces lésions (onze des douze espèces testées). Dans tous les cas, il s'agissait de *B. afzelii*. Aucune biopsie n'était positive pour plusieurs espèces de *Borrelia*.

Nous avons analysé les données cliniques des 13 patients ayant un EM positif par PCR. Ceux-ci vivaient dans la région parisienne (5 fois), dans le Bas-Rhin (3 fois), en Haute-Savoie (1 fois), dans le Haut-Rhin (1 fois), dans l'Aube (1 fois) et dans la Somme (1 fois). L'âge moyen de ces patients était de 55,4 ans (25-83). L'EM siégeait au niveau des mem-

bres inférieurs (5 fois), du dos (4 fois), de l'abdomen (1 fois), des membres supérieurs (3 fois). Deux patients présentaient des signes généraux associés et trois présentaient des signes cliniques de dissémination : érythème migrant multiple (1 fois), une arthrite (1 fois), une neuroborréliose (1 fois). Il est à noter que la moitié seulement de ces patients rapportait une exposition aux piqûres de tiques et la notion de piqûre précédant l'EM n'a été retrouvée à l'interrogatoire qu'une seule fois. Ce pourcentage très faible indique que ces patients ne réalisent probablement pas de prévention primaire par inspection cutanée après une activité de loisirs.

Parmi ces 13 patients présentant un EM confirmé par PCR, une sérologie avait été prélevée dans 11 cas. Cette sérologie était négative en IgG et en IgM pour 5 des 11 patients (45%), positive en IgM seulement pour 3 patients (27%) et positive en IgG pour 5 patients. Pour deux des patients, la positivité de la sérologie IgG sans IgM est probablement à rapporter à une cicatrice d'une infection ancienne antérieure à l'EM. Le faible taux (27%) de positivité en IgM confirme l'inutilité de la sérologie pour étayer le diagnostic d'EM et le risque de rejeter ce diagnostic devant une sérologie négative (45%) qui serait mal interprétée. Ces sérologies avaient été prélevées à notre demande dans le cadre du protocole « biopsie cutanée » afin de constituer d'une sérothèque de cas d'EM certains confirmés par culture et/ou PCR.

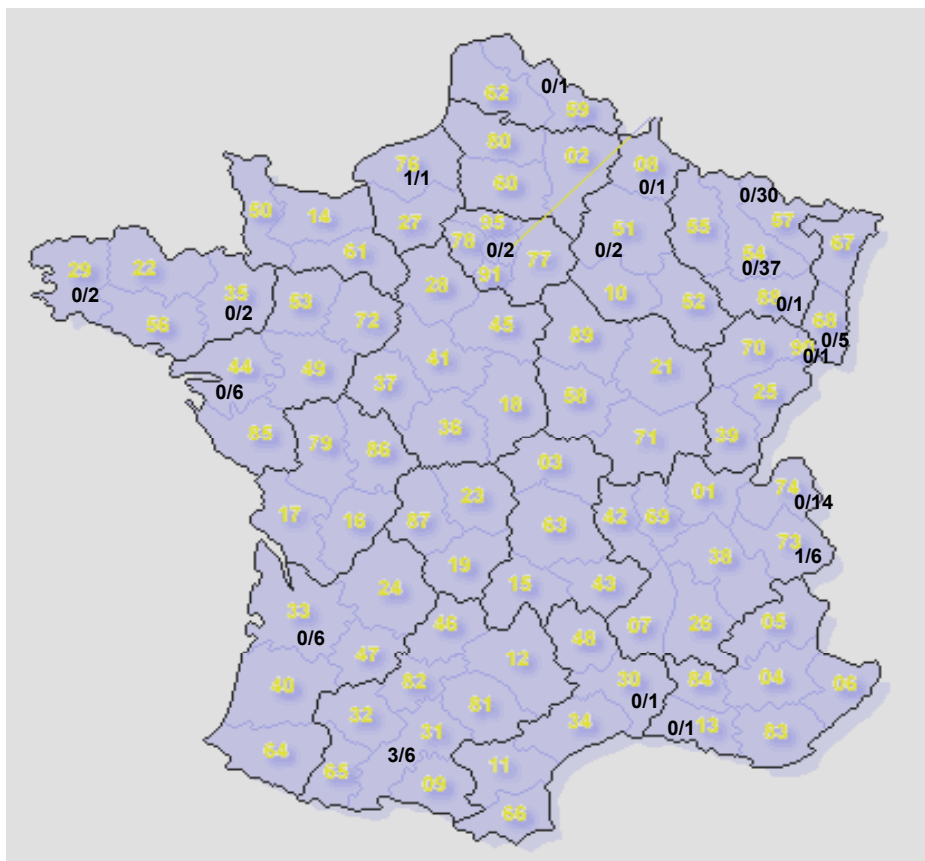
Parmi les trois biopsies prélevées sur lésion suspecte d'acrodermatite chronique atrophique (ACA), une a été positive en PCR en temps réel, alors que la culture était négative sur ces trois prélèvements. Dans les trois cas, il s'agissait de patientes de plus de 60 ans. Pour deux des patientes, la lésion siégeait sur la cuisse et il existait un antécédent d'EM au niveau de la lésion d'ACA. Dans un cas, il existe une atteinte neurologique associée. Deux des patientes ont été traitées par cyclines, la troisième par ceftriaxone, ce qui correspond aux recommandations actuelles pour les ACA.

La patiente positive par PCR, 73 ans, sans notion de piqûre de tiques récente, résidait en Haute-Savoie, avait préalablement présenté en août 2003 un EM de la cuisse gauche de 20 cm de diamètre environ, qui n'avait pas été traité. La lésion d'acrodermatite siégeait au niveau du site de l'EM. Cette acrodermatite était au stade inflammatoire d'ACA et évoluait depuis un mois au moment du prélèvement qui a été fait avant antibiothérapie. La patiente a été traitée par cyclines per os pendant 4 semaines avec une bonne régression des lésions. Nous avons typé l'espèce responsable de ces lésions. Il s'agissait de *B. afzelii*, espèce très largement majoritaire dans la littérature dans les lésions.

La recherche de *Borrelia* a été effectuée pour les deux suspicions de lymphocytome cutané bénin, dont un seul a été confirmé par l'histologie ainsi que pour les deux prélèvements de morphee. Pour aucun de ces quatre prélèvements, il n'a été possible ni par culture ni par PCR de confirmer une origine borrélienne de ces lésions.

Recherche de Borrelia burgdorferi sensu lato dans les autres échantillons humains par PCR uniquement

Ces prélèvements ont été analysés à titre gracieux sous réserve de l'obtention d'une fiche de renseignements remplie. L'origine géographique des prélèvements qui nous ont été adressés dans ce cadre est représentée sur la carte ci-dessous.



N.B. : x/y = nombre de positifs / nombre total de prélèvements testés

Durant l'année 2006, nous avons analysé par PCR 35 prélèvements humains provenant d'autres centres hospitaliers que le CHU de Strasbourg qui ont été adressés au laboratoire associé au CNR pour recherche de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Nous avons ainsi analysé :

- 23 liquides céphalo-rachidiens,
- 10 prélèvements synoviaux
- deux humeurs aqueuses chez des patients présentant une uvéite

Cinq prélèvements étaient positifs en PCR. Il s'agissait :

- de deux LCR. Dans un cas, nous avons pu déterminer par typage moléculaire, l'espèce de *Borrelia* responsable, il s'agissait, de *B. burgdorferi* sensu stricto (patient domicilié à Lourdes). Dans l'autre cas, le signal en PCR était trop faible pour permettre un résultat interprétable. Le premier patient, sous immuno-suppresseurs pour une greffe hépatique, a présenté une méningo-radiculite bilatérale des membres supérieurs qui n'a été que partiellement régressive après 4 semaines de ceftriaxone IV. Le deuxième patient, retraité circulant entre Londres et la région toulousaine, a présenté une méningite lymphocytaire avec crises comitiales, traité avec succès par ceftriaxone IV.
- de trois prélèvements articulaires de patients atteints de mono-arthrite de Lyme au niveau du genou. Dans les trois cas, l'espèce de *Borrelia* responsable a été déterminée par typage moléculaire. Il s'agissait dans deux cas de *B. burgdorferi* sensu stricto (un patient domicilié en Savoie, l'autre en Seine-Maritime) et dans un cas de *B. garinii* (patient domicilié dans le Haut-Rhin). L'évolution a été dans les trois cas favorable après traitement par cyclines dans deux cas et par ceftriaxone IV dans l'autre cas.

Mise en place d'une étude sur le taux d'infection des renards par les bactéries transmises par piqûre de tiques

La population de renards s'accroît en Alsace et ceux-ci pénètrent de plus en plus souvent dans la ville. En collaboration avec le laboratoire Vétérinaire Départemental du Bas-Rhin, un réseau de piégeurs de ce réservoir de zoonoses s'est mis en place, basé sur le réseau SAGIR, l'ONF et l'ONC et couvrant tout le département. Les renards capturés sont euthanasiés, du sang est prélevé pour recherche de ces pathogènes par sérologie et par PCR sur plasma.

En 2006, nous avons obtenu du Pr. Boulouis du laboratoire de Microbiologie de Maisons-Alfort quelques sérums témoins de chiens infectés et des sérums de chiens citadins et ruraux ont été collectés auprès des vétérinaires d'Alsace afin de développer une sérologie ELISA anti *Borrelia* chez le renard et le chien qui présente de fortes similitudes antigéniques avec le renard.

Parallèlement, une campagne de prélèvement a commencé avec la fédération des chasseurs, permettant de collecter à la fin décembre 2006, 14 sérums et un plasma exploitables de renard sur le Bas-Rhin.

