

Rapport annuel d'activité

2018

**Centre de national de référence
des *Borrelia***

**Année d'exercice
2017**

Résumé analytique

La borréliose de Lyme est la plus fréquente et la plus médiatique des zoonoses de l'Hémisphère Nord. L'incidence en France est estimée actuellement à 84 cas/100 000 habitants, (réseau Sentinelles 2016), ce qui situe la France dans la moyenne haute des incidences européennes.

Surveillance clinique, biologique et vectorielle

○ Surveillance clinique et biologique humaine :

- En 2017, la surveillance a couvert 82 départements ; elle s'est basée sur l'analyse des prélèvements réceptionnés au CNR ainsi que l'étude des fiches de renseignements associées :
 - *Le CNR a reçu en 2017 9 056 sérologies, 308 couples sérums/ LCR et 433 demandes de PCR ainsi que 798 fiches de renseignements exploitables qui concernaient dans 60 % des cas des troubles neurologiques et 30 % des troubles articulaires. L'analyse des données de ces fiches montre 16,3 % de cas de Lyme certains ou probables et 53 % de cas improbables.
 - *Le western-blot a permis de confirmer l'ELISA dans 48 % des cas et est donc nettement recommandé devant un ELISA positif ou douteux.
 - *La synthèse intrathécale n'a pas confirmé le diagnostic de neuroborréliose dans 64 % des cas où le LCR est séropositif pour *Borrelia*.
 - *Aucune arthrite de Lyme séronégative n'a été observée en 10 ans. Les demandes de recherche de *Borrelia* par PCR sur liquide synovial ont augmenté de 24 % en 2017.
 - *Le CNR a diagnostiqué trois cas de fièvres récurrentes à *B. crocidurae*, toutes venant du Sénégal. Le CNR a confirmé par PCR 3 cas de suspicion d'infection à *A. phagocytophilum*.
- Le CNR participe au réseau Sentinelles depuis 2009, 204 cas ont été validés en 2017.
- Le CNR a aussi participé avec la CIRE Nord-Est à l'étude prospective ville-hôpital ALSACETIQUE (2014-2015) (portant sur la borréliose de Lyme, l'encéphalite à tiques (TBEV) et l'anaplasmose granulocytaire humaine). L'analyse des données finalisée en 2017 montre un taux d'incidence annuel moyen de 117 cas / 100 000 habitants. Ce taux est stable par rapport à 2001-2003. Près de 80 % des cas correspondaient à un érythème migrant (EM) unique ; les formes disséminées représentaient 21 % des cas, principalement des arthrites de Lyme et des neuroborrélioses. Près de 28 % des personnes présentant un érythème migrant se sont vus prescrire à tort une sérologie pour un diagnostic d'EM. Treize cas certains d'encéphalite à tiques ont aussi été observés et trois cas d'anaplasmose granulocytaire humaine ont été confirmés biologiquement.

○ Surveillance vectorielle :

- La densité de nymphes est similaire en Alsace et en Bretagne, soit 22 à 28 nymphes /100 m².
- Leur taux d'infection par *Borrelia* est similaire dans les 2 régions françaises (12 à 19 %).
- Les espèces de *Borrelia* détectées dans les tiques sont majoritairement *B. afzelii* et *B. garinii* (69 %), *B. afzelii* est plus fréquente en Alsace, *B. garinii* plus fréquente en Bretagne. *B. burgdorferi* (4 %) et *B. spielmanii* (1 %) sont peu fréquentes. Le taux d'infection par *A. phagocytophilum* ou par *B. miyamotoi* est aussi similaire dans les 2 régions (0 à 1,2 %).

Diagnostic, recherche et formation des professionnels de santé

- Le CNR a rendu publique à l'été 2017 l'étude comparative des coffrets western-blot *Borrelia*. Les résultats obtenus ont été mis sur le site internet du CNR.
- Le CNR a développé en 2017 une nouvelle technique pour l'identification des *Borrelia* agents de fièvres récurrentes, ainsi qu'une technique de typage des *Borrelia* par MSLT.
- En 2017, le CNR a isolé 9 souches humaines de *Borrelia* et a détecté 31 biopsies d'érythème migrant positives par PCR.
- En 2017, le CNR a proposé à près 180 laboratoires un EEQ en sérologie de Lyme.
- L'activité de conseil du CNR croît tous les ans. En 2017, nous avons répondu à 319 mails et 1 119 appels téléphoniques.