3.3. Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* par le CNR (Laboratoire des spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

La surveillance de la borréliose de Lyme est rendue difficile par le caractère non systématique de la déclaration des cas, les signes cliniques très polymorphes et l'absence de critères biologiques formels. La surveillance du vecteur, la tique *Ixodes ricinus*, représente donc un moyen d'approcher l'épidémiologie de la maladie humaine et d'évaluer les risques. Depuis sa création, le CNR des *Borrelia* effectue une estimation de la densité des tiques et de leur taux d'infection par *B. burgdorferi* sl. dans différentes régions de France dans l'objectif 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. En 2006, cette évaluation a été menée dans 3 régions : le Limousin, la Basse Normandie et la Meuse.

3.3.1 Choix des sites et méthodes

Le Limousin avait été choisi en 2005 car la CIRE Centre y avait débuté une étude clinique. Même si la collaboration avec la CIRE n'a pas été poursuivie, nous avons maintenu notre étude du vecteur dans cette région.

Dans la Meuse, où nous avons poursuivi l'étude clinique, nous avons encore bénéficié des collectes de tiques du Dr. J.C Georges, qui nous confie ses données depuis 2003.

Nous avons choisi d'initier la surveillance en Normandie car le risque de borréliose de Lyme dans cette région est méconnu. L'étude clinique y débutera en 2007.

Pour les collectes de tiques (nymphe et adultes), nous avons utilisé la même méthodologie que celle habituellement adoptée par le CNR et déjà validée sur plusieurs régions (Ferquel et al., 2006). Cette méthode repose sur l'allotissement systématique de la forêt par un découpage en parcelles de 1ha à partir de cartes au 1/200000 éditées par l'IFN (Inventaire Forestier National) et représentant les types de formations végétales, et de cartes au 1/25000 éditées par l'IGN (Institut Géographique National). Ce quadrillage est réalisé à l'aide du logiciel Photoshop® et un nombre représentatif de parcelles est tiré au sort avec le logiciel Epi Info. La collecte des tiques est effectuée selon la méthode du drapeau avec relèvement tous les 10 m. Au total, 16 relèves de drapeau sont effectuées par parcelle, de façon aléatoire, donnant une surface étudiée de 160 m² par parcelle.

Calcul de la densité des tiques et du taux d'infection

Notre méthode d'échantillonnage est donc une méthode à deux niveaux, avec la parcelle de 100 m/100 m comme premier niveau et la parcelle de 10 m de long sur 1m de large comme deuxième niveau, ces deux paramètres étant sélectionnés au hasard sur le terrain. La densité des tiques (d) de l'ensemble de la forêt est estimée à partir du nombre total de tiques collectées selon la formule (Ferquel et al., 2006) :

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

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 établirons un intervalle de confiance à 95 % pour chaque collecte :

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

Où :

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, est effectuée pour chaque collecte afin de vérifier qu'il n'y a pas d'influence du collecteur.

Détection des agents pathogènes

La détection et l'identification des *Borrelia* est faite à la fois par des cultures de 16 tiques adultes et par l'extraction de l'ADN total de 20 nymphes et de 10 adultes par parcelle, suivie d'une amplification par PCR de l'espace intergénique *rrf-rrl* et d'une restriction par *MseI*. Le séquençage du produit de PCR obtenu est effectué pour toutes les souches présentant un profil atypique.

Les autres bactéries pathogènes transmises par *I. ricinus* (notamment les *Anaplasmataceae*) sont recherchées par l'amplification du gène *rrs* et séquençage.

3.3.2 Étude dans le Limousin

Nous avons débuté en 2005 l'étude écologique sur deux départements du Limousin : la Creuse et la Haute-Vienne.

A. Département de la Creuse

Dans ce département les tiques ont été collectées dans les 4 mêmes parcelles qu'en 2005.

Tableau A1. Parcelles étudiées dans le département de la Creuse en 2005 et 2006

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 châtaigniers hêtres bouleaux	pins chênes fougères	châtaigniers hêtres ronces	sapins hêtres fougères, ronces

Tableau A2. Densité et taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans la Creuse en 2006

Creuse	Avril	Mai	Juin	Juillet	Septembre	Octobre	Novembre	Total
Nymphes(n)	784	1490	1133	1766	786	258	186	6403
Dens/100 m ²	122.5	232.81	177.03	275.94	122.81	40.31	29.06	142.9
IC	[89-156]	[136-330]	[123-231]	[234-318]	[102-143]	[32-48.4]	[14.4-43.7]	
Adultes (n)	63	129	87	212	76	43	12	622
Dens/100 m ²	9.84	20.15	13.59	33.13	11.9	6.7	1.88	13.88
IC	[1.43-18.3]	[8.6-31.7]	[0.6-26.6]	[17.1-49.1]	[4.3-19.5]	[0.65-13.4]	[0.9-2.9]	
Nymphes Taux d'infection	10/80 13 %	16/80 20 %	7/80 9 %	8/80 10%	12/80 15%	12/80 15%	11/81 13.6%	76/561 13.5%
Adultes Taux d'infection	14/64 22 %	7/80 9%	3/58 5%	18/95 19%	16/68 24%	10/41 24.4%	0/12 0	68/418 16.3%
Densité des Nymphes infectées Dens/100 m ²	16	47	16	27	18	6	4	Moy. 19

B. Département de la Haute-Vienne

Dans ce département les tiques ont été collectées dans les 3 mêmes parcelles qu'en 2005.

Tableau B1. Parcelles étudiées dans le département de la Haute-Vienne en 2005 et 2006

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 sapins bouleaux ronces	Châtaigniers sapins	Chênes hêtres ronces

Tableau B2 : Densité et taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans la Haute-Vienne en 2006.

Haute-Vienne	Avril	Mai	Juin	Juillet	septembre	octobre	novembre	Total
Nymphes(N)	432	658	642	676	275	103	102	2888
Dens/100 m ²	90	137.08	133.75	140.83	57.29	21.46	21.25	85.95
IC	[15.7-164.3]	[11.3-263]	[29.3-238.2]	[36.1-245.6]	[24.9-89.7]	[12.1-30.8]	[15.9-26.6]	
Adultes (N)	21	27	35	26	12	7	2	130
Dens/100 m ²	4.37	5.63	7.29	5.42	2.5	1.46	0.42	3.87
IC	[0.44-8.3]	[0.9-10.3]	[0.5-14.1]	[1.8-9]	[0-5.74]	[0.38-2.5]	[0-1.23]	
Nymphes								
Taux d'infection	5/60 8%	8/60 13.3%	7/60 11.7%	9/60 15 %	8/60 13.3%	7/57 12.3%	3/60 5%	47/417 11.3%
Adultes								
Taux d'infection	2/21 10%	7/26 26.9%	5/33 15.2%	3/26 12%	1/12 8.33%	2/7 28.6%	0/2 0	20/127 15.7%
Densité des nymphes infectées								
Dens/100 m ²	7	18	16	21	7	3	1	Moy. 10

Globalement, on observe une densité de tiques adultes significativement plus importante dans le département de la Creuse par rapport à la Haute-Vienne ($p=0,04$). Pour les nymphes la différence n'est pas statistiquement significative ($p= 0.2$).

Par rapport à 2005, la densité des tiques a tendance à augmenter et cette augmentation est significative dans le département de la Creuse à partir du mois de juillet. Toutefois sur l'ensemble de l'année 2006, la densité moyenne des tiques est comparable à 2005 dans les 2 départements.

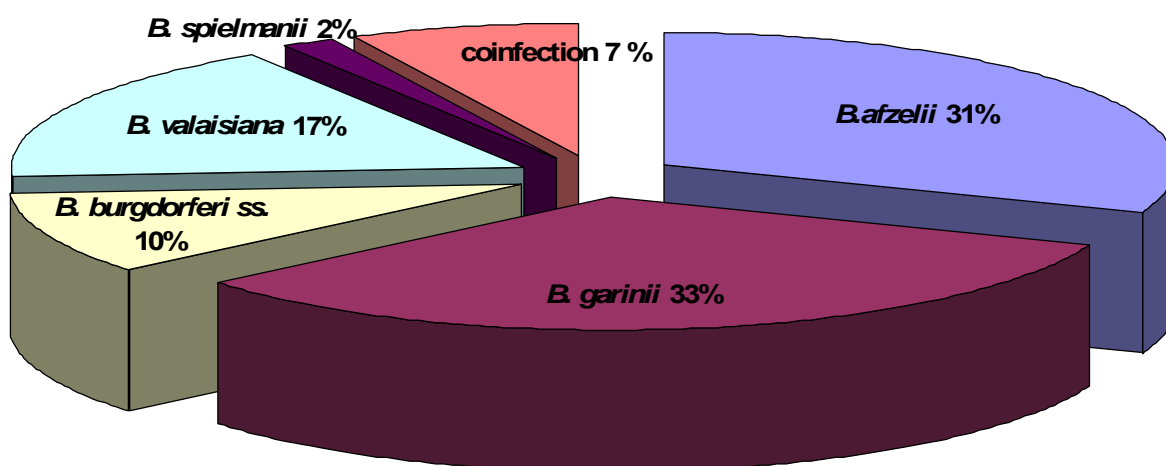
Le taux d'infection, qui est moyennement important, est comparable entre les deux départements et stable par rapport à 2005. Il est de 13,8% pour l'ensemble des 2 départements. Pour les 2 départements, les taux d'infection des mâles et des femelles sont comparables et nous les avons donc analysés ensemble.