Le CNR a publié trois articles de rang B et un article de rang A, en 2^{ème} ou dernier auteur.

Analytical summary :

Lyme borreliosis is the most frequent and the most newsworthy zoonosis of the northern hemisphere. The incidence in France is currently around 84 cases per 100 000 inhabitants, (Sentinels 2016 network), that places France in the high average of the European incidences.

Clinical, biological and vectorial surveillance:

○ Human clinical and biological surveillance :

- In 2017, the surveillance covered 82 departments and it is based both on the analysis of the samples received in the CNR and the study of the associated datasheets:

- * The CNR received 9 056 serologies, 308 serums/cerebrospinal fluid (CSF) pairs samples and 433 PCR analysis as well as 798 exploitable datasheets which concerned in 60 % of the cases of neurological disorders and in 30 % articular disorders. The data analysis shows 16.3 % of cases of certain or likely Lyme cases and 53 % of improbable Lyme cases.

- * Western-blot analysis allowed to confirm ELISA results in 48 % of the cases and is thus highly recommended in front of ELISA positive or doubtful results.

- * The antibody index did not confirm diagnosis of neuroborreliosis in 64 % of the cases where the CSF is positive for *Borrelia*.

- * No arthritis of seronegative Lyme was observed over 10 years of the CNR activity. The number of PCR analysis for *Borrelia* on synovial liquid have increased by 24 % in 2017.

- * CNR diagnosed three cases of relapsing fever to *B. crocidurae*, coming from Senegal. CNR confirmed by PCR 3 cases of suspicions of infection in *A. Phagocytophilum*

- The CNR participates in the Sentinels network since 2009; 204 cases were validated in 2017.

- The CNR also participated with Northeast CIRE structure in the prospective city-hospital ALSACETIQUE study (2014-2015) (concerning Lyme borreliosis, Tick-borne encephalitis (TBE) and Human granulocytic anaplasmosis (HGA)). The data analysis showed an annual mean incidence rate of 117 cases / 100 000 inhabitants. This rate is stable as compared to 2001-2003 data. Almost 80 % of the cases corresponded to a unique erythema migrans (EM) ; the disseminated manifestations represented 21 % of the cases, mainly Lyme arthritis and neuroborreliosis. About 28 % of the people presenting an EM had a wrong prescription for serology for a diagnosis of EM. Thirteen certain cases of Tick-borne encephalitis were also observed and three cases of Human granulocytic anaplasmosis were biologically confirmed.

○ Vectorial surveillance:

- The density of nymphs was similar in Alsace and Bretagne (22 to 28 nymphs/100 m²).
- In these two regions, the rate of tick infection by *Borrelia* was similar (12 to 19 %). The species of *Borrelia* detected in the ticks were mainly *B. afzelii* and *B. garinii* (69 %). *B. afzelii* was more frequent in Alsace and *B. garinii* was more frequent in Bretagne. *B. burgdorferi* (4 %) and *B. spielmanii* (1 %) were less frequent. The infection rate by *A. phagocytophilum* or by *B. miyamotoi* was also similar in these regions (0 to 1,2 %).

Diagnosis, research and formation of the healthcare professionals

- During summer 2017, the CNR made public the comparative western-blot *Borrelia* evaluation study. The results are available on the website of the CNR.
- The CNR developed in 2017 a new technique for the identification of *Borrelia* agents of relapsing fever as well as a typing technique of *Borrelia* by MSLT.
- In 2017, the CNR isolated 9 human strains of *Borrelia* and detected 31 erythema migrans biopsies as positive by PCR.
- In 2017, the CNR proposed to about 180 laboratories an EEQ in Lyme serology.
- The advice activity of the CNR increases every year. In 2017, we answered 319 e-mails and 1 119 phone calls.

In 2017, the CNR published three articles of rank B and an article of rank A, in 2nd or last author.

1	Missions et organisation du CNR.....	2
2	Activités d'expertise.....	3
2.1	Évolutions des techniques	3
2.1.1.	Modification de la technique d'identification des <i>Borrelia</i> agents de fièvres récurrentes	3
2.1.2.	Mise au point d'une technique de typage des <i>Borrelia</i> par MSLT	4
2.2	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses	6
2.3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	6
2.4	Collections de matériel biologique	6
2.5	Activités d'expertise	8
2.6	Activités de séquençage.....	8
3	Activités de surveillance	9
3.1	Description du réseau de partenaires	9
3.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	11
3.2.1.	Surveillance humaine	11
3.2.2.	Surveillance vectorielle	23
3.3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	32
3.4	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	32
3.4.1.	Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France et le réseau Sentinelles	32
3.5	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	33
3.5.1.	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance - Réseau ALSA(CE)TIQUES	33
3.5.2.	Etude de la diversité des espèces de <i>Borrelia</i> dans les manifestations cutanées de la borreliose de Lyme (PRI 3977)	34
3.5.3.	PHRC « DIABOLYC : Diagnostic Borreliose de Lyme Cutané »	35
4	Alerte.....	36
5	Activités de rétro-information, de formation et de conseil	36
5.1	Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	36
5.1.1.	Liste des enseignements	36
5.1.2.	Formation médicale continue aux professionnels de santé	37
5.1.3.	Information pour les médias grand public et site internet.....	37
5.1.4.	Accueil de stagiaires.....	38
5.1.5.	Thèse de doctorat, participation à des jurys	39
5.2	Conseil et expertise aux autorités sanitaires	39
5.3	Conseil pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	40
5.4	Conseil aux professionnels	41
5.4.1.	Organisation annuelle d'un Contrôle de Qualité Externe proposé par le CNR	41

5.4.2.	Activités de conseil et organisation des communications écrites et orales	43
6	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	47
6.1	Activités de recherche en 2017 en lien direct avec les missions et activités du CNR....	47
6.1.1.	Analyse de la latence et de l'organotropisme de <i>Borrelia</i> dans la peau par une approche protéomique de <i>Borrelia</i> : application à un diagnostic tardif de la borreliose de Lyme.....	47
6.1.2.	Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de <i>Borrelia</i> dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse.....	48
6.1.3.	Mise au point d'une technique d'identification de tiques par spectrométrie de masse, notamment d' <i>Ixodes</i>	49
6.1.4.	Analyse du rôle du microbiome cutané dans l'attraction des tiques et sur la transmission précoce de <i>Borrelia</i>	49
6.1.5.	Développement d'un vaccin canin contre la borreliose de Lyme	50
6.1.6.	Aspects épidémiologiques de la borreliose de Lyme en zone d'endémie.....	50
6.1.7.	Mise au point d'un modèle murin de fièvres récurrentes à <i>Borrelia crocidurae</i>	51
6.2	Liste des publications et communications en 2017	51
6.2.1.	Publications nationales	51
6.2.2.	Publications internationales.....	51
6.2.3.	Communications nationales	52
6.2.4.	Communications internationales	52
6.2.5.	Conférences sur invitation, congrès, séminaires	52
7	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	53