La densité moyenne des nymphes infectées, qui reflète le risque de transmission de la borréliose de Lyme, est sensiblement plus importante dans le département de la Creuse (19/100 m²) par rapport à la Haute-Vienne (10/100 m²), toutefois la différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0.2$). Dans la Creuse, le risque est maximum de mai à septembre avec un pic en mai à 47/100 m². Dans la Haute-Vienne, le risque prédomine de mai à juillet avec un pic en juillet à 21/100 m². Ces périodes de risque maximal ne correspondent pas à celle observées en 2005. À noter que les données pour le mois d'août n'ont pas été recueillies en 2006.

C. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques dans le Limousin

L'ADN de *B. burgdorferi* sensu lato a été détecté par amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl* dans 211 des 1523 tiques de la Creuse et de la Haute-Vienne analysées. La répartition par espèce montre après analyse du polymorphisme de restriction par *MseI* :

Figure C1. Espèces de *B. burgdorferi* *sl.* isolées de tiques du Limousin en 2006



Comme en 2005, *B. garinii* et *B. afzelii* représentent chacune environ 30 % des espèces retrouvées avec la même disparité entre les deux départements. *B. afzelii* est plus fréquemment retrouvée dans la Creuse (41 % versus 9 %, $p < 0,001$) et prédomine chez les nymphes alors que *B. garinii* est plus fréquemment retrouvée dans la Haute-Vienne (45 % versus 28 %, $p = 0,01$) sans différence entre nymphes et adultes.

Par rapport à 2005, on note une augmentation de *B. burgdorferi* ss. (10 % versus 4 %, $p = 0,008$) au détriment de *B. valaisiana* qui a diminué (17 % versus 26 %, $p = 0,02$).

D.Taux d'infection des tiques par les membres de la famille des Anaplasmataceae

Au regard du faible taux de positivité obtenu en 2005 pour les Anaplasmataceae, seule *A. phagocytophilum* a été recherchée. Au total, sur 1485 tiques analysées, 0,1 % des nymphes (1/978) et 0,4 % des adultes (2/507) étaient infectées par cette bactérie. Les trois tiques infectées ont été collectées dans la Creuse. Ces taux sont encore plus faibles que ceux observés en 2005. Cette différence peut-être liée à la méthode employée (amplification spécifique mais moins sensible).

Conclusion

Les résultats de la surveillance d'*Ixodes ricinus* dans le Limousin en 2006 confirment ceux obtenus en 2005. Le risque de transmission de la borréliose de Lyme estimé dans les sites étudiés est modéré et est de 2 fois moins important qu'il ne l'était en Alsace en 2003-2004, où le pic de densité des tiques infectées était supérieur à 100/100 m². On observe toutefois une augmentation de l'espèce pathogène *B. burgdorferi* ss. et une diminution de *B. valaisiana* dont la pathogénicité, si elle existe, est moins importante. La prévalence d'infection des tiques par *A. phagocytophilum* est très faible, surtout chez les nymphes, le risque de contamination pour l'homme est donc peu important.

3.3.3 Étude en Basse-Normandie

Nous avons initié en 2006 la surveillance du vecteur de la borréliose de Lyme dans deux départements de la Basse-Normandie : l'Orne et le Calvados. Afin d'estimer l'importance de la densité et de juger de l'opportunité de poursuivre et d'approfondir cette surveillance en 2007 nous avons effectué la collecte sur 3 mois seulement.

E. Département de l'Orne

Dans ce département, qui comprend de nombreuses forêts, les tiques ont été collectées dans 7 parcelles.

Tableau E1. Parcelles étudiées dans le département de l'Orne en 2006

Orne	Parcelle O1	Parcelle O4	Parcelle O6	Parcelle O8	Parcelle O9	Parcelle O12	Parcelle O14
Fuseau	30	30	30	30	31	31	31
Zone	U	U	U	U	U	U	U
Longitude	0694212	0687289	0681744	0684442	0325571	0326632	0328386
Latitude	5379966	5387320	5385192	5383927	5389419	5387185	5377416
Altitude (m)	193	262	203	275	256	294	228
Végétation	sapins hêtres bouleaux fougères	sapins hêtres fougères régénération	hêtres fougères régénération	sapins, pins hêtres chênes fougères régénération	sapins hêtres plus dense	hêtres chênes ronces fougères régénération	hêtres fougères, ronces

Les parcelles O1, O4, O6, O8 ont été tirées au sort dans la forêt des Andaines, O9, O12, O14 dans le parc naturel régional qui comprend la forêt du Perche et de la Trappe, et la forêt de Reno.

Tableau E2. Densité et taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans l'Orne en 2006

Orne	Mai	Juin	octobre	Total
Nymphes(n)	2063	2389	590	5042
Dens/100 m ²	184.2	213.3	52.7	150
IC	[113-255]	[55-372]	[19-86.4]	
Adultes (n)	218	251	46	515
Dens/100 m ²	19.46	22.41	4.11	15.32
IC	[9.56-29.4]	[10.7-34.12]	[0.33-7.9]	
Nymphes	20/140	20/140	17/124	57/404
Taux d'infection	14.3 %	14.3 %	13.7 %	14.1 %
Adultes	22/137	15/133	11/46	48/316
Taux d'infection	16.1 %	11.3 %	23.9 %	15.2 %
Densité des Nymphes infectées	26	30	7	Moy. 21
Dens/100 m ²				

F. Département du Calvados

Dans ce département les tiques ont été collectées dans 3 parcelles.

Tableau F1. Parcelles étudiées dans le département du calvados en 2006

Calvados	Parcelle C1	Parcelle C6	Parcelle C16
Fuseau	30	30	30
Zone	U	U	U
Longitude	0655063	0642659	0691611
Latitude	5452231	5408633	5434058
Altitude (m)	104	63	105
Végétation	hêtres fougères ronces	hêtres sapins fougères ronces houx	hêtres régénération sapins ronces

Les parcelles C1, C6 ont été tirées au sort dans la forêt de Cérisy et C16 dans la forêt de Cinglais.

Tableau F2 : Densité et taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans le Calvados en 2006.

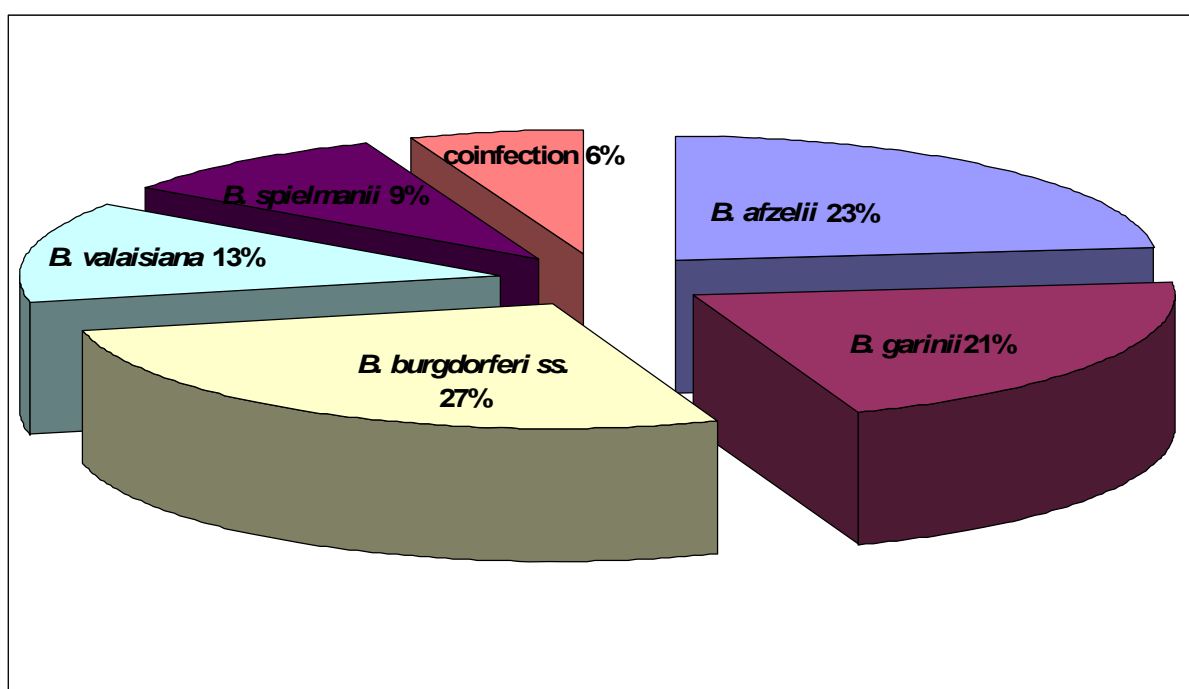
Calvados	Mai	Juin	octobre	Total
Nymphes(N)	668	641	96	1405
Dens/100 m ²	139.17	200.31	30	123.16
IC	[39-239.4]	[0-442.1]	[0.61-59.4]	
Adultes (N)	41	35	6	82
Dens/100 m ²	8.54	10.94	1.87	7.12
IC	[0-18.6]	[0-26.24]	[0-5.55]	
Nymphes	6/40	7/40	8/40	21/140
Taux d'infection	10 %	17.5 %	20 %	15 %
Adultes	4/37	5/31	2/6	11/74
Taux d'infection	10.8 %	16.1 %	33.3 %	14.9 %
Densité des nymphes infectées	14	35	6	Moy. 18
Dens/100 m ²				

Globalement, on observe une densité de tiques et un taux d'infection comparables dans les deux départements aussi bien pour les nymphes que pour les adultes. De même, les taux d'infection des mâles et des femelles sont comparables dans les 2 départements et nous les avons donc analysés ensemble. Le taux d'infection est de 15% pour l'ensemble des 2 départements. La densité moyenne des nymphes infectées, qui reflète le risque de transmission de la borréliose de Lyme, est comparable dans les deux départements et est de 21/100 m² dans l'Orne et de 18/100 m² dans le Calvados.

G. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques en Basse Normandie

L'ADN de *B. burgdorferi* sensu lato a été détecté par amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl* dans 137 des 934 tiques analysées. La répartition par espèce montre après analyse du polymorphisme de restriction par *MseI* :

Figure G1. Espèces de *B. burgdorferi* sl. isolées de tiques en Basse Normandie en 2006



En Basse-Normandie, *B. burgdorferi* ss., est prédominante (27%) et la fréquence de *B. burgdorferi* ss. dans cette région est la plus élevée rapportée en France jusqu'à maintenant. En effet, cette espèce est très rare en Alsace et dans le département de la Meuse, un peu plus représentée en Auvergne et Limousin, sans toutefois dépasser 10 %. Même si cette espèce est retrouvée plus souvent chez les adultes que chez les nymphes, sa prévalence en Basse-Normandie, même chez les nymphes (18%) reste supérieure à celle retrouvée dans les autres régions. Les 2 espèces pathogènes *B. garinii* et *B. afzelii* représentent chacune environ 20 % des espèces retrouvées.

Conclusion

Les résultats de la surveillance d'*Ixodes ricinus* initiée en Basse Normandie en 2006 nous ont permis de mettre en évidence un risque non négligeable de transmission de la borréliose de Lyme dans cette région. La fréquence élevée de *B. burgdorferi* ss. représente une particularité de cette région à confirmer par la poursuite de cette surveillance et à associer à l'étude clinique.

3.3.4 Étude dans la Meuse

Depuis 2003, le Dr J.C. Georges effectue des collectes de tiques sur les mêmes parcelles dans le département de la Meuse sauf au mois de mai pendant lequel une seule parcelle a été collectée. Seule la densité a été calculée.

Tableau 3.2.4 : Densité des tiques *I. ricinus* dans la Meuse en 2006.

Mois de collecte	Mai *	Juin	Juillet	Août	Sept	Octobre	Total
Nymphes (N)	90	239	98	75	17	6	525
Dens/100 m ²	225	298.75	122.5	93.75	21.25	7.5	128.12
IC	[202-247]	[100-497]	[4.92-240]	[0-194]	[14-29]	[7.4-7.6]	
Adultes (N)	12	11	18	10	2	6	59
Dens/100 m ²	30	13.8	22.5	12.5	2.5	7.5	14.8
IC	[22.5-37.5]	[0-31]	[0-66.6]	[7.6-17.4]	[0-7.4]	[2.6-12.4]	

La densité des tiques en 2006 dans le département de la Meuse est élevée et plus importante qu'en 2005 et 2004 et équivalente à 2003 pour les nymphes. Pour les adultes elle est moins élevée qu'en 2005 et équivalente aux autres années. A noter qu'en 2005, la densité des nymphes était particulièrement faible.

3.3.5 Diversité génétique des souches de *Borrelia burgdorferi* sl.

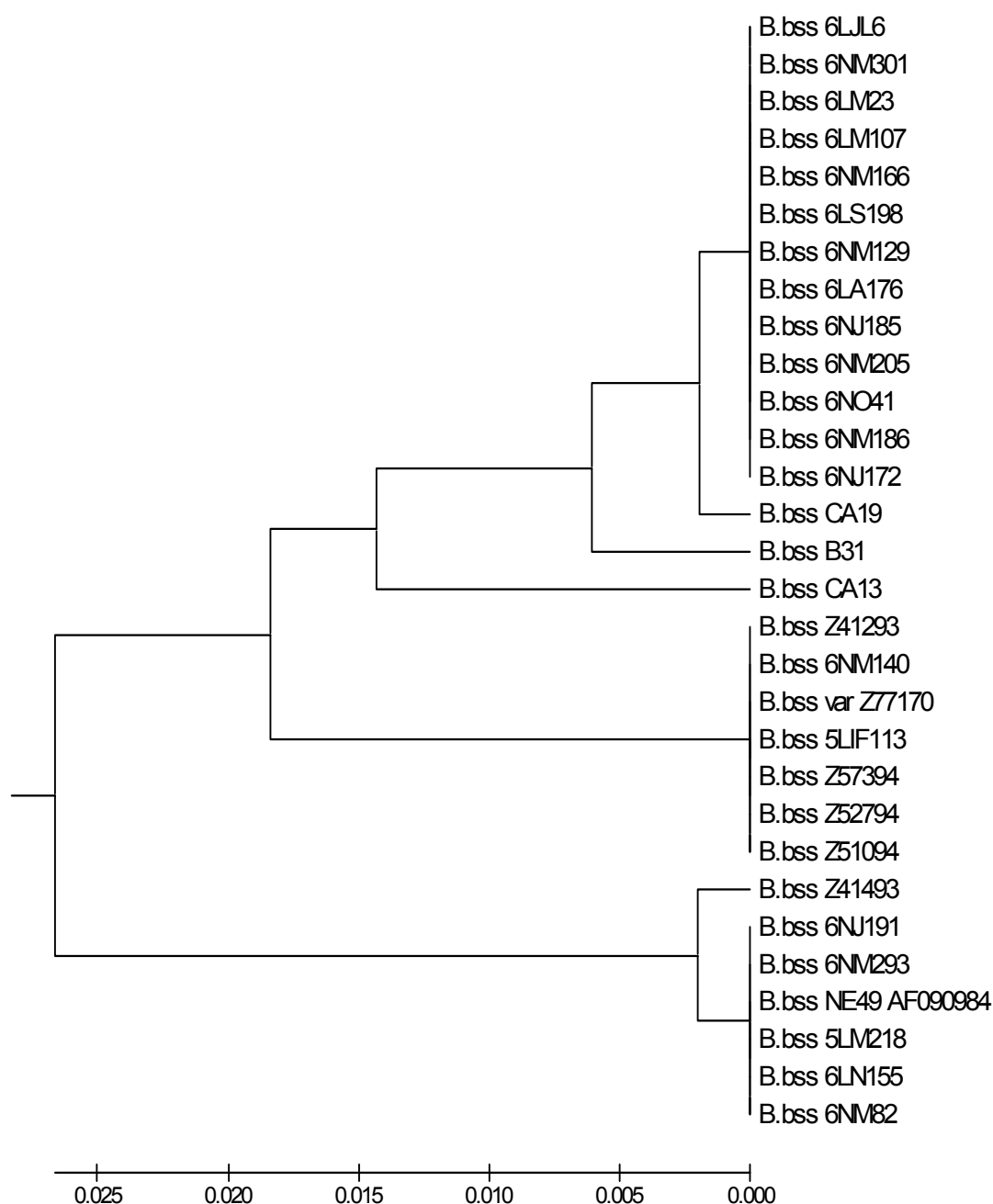
La détection et l'identification de *B. burgdorferi* sl. est effectuée par amplification puis digestion enzymatique de la région intergénique *rrf-rrl*. L'analyse des profils de restriction donne un premier niveau de polymorphisme, complété dans un second temps par l'analyse des séquences du produit d'amplification. Afin d'apprécier le polymorphisme, nous avons séquencé la majorité des produits d'amplification donnant lieu à un profil atypique pour toutes les espèces (pour apprécier le polymorphisme global il faudrait aussi séquencer les souches donnant lieu à un profil « typique »). Nous avons observé au sein de chacune des principales espèces détectées dans les tiques collectées dans le Limousin et en Basse-Normandie, un polymorphisme de restriction globalement comparable à celui observé les années précédentes avec toutefois un plus grand nombre de souches de *B. burgdorferi* ss. de profil atypique 1 (Tableau 3.2.5).

Tableau 3.3.5 : Polymorphisme de restriction *MseI* de l'espace intergénique *rrf-rrl* de *Borrelia* détectées dans les tiques *I. ricinus* en France en 2006

			Profils de restriction <i>MseI</i>	séquences
<i>B. garinii</i> (n=100)	Profil 20047 ^T	(n=96)	107, 95, 51	12
	Profil atypique 1	(n=2)	107, 80, 51	2
	Profil atypique 2	(n=2)	107, 98, 51	2
<i>B. afzelii</i> (n=96)	Profil VS461 ^T	(n=87)	107, 68, 51, 20	0
	Profil atypique 1	(n=4)	107, 68, 51, 13, 7	4
	Profil atypique 2	(n=5)	107, 51, 38, 30, 20	5
<i>B. valaisiana</i> (n=54)	Profil VS116 ^T	(n=49)	174, 51, 23, 7	0
	Profil atypique 1	(n=2)	204, 51	2
	Profil atypique 2	(n=3)	174, 51, 14, 7	2
<i>B. burgdorferi</i> ss (n=58)	Profil B31 ^T	(n=37)	107, 52, 38, 29, 28	0
	Profil atypique 1	(n=16)	107, 52, 40, 29, 28	13
	<i>Bb</i> ss var 1	(n=4)	107, 53, 38, 29, 26	4
	<i>Bb</i> ss var 2	(n=1)	107, 52, 38, 29, 29	1
<i>B. spielmanii</i> (n=17)	Profil PC-EQ17NS ^T	(n=0)	107, 99	0
	Profil 1	(n=4)	107, 67, 48	4
	Profil 2	(n=13)	107, 65, 51	13

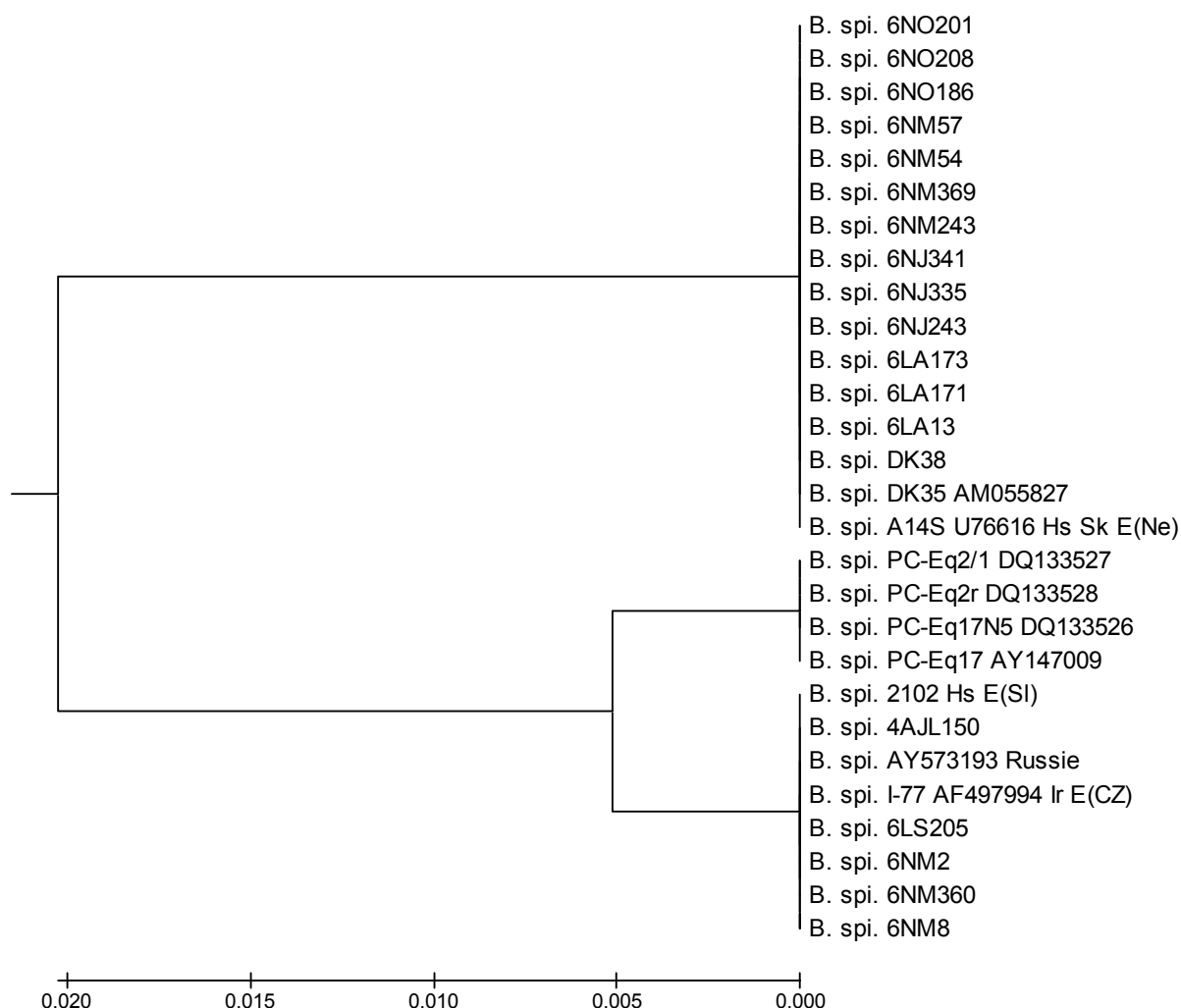
Nous détaillons ici plus spécialement le polymorphisme observé au sein des espèces *B. burgdorferi* ss. (Fig. 3.3.5.1) et *B. spielmanii*. (Fig. 3.3.5.2) qui ont fourni le plus grand nombre de profils atypiques. L'analyse des séquences ne permet d'identifier que peu de polymorphisme supplémentaire par rapport à l'analyse du polymorphisme de restriction.

Fig. 3.3.5.1. Arbre phylogénétique (méthode UPGMA) tracé à partir des séquences de *B. burgdorferi* ss issues des produits d'amplification de l'espace *rrf-rrl* à partir de tiques collectées en 2006.



L'analyse phylogénétique des souches de *B. burgdorferi* ss. confirme que la majorité des souches atypiques isolées de tiques en Basse-Normandie et dans le Limousin en 2006 (intitulées respectivement 6N...ou 6L...) sont de profil atypique 1 et sont situées dans le même cluster que la souche CA19, souche de référence dont la séquence *rrf-rrl* ne diffère que d'un nucléotide. Comme en 2005, nous avons retrouvé cette année une souche d'un variant 2 (souche 6NM140) de séquence identique à la souche Z771170 qui est une souche allemande initialement décrite dans ce variant. Cette analyse confirme par ailleurs la proximité génétique des souches américaines (CA19, CA13 et B31) et européennes de *B. burgdorferi* ss. (sous presse D. Postic *et al.*).

Fig. 3.2.5.2. Arbre phylogénétique (méthode UPGMA) tracé à partir des séquences de *B. spielmanii* issues des produits d'amplification de l'espace *rfl-rfl* à partir de tiques collectées en 2006.



L'analyse phylogénétique des séquences *rfl-rfl* de *B. spielmanii* isolées des tiques de Basse-Normandie ou du Limousin (intitulées respectivement 6N...ou 6L...) montre que celles-ci se répartissent exclusivement en deux clusters. La majorité des séquences sont identiques à celle de la souche A14S initialement décrite aux Pays-Bas. Ce cluster comprend également des souches isolées d'érythème migrant chez des patients danois (DK38 et DK35) confirmant le caractère pathogène de cette espèce. Les autres souches de 2006 se situent dans le même cluster que des souches de Russie, de République Tchèque, de Slovénie et d'une souche alsacienne isolée en 2004 (4AJL150). Nous n'avons pas mis en évidence de polymorphisme différent de celui obtenu par la restriction *MseI* et n'avons pas retrouvé comme dans la Creuse en 2005 de souches de *B. spielmanii* divergentes. Nous n'avons pas isolé en 2006 de souche identique à la souche type PC-Eq17N5 isolée en Alsace souche type de l'espèce *B. spielmanii* récemment confirmée par MLSA (Richter D, Postic D *et al.* 2006).

3.4. Contribution du CNR aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

- Collaboration du CNR avec une équipe allemande (D. Richter) pour l'application de la méthode MLST à l'étude de la diversité des souches de *B. lusitaniae* isolée en Europe et en Afrique du Nord (D. Richter). Le CNR met à disposition et analyse les séquences de toutes les souches de *B. lusitaniae* isolées en Afrique du Nord grâce à la collaboration avec les Instituts Pasteur de Casablanca et de Tunis.

4. Activités d'information, de formation et de conseil

4. 1 Activités d'information, de formation et de conseil du CNR (Laboratoire des spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

- Le 23 mars 2006 : Cours sur la maladie de Lyme donné par Guy Baranton à l'Institut National de Médecine Agricole (INMA) de Tours dans le cadre du module «Pathologies respiratoires agricoles et zoonoses».
- Avril 2006 : Formation par D. Postic et E. Ferquel à Alençon
- 11 et 12 mai 2006 : Réunion de formation sur les *Borrelia* à Ambert, Puy-de-Dôme, par D. Postic et E. Ferquel.
- Le 23 mai 2006 : Participation de G. Baranton et D. Postic au 3^{ème} séminaire des CNR organisé par l'Institut de Veille Sanitaire à Charenton-le-Pont.
- Le 12 juin 2006 : Conférence de D. Postic lors de la Journée thématique organisée par les Départements Génomes et Génétique & Microbiologie de l'Institut Pasteur à Paris : «MLSA, une nouvelle approche pour la taxonomie des *Borrelia burgdorferi* sensu lato».
- Du 26 au 29 septembre 2006 : Participation de M. Cornet au congrès ICAAC, San Francisco, USA.
- Octobre 2006 : Dr. Postic et Dr. Malaval : Conférence sur la maladie de Lyme en Auvergne au Congrès Médical du Lioran (Cantal).
- Le 22 novembre 2006 : Cours de M. Cornet sur les Borrélioses à la Pitié-Salpêtrière dans le cadre du D.U. «Dermatologie infectieuse et tropicale».
- Le 13 décembre 2006 : Participation de M. Cornet et E. Ferquel à la 16^e Conférence de Consensus en Thérapeutique anti-infectieuse sur la « Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives », à l'Institut Pasteur Paris.

MISSIONS

- Du 4 au 9 avril 2006 : au Maroc, dans le cadre du projet ACIP 2004 «Fièvres récurrentes à tiques au Maroc et en Tunisie».
- D'avril à novembre 2006 : nombreuses missions de collectes de tiques en Basse-Normandie et dans le Limousin.

Accueil de stagiaires :

Violaine BERTRAND-DALECHAMPS, étudiante en 2^{ème} année de licence en Biologie à la Faculté d'Orsay (Université Paris Xi). Stage professionnalisant de 10 semaines à compter du 24 avril 2006. Objet : Prévalence de l'infection d'*I. ricinus* par deux pathogènes, *Borrelia burgdorferi* sl et *Anaplasma phagocytophilum*.

Oulfa BEN EL HAMRA, étudiante en BTS Bioanalyses et Contrôles à l'ENCPB, Paris. 1^{ère} année : stage de 5 semaines à dater du 22 mai 2006. Objet : Identification de souches de *Borrelia burgdorferi* sl issues de tiques collectées en France. 2^{ème} année : stage de 9 semaines à dater du 20 novembre 2006. Objet : identification des espèces et étude de la biodiversité des *Borrelia* agents des fièvres récurrentes en Tunisie et au Maroc.

Reçue pour des travaux de recherche liés à l'activité du Centre :

Eva RUZIC-SABLJIC, médecin responsable d'un département à la Faculté de Médecine de Ljubljana (Slovénie). Stage de 4 semaines à dater du 5 juin 2006 dans le cadre d'une collaboration scientifique sur l'épidémiologie des *Borrelia*.

- **Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :**
 - o Rétro-information aux partenaires : un résumé du présent rapport d'activité est adressé à tous les médecins ayant participé à l'étude clinique soit environ 400 médecins. En 2007, le texte court des recommandations de la conférence de consensus du 13 décembre leur sera également adressé.
- **Activités de conseil aux professionnels** (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...) :

La Borréliose de Lyme est une infection complexe, encore mal comprise qui suscite de nombreuses questions des médecins, biologistes et particuliers. L'équipe médicale qui dirige le CNR (D. Postic/M. Cornet et E. Ferquel) répond à de nombreux messages électroniques ou téléphoniques (en moyenne un par jour).

4. 2 Activité d'information, de formation et de conseil du laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

- Enseignement - Formation – accueil de stagiaires
 - « *Infections émergentes transmises par les arthropodes* ». Cours au Master M 1 de Microbiologie Médicale, Faculté de Médecine de Strasbourg, février 2006.
 - « *Mécanismes bactériens d'échappement aux défenses de l'hôte* ». Cours au Master M 1 de Microbiologie Médicale, Faculté de Médecine de Strasbourg, mars 2006.
 - Interview au magazine santé télévisé de France 5 sur la borréliose de Lyme, Paris, 9 novembre 2006.
 - Formation du Dr. Marty, biologiste au laboratoire du C.H. Metz à la réalisation et à l'interprétation des western-blot de la borréliose de Lyme. 1 journée Juin 2006
 - Formation de Tjasa Cerar (Ljubljana , Slovénie) à la PCR en temps réel sur Light

Cycler et au typage d'espèces de *Borrelia* par sondes spécifiques d'espèces, 2 semaines février 2006

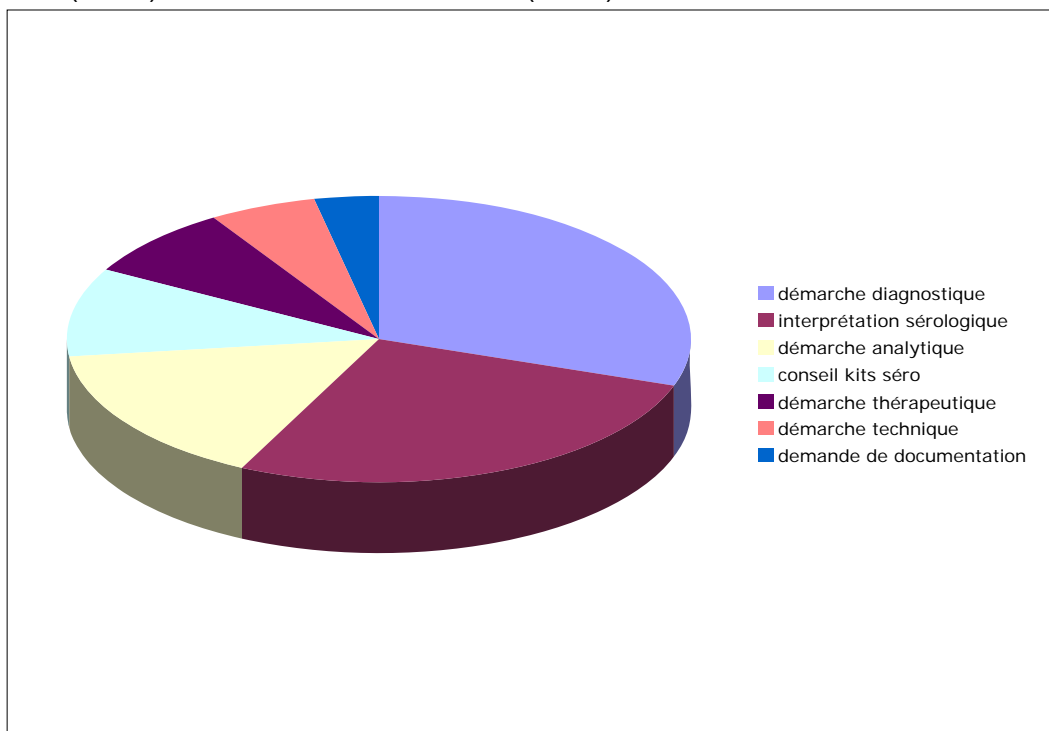
- Formation de Anne Oesterlé, étudiante en Licence de Biochimie à la technique de l'immuno-empreinte, 1 mois sur juillet-août 2006

- Conseil aux professionnels (hors CHU de Strasbourg)

Parallèlement aux sérums qui nous sont confiés pour expertise sérologique, nous réalisons une activité d'assistance téléphonique. Cette activité a consisté en 2006 en 77 appels et 15,5 heures de temps de téléphone sur l'année. Les appels sont répartis de façon assez homogène tout au long de l'année. La majorité de nos interlocuteurs sont des médecins cliniciens et biologistes de toute la France, cependant parfois des patients directement pour avoir notre avis sur le résultat de leur sérologie ou pour nous demander des conseils de prévention

La durée moyenne des communications est de 12 min. Les demandes sont essentiellement :

- des demandes de renseignements sur la maladie et sur l'interprétation de la sérologie, de conduite à tenir devant des signes cliniques et/ou un résultat sérologique
- des demandes de comparaisons des différents tests disponibles sur le marché sont relativement souvent demandées surtout par les laboratoires privés ou les autres centres hospitaliers
- la demande de procédures : ainsi sur 2006, nous avons fourni des procédures pour la réalisation de la synthèse intra-thécale (13 fois), des recherches de *Borrelia* par PCR (7 fois) et sur la culture de *Borrelia* (6 fois).



Depuis 2005, s'est ajouté à cette activité d'assistance téléphonique, une assistance par courrier électronique. Les questions posées sont en général plus précises et portent notamment sur des cas cliniques et biologiques. Elles concernent aussi des demandes de documents scientifiques et de référentiels. Cette activité a quasiment doublé en 2006 consistant à répondre à 34 messages avec une moyenne de 17,6 min par message

Les courriels provenaient en majorité des professionnels de santé mais aussi de particuliers. Ils concernent majoritairement la demande de conseil sur les coffrets pour la sérologie de Lyme, la demande de documentation de type formation médicale continue, la demande d'interprétation de résultats de sérologie et la démarche diagnostique devant un tableau clinique précis.

Répartition des demandes de renseignements par courriel

Nous avons durant l'année 2006, participé en temps que membre du comité d'organisation et en temps qu'expert à une conférence de consensus sur la borréliose de Lyme en décembre 2006, organisé par la Société de pathologie Infectieuse de Langue Française. Quatre questions ont été analysées par les experts et soumises aux membres du jury :

- « sur quels arguments cliniques et épidémiologiques faut-il évoquer le diagnostic de borréliose de Lyme ? »
- « quelle est la place des méthodes biologiques dans le diagnostic des différentes manifestations de la borréliose de Lyme ? »
- « quels traitements peut-on recommander dans la borréliose de Lyme ? Quel est le

suivi nécessaire ?»

- « quelles sont les mesures préventives à proposer ? »

Cela a fait l'objet d'un texte court qui est disponible sur le site <http://www.infectiologie.com>

- Mise en place d'un contrôle de qualité externe pour les laboratoires

En 2006, nous avons débuté la mise en place d'un contrôle de qualité externe pour la sérologie de *Borrelia*.

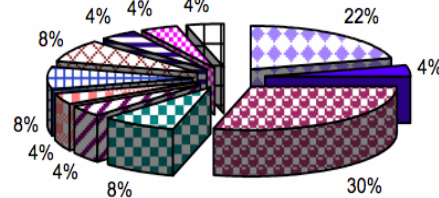
Avec l'aide d'une association (Biologie prospective, Nancy) nous avons diffusé un sérum positif (en IgG et en IgM) à tester à 21 laboratoires volontaires du Nord-Est de la France.












Labos	IgM			IgG		
	-	±	+	-	±	+
0029			X			X
0045		X				X
0099						
0106						X
0142			X			X
0152		X				X
0198						X
0216						X
0247			X			X
0262						X
0319	X					X
0353	X					X
0420						X
0445	X					X
0463			X			X
0469			X			X
0506	X					X
0547			X			X
0548						X
0549			X			X
0553 (Expert)			X			X
0575			X			X

Si tous les laboratoires ont correctement détecté ce sérum positif en IgG, 19% des labos (4/21) l'ont détecté faussement négatif en IgM et 10% l'ont détecté comme douteux en IgM.

Parmi les 21 laboratoires, on constate que 9 techniques différentes sont utilisées, la technique Ig totales de BioMérieux étant la plus fréquemment utilisée (38% des laboratoires participants) (cf. graphe ci-dessous). Cette diversité importante pourrait être impliquée dans la variabilité des résultats.

Techniques utilisées par les laboratoires participants



-  DADE BEHRING : EIA Enzygnost Borrelia
-  DIASORIN : Recom Well Borrelia Mikrogen
-  BIOMERIEUX : Lyme IgG et IgM
-  DIASORIN : Immuno-luminométrie
-  BIOMERIEUX :ELFA
-  BIOMERIEUX : Immunoenzymologie
-  INGEN : Borrelia Burgdorferi G/M Virotech
-  ABBOTT : Imx
-  Borrelia lisa Savyon
-  EUROIMMUN : Anti-Borrelia plus VisE ELISA (IgG)
-  EUROIMMUN : Anti-Borrelia ELISA (IgM)

- **Activité d'expertise juridique**

Nous avons en 2006 analysé pour un neurologue expert de Paris le dossier biologique d'un patient du CHU de Bordeaux, portant plainte contre cet hôpital pour suspicion de retard dans le diagnostic d'une neuroborréliose. En l'absence de la possibilité de réalisation d'une synthèse intra-thécale, le lien de causalité entre une infection à *Borrelia*, qui a pu être établie chez ce patient et ses troubles neurologiques apparus en 2004 n'a pu être formellement établi.

5. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

5.1 *Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR* (Laboratoire des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

- Application d'une méthode de génotypage par MLSA/MLST mise au point par le CNR (Postic *et al.* sous presse) à l'étude de la diversité génétique des souches de *B. lusitaniae* isolées en Europe et en Afrique du Nord, collaboration avec une équipe allemande (D. Richter). Les souches d'Afrique du Nord proviennent d'une étude faite en collaboration avec les Instituts Pasteur de Casablanca et de Tunis.
- Etude du rôle de la spécialisation d'un vecteur sur la diversité génétique d'un microparasite grâce au modèle *Ixodes uriae-B. burgdorferi* *sl.* Collaboration avec le laboratoire de Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses IRD/CNRS Montpellier (K. Mc Coy).
- Le projet ACIP réunissant le CNR, les Instituts Pasteur de Casablanca (M. Sarih) et de Tunis (A. Bouattour) et l'Institut de Zoologie de Neuchâtel (L. Gern) s'est terminé fin 2006. Cette étude a permis d'objectiver le risque de transmission des fièvres récurrentes au Maroc et en Tunisie. Le diagnostic a pu être confirmé chez trente patients du Maroc et *B. hispanica* est l'espèce retrouvée dans tous les cas. En Tunisie, aucun cas humain n'a pu être détecté alors que de nombreuses tiques porteuses de *Borrelia* très proches de *B. crocidurae* ont été col-

lectées dans ce pays.

5.2. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

Les formes aiguës de myélite de Lyme sont rares et elles ne représentent que 3,7% à 5,2% des cas de neuroborréliose d'après la littérature. Seuls 8 cas ont ainsi été bien authentifiés à ce jour en ayant fait l'objet à la fois d'une étude du liquide céphalo-rachidien et d'une IRM médullaire.

En analysant rétrospectivement les dossiers des adultes vus entre le premier janvier 1997 et le 31 décembre 2004 pour lesquels la synthèse intra-thécale anti *B. burgdorferi* était positive, nous avons constaté que trois d'entre eux avaient présenté un tableau de myélite aiguë. Nous en avons analysé les caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques.

Ces 3 patients avaient tous une atteinte motrice, sensitive et sphinctérienne à des degrés divers. Chaque patient avait aussi une atteinte extra-médullaire : fièvre et céphalées pour l'un, paralysie faciale périphérique unilatérale pour le second et hémorragie méningée pour le dernier. Il existait une pléiocytose d'intensité variable de 10 à 520 globules blancs par mm³. La sérologie de Lyme était positive dans le liquide céphalo-rachidien dans les 3 cas. L'index de synthèse intra-thécale anti-*B. burgdorferi* était positif ou intermédiaire dans les trois cas. L'IRM médullaire retrouvait un hypersignal de plus de 3 métamères de haut pouvant être transverse, postérieur ou centro-médullaire ainsi que dans un cas une hémorragie méningée avec inondation ventriculaire partielle.

Le traitement des myélites aiguës de Lyme est identique à celui des autres formes de neuroborréliose. L'évolution sous antibiothérapie par amoxicilline ou ceftriaxone IV pendant au moins 3 semaines était globalement favorable pour les 3 cas dans un délai de 6 à 9 mois avec persistance de quelques troubles sphinctériens.

Ces 3 cas ainsi que les autres décrits dans la littérature montrent que les neuroborrélioses peuvent dans de rares cas être des manifestations sévères. De plus, la diversité des tableaux clinico-radiologiques de myélite aiguë de Lyme (myélite transverse, postérieure ou centrale) nécessite donc la mise en évidence d'une synthèse intra-thécale anti-*B. burgdorferi* pour étayer l'étiologie borrélienne. Une sérologie de Lyme dans le liquide céphalo-rachidien doit donc être systématiquement pratiquée dans les myélites aiguës étendues, en particulier en zone d'endémie.

Ce travail a été soumis fin 2006 à la Revue neurologique.

6 - Liste des publications et communications

6. 1 Liste des publications et communications du CNR (Laboratoire des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

LAGAL V., PORTNOÏ D., FAURE G., POSTIC D., BARANTON G. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. Microbes Infect., 8, 645-652.

RICHTER D., POSTIC D., SERTOUR N., LIVEY I., MATUSCHKA FR., BARANTON G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 873-881.

FERQUEL E., GARNIER M., MARIE J., BERNEDE-BAUDUIN C., BARANTON G., PEREZ-EID C., POSTIC D.

Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. Appl Environ Microbiol., 72, 4, 3074-8.

PORTNOÏ D., SERTOUR N., FERQUEL E., GARNIER M., BARANTON G., POSTIC D.

A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the *hbb* gene sequence.

FEMS Microbiol Lett., 259, 1, 35-40.

POSTIC D., BARANTON G.

Prévalence de l'infection des tiques *Ixodes ricinus* par *Borrelia burgdorferi* sl en Alsace, corrélation avec l'incidence de la maladie.

BEH, n° 27-28, 201-202.

DSOULI N., YOUNSI-KABACHII H., POSTIC D., NOUIRA S., GERN L., BOUATTOUT A.

Reservoir role of lizard *Psammodromus algirus* in transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Spirochaetaceae) in Tunisia.

J. Med. Entomol., 43, 4, 737-742.

BEYTOUT J., GEORGE JC, MALAVAL J., GARNIER M., BEYTOUT M., BARANTON G., FERQUEL E., POSTIC D. Infection of *Ixodes ricinus* ticks by *Borrelia burgdorferi* sl. and *Anaplasma phagocytophylum* in two French departments; correlation with Lyme borreliosis incidence. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2007 sous presse.

D POSTIC, GARNIER M., BARANTON G. Multi Locus Sequence Typing of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. Description of *B. californiens* sp. nov., and genospecies 1 and 2. Int. J. Med. Microbiol. 2007 sous presse.

6.2 - Liste des publications et communications du laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

1. Enhanced culture of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* strains on a solid BSK-based medium in anaerobic conditions
S.J. De Martino, C. Sordet, Y. Piémont, E. Ruzic-Sabljic, M. Th. Vetter, J. Sibia, H. Monteil, B. Jaulhac.
Research in Microbiology, 2006, 157, 726-729.
2. Interest of anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato antibody index to diagnose neuroborreliosis among patients with positive serology in CSF
F. Blanc, B. Jaulhac, M. Fleury, J. de Seze, S.J. De Martino, G. Blaison, Y. Hansmann, D. Christmann, C. tranchant
Accepté en 2006 pour publication dans Neurology

Communications orales

1. Dissemination of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mice: influence of the species and of the primary human isolation site.
S. J. De Martino, C. Sordet, Y. Piemont, C. Barthel, E. Collin, J. Sibia, B. Jaulhac.
Communication orale, 16th ECCMID, 1-4 Avril 2006, Nice.

7- Programme d'activité 2007-2008

7.1 Programme d'activité 2007-2008 du CNR (Laboratoire des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris)

Activités d'expertise :

Il est prévu de mettre en place un site Internet avec des interfaces d'information pour le grand public, des liens avec le site de l'Institut Pasteur et avec les principaux sites existant déjà, ainsi que l'accès aux recommandations de la conférence de consensus sur la Maladie de Lyme de décembre 2006.

Activités de surveillance :

Sur le plan clinique, le réseau de médecins libéraux et hospitaliers va être débuté en Basse-Normandie en 2007 et en Haute Normandie en 2008. Des formations des médecins et une sollicitation par courrier sont prévues pour initier la surveillance dans ces deux régions. Le réseau va être poursuivi en Auvergne, en Alsace et dans le département de la Meuse ainsi que dans les hôpitaux de Rennes, Cochin et Charleville-Mézières.

La faisabilité de la mise en place d'une déclaration des cas informatisée permettant aux médecins, s'ils le souhaitent, de renseigner eux-mêmes les cas sur un réseau informatique sécurisé. Ce type de réseau leur offre la possibilité de récupérer et d'analyser leurs propres données mais aussi celles de leurs collègues de la même région ou du même département. La mise en place d'un tel réseau par la société Epiconcept sur le modèle du logiciel Voozanoo® serait une première étape vers la mise en place d'une surveillance nationale.

Pour la surveillance du vecteur, il est prévu d'effectuer en parallèle de la surveillance clinique, la surveillance d'*Ixodes ricinus* en Basse Normandie et Haute Normandie

Activités de recherche :

- Un projet d'étude pluridisciplinaire sur le thème : « Circulation d'un agent zoonotique à transmission vectorielle en milieu forestier : modèle de la borréliose de Lyme en Forêt de Sénart » est en cours d'élaboration. Ce projet, initié et coordonné par l'InVS comporte plusieurs volets :
 - Volet humain (point de départ du projet), avec étude de l'incidence de la maladie sur plusieurs années associé à un volet microbiologique avec analyse des prélèvements par le CNR. Ce volet humain sera assuré par l'équipe du Dr. O. Patey (service de Maladies Infectieuses, Villeneuve St Georges)
 - Volet vecteur : avec estimation de la densité des tiques, taux d'infection et diversité génétique des espèces de *Borrelia* retrouvées chez les tiques. Ce volet vecteur assuré par le CNR se fera en collaboration :
 - Avec une équipe de chercheurs en Géographie (Université Paris VIII) pour la caractérisation des milieux présentant une densité et un taux d'infection des tiques importants. L'analyse de la forêt de Sénart se fera par une étude de terrain associée à une étude d'images aériennes et satellitaires. Cette approche géographique de la surveillance d'un vecteur est un des aspects innovants de ce projet.
 - Avec une équipe de chercheurs du Muséum National d'Histoire Naturelle dirigée par J.L. Chapuis (UMR 5173 CNRS P6) et une équipe INRA de Clermont-Ferrand (G. Vourc'h) pour l'étude des réservoirs. L'hypothèse à tester est que l'introduction d'un nouveau réservoir qu'est le *Tamias* de Sibérie en forêt de Sénart est responsable d'une prévalence élevée de tiques infectées et d'une incidence élevée de Maladie de Lyme autour de la Forêt de Sénart.

Ce projet va faire l'objet d'une demande de financement Afsset en 2007 ou ANR en 2008.

- Il est prévu également de reprendre un projet sur le thème de l'invasivité des souches de *Borrelia burgdorferi* s.l. Ce projet sera développé par le CNR grâce à sa collaboration avec l'équipe de recherche de l'unité de Biologie des Spirochètes dirigée par M. Picardeau. Ce thème avait déjà fait l'objet de travaux au sein du CNR (Thèse de V. Lagal). L'étude de la protéine OspC impliquée dans l'invasivité de *Borrelia burgdorferi* ss. pourrait être élargie aux autres espèces pathogènes et son implication dans le tropisme cutané, neurologique ou articulaire de ces espèces pourrait être approchée. L'étude du rôle de cette protéine dans la phase initiale de l'infection au moment de la transmission par la tique pourrait faire l'objet d'un autre projet.
- L'étude des marqueurs d'exposition pourrait être effectuée en collaboration avec l'équipe de Biochimie et de Biologie Moléculaire des insectes de l'Institut Pasteur. Ce projet repose sur la production de certains anticorps par l'homme et les animaux exposés à des arthropodes hématophages. Ces anticorps sont dirigés contre des protéines salivaires. Nous proposons d'identifier des biomarqueurs de l'exposition aux tiques *Ixodes ricinus* chez l'homme. Nous vérifierons ensuite si la réaction immunitaire dirigée contre ces biomarqueurs peut être corrélée et/ou influencée par la présence de *Borrelia* dans les salives. Pour ce faire, nous proposons de mettre au point un test ELISA permettant de mesurer la réponse immunitaire humaine (IgG et IgE) dirigée contre les protéines salivaires d'*Ixodes ricinus*. Les sérums positifs seront testés par Western blot. Nous déterminerons les profils de reconnaissance des antigènes de tiques, sur des sérums positifs ou négatifs vis-à-vis de la présence de *Borrelia*. Les protéines immunogènes seront identifiées.
- Un projet sur l'épidémiologie et l'amélioration des moyens diagnostics des fièvres récurrentes dans les pays d'endémie pourrait être élaboré en collaboration avec les Instituts Pasteur situés en zone d'endémie (projet ACIP). Les fièvres récurrentes sont des maladies émergentes dont la relation avec le réchauffement climatique a été montrée en Afrique de l'Ouest. Ainsi, les Instituts Pasteur africains (Dakar, Casablanca, Niamey, Yaoundé, Bangui, Antananarivo) pourraient être intéressés par une collaboration avec le CNR. Une collaboration avec Madagascar est déjà mise en place pour la surveillance de la leptospirose et, même si les fièvres récurrentes sont rarement décrites dans ce pays, une collaboration entre les CNR *Borrelia* et Leptospirose et l'Institut Pasteur d'Antananarivo serait tout à fait opportune.
- Poursuite des projets en cours :
 - Application de la méthode alternative de description des espèces (MLST), à l'étude de la diversité des souches de *B. lusitaniae* isolée en Europe et en Afrique du Nord, collaboration avec une équipe allemande (D. Richter)
 - Etude du rôle de la spécialisation d'un vecteur sur la diversité génétique d'un microparasite grâce au modèle *Ixodes uriae*-*B. burgdorferi* s.l. Collaboration avec le laboratoire de Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses IRD/CNRS Montpellier

7.2 Programme d'activité 2007-2008 du laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

Evaluation des tests ELISA :

1) Nous allons poursuivre en 2007 l'étude entreprise sur les tests ELISA car de nouveaux coffrets sont apparus sur le marché français. De plus, nous testerons à nouveau sur des panels de sérums les coffrets ELISA qui ont été modifiés par les fabricants à la suite des évaluations que nous avons effectuées.

2) Pour les coffrets ayant des performances satisfaisantes sur sérum et si le fabricant propose un protocole spécifique pour cette analyse, nous évaluerons leurs performances sur LCR. Si cette analyse est disponible chez le fabricant, nous étudierons leurs performances pour la détermination de l'index de synthèse intra-thécale selon le protocole que nous avons validé pour cet index, basé sur l'index d'immunoglobulines. Ces évaluations se feront avec l'aide des services de Neurologie et de Maladies Infectieuses de notre CHU sur :

- un panel de LCR de patients ayant une neuroborréliose avérée
- un panel de LCR témoins de patients ayant une maladie neurologique inflammatoire diagnostiquée par un neurologue du CHU. Afin de se rapprocher le plus possible de la réalité clinique, nous avons rassemblé à cet effet un panel de 30 couples de sérums-LCR de patients ayant présenté une SEP débutante. Aucun de ces patients ne présentait avec la méthode que nous utilisons actuellement d'index positif de synthèse intra-thécale anti *Borrelia*.
- un panel de LCR témoins de patients ayant une maladie neurologique non inflammatoire diagnostiqué par un neurologue du CHU (méningite infectieuse, AVC)

Evaluation des tests de confirmation par immuno-empreinte

Nous évaluerons les tests disponibles en testant différents sérums sélectionnés parmi ceux des 5 panels utilisés pour l'évaluation des troussees ELISA et fournissant des réactions croisées en ELISA :

- Panel 1 : sérums de patients atteints d'EM diagnostiqués par des dermatologues ou des infectiologues uniquement et sans tenir compte du résultat de la sérologie
- Panel 2 : sérums de patients atteints de neuroborréliose aigue typique selon les critères de l'EUCALB et ayant une sérologie positive dans le LCR supérieure au taux de la sérologie sanguine
- Panel 3 : sérums de patients ayant une manifestation tardive de la borréliose de Lyme (arthrite ou acrodermatite)
- Panel 4 : sérums de donneurs de sang.
- Panel 5 : sérums de patients atteints de maladies donnant potentiellement des réactions croisées

S'agissant de techniques entièrement manuelles, grosse consommatrice de temps technique, ces méthodes par immuno-empreinte seront évaluées sur un nombre plus restreint de sérums que les techniques ELISA

Enfin, en temps que méthode de confirmation, le rapport coût/efficacité de cette sérologie par immuno-empreinte sera analysé en fonction des résultats observés.

Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France

Nous avons débuté à la fin de l'année 2005 une étude prospective nationale auprès des dermatologues libéraux et hospitaliers sur les différentes manifestations cutanées de la borréliose de Lyme, érythème migrant, lymphocytome cutané bénin et acrodermatite chronique atrophique et les espèces qui en sont à l'origine sur le territoire français.

Trois espèces de *Borrelia*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* et *B. garinii*, sont principalement à l'origine de ces manifestations en Europe, mais l'importance respective de ces 3

espèces en France est inconnue. Des données récentes ont aussi établi la pathogénicité pour l'homme d'autres espèces : *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, et *B. spielmanii*.

Durant l'année 2006, le recrutement de biopsies dans le cadre de ce protocole s'est heurté à des problèmes pratiques pour les dermatologues d'acheminement des prélèvements vers le laboratoire. En effet, jusqu'à présent, nous leur fournissions des tubes de culture et un emballage de sécurité volumineux répondant à la norme UN 2814 pour le retour. Ceci a découragé certains participants.

Afin de simplifier ce retour et ainsi inciter les dermatologues à continuer à participer, nous mettrons en place en 2007

- un système de colis pré-payé et pré-étiqueté pour le retour
- nous avons vérifié fin 2006 que *Borrelia* ne se multipliait que très lentement à température ambiante avec une augmentation non significative en 48H. Sachant que le nombre de *Borrelia* présentes dans un échantillon cutané est faible (nous l'avons estimé par PCR quantitative en temps réel) et malgré le fait que le milieu de transport de ces biopsies soit le milieu de culture des *Borrelia*, il est donc possible selon la réglementation actuelle, d'utiliser plus simplement un emballage UN 3373, destiné à des échantillons à but diagnostique.

Toutes les souches de *Borrelia* isolées seront adressées au CNR des *Borrelia* pour identification et étude épidémiologique.

Quand la culture est négative mais que la recherche par PCR d'ADN de *Borrelia* est positive, l'espèce pathogène causale sera identifiée par la technique de PCR en temps réel à l'aide de sondes d'hybridation spécifiques des différentes espèces que nous avons mise au point. Afin d'étudier le polymorphisme au sein de *B. afzelii*, espèce majoritaire dans les EM que nous détectés jusqu'à présent, dans les cas où la culture reste négative, le séquençage du gène ospC sera réalisé sur les prélèvements positifs en PCR et négatifs en culture.

Mise en place d'un contrôle de qualité externe

Une collaboration a été mise en place avec l'EFS de Strasbourg pour obtenir des sérums de donneurs de sang exposés aux piqûres de tiques dans notre région. Leurs sérums ont été testés par ELISA puis confirmés par western-blot. Après un entretien médical, il sera proposé à quelques sujets séropositifs ne présentant aucun signe clinique de borréliose de Lyme ainsi qu'à des sujets séronégatifs, de réaliser un nouveau don de sang pour obtenir une quantité suffisante de sérum permettant de proposer un contrôle de qualité externe pouvant être proposé à un plus grand nombre de laboratoires de biologie médicale.