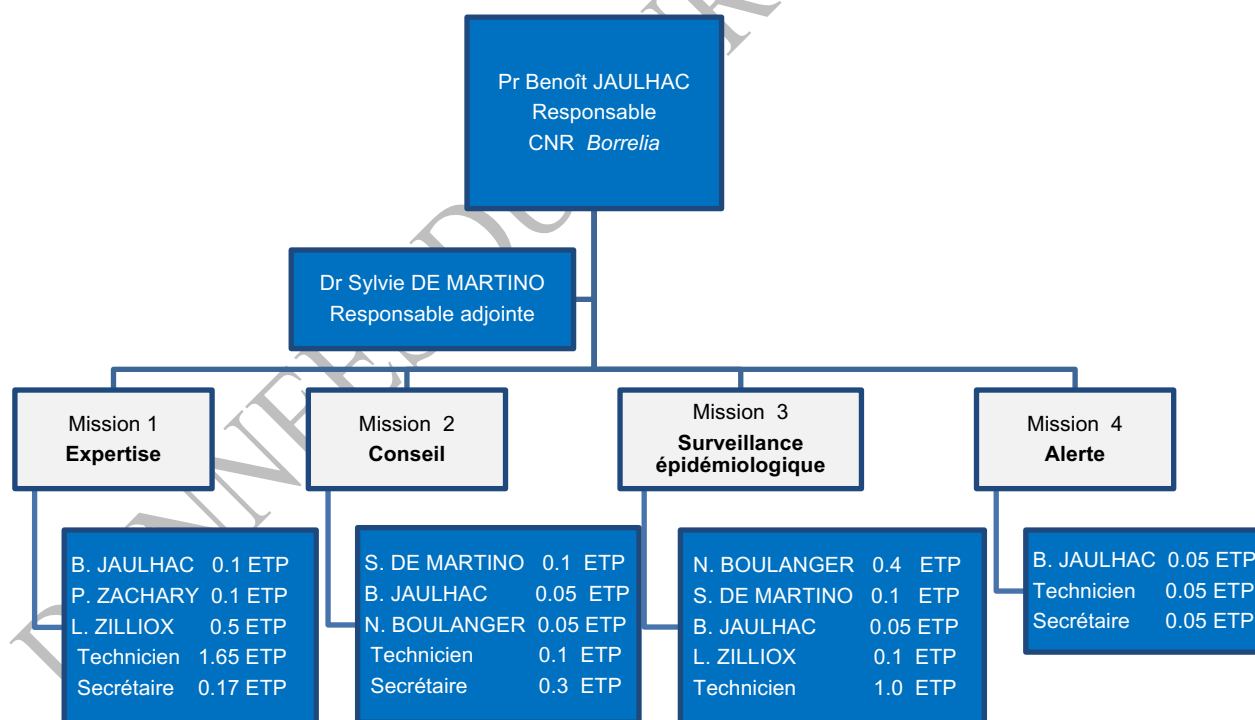
1 Missions et organisation du CNR

En préambule, il peut être important de rappeler que suite à un remaniement taxonomique récent, qui fait encore débat dans la communauté scientifique, on distingue maintenant deux genres bactériens : les genres *Borrelia* et *Borrelia*.

Le genre *Borrelia* comprend dorénavant exclusivement les espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes principalement transmises par des tiques dites « molles » du genre *Ornithodoros* (*B. crocidurae*, *B. hermsii*, *B. hispanica*, etc.), présentes en Afrique, au Proche-Orient, en Asie et en Amérique du Nord. Elles ne sont classiquement pas présentes en Europe et les cas européens sont des cas d'importation. Un intérêt particulier s'est porté récemment sur *Borrelia miyamotoi*, espèce transmise, comme les espèces de *Borrelia*, par piqûre de tiques « dures », du genre *Ixodes*, présentes en Europe.

Le nouveau genre *Borrelia* comprend les espèces responsables de la borreliose de Lyme (ancien complexe d'espèces ou groupe *B. burgdorferi* sensu lato). Au sein de ce genre constitué actuellement de 21 espèces, *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* sont les 3 principales espèces actuellement isolées chez l'Homme.

Organigramme du CNR *Borrelia* en 2017 :



2 Activités d'expertise

Evolutions 2017 :

- Mise au point d'une nouvelle technique pour l'identification des espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes (cf. 2.1.1) plus précise sur les espèces fréquentes au CNR (*B. crocidurae* et *B. hispanica*) : il s'agit d'une double PCR en point final pour identification au rang d'espèce d'agents de fièvres récurrentes par SLPA (Toledo et al., 2010) après PCR de détection positive (méthode actuelle, PCR en temps réel).
- Mise au point d'une technique de typage des *Borrelia* par MSLT (cf. 2.1.2) : il s'agit d'une PCR basée sur l'étude de 8 loci, méthode adaptée de Margos et al., 2008.

2.1 Évolutions des techniques

2.1.1. Modification de la technique d'identification des *Borrelia* agents de fièvres récurrentes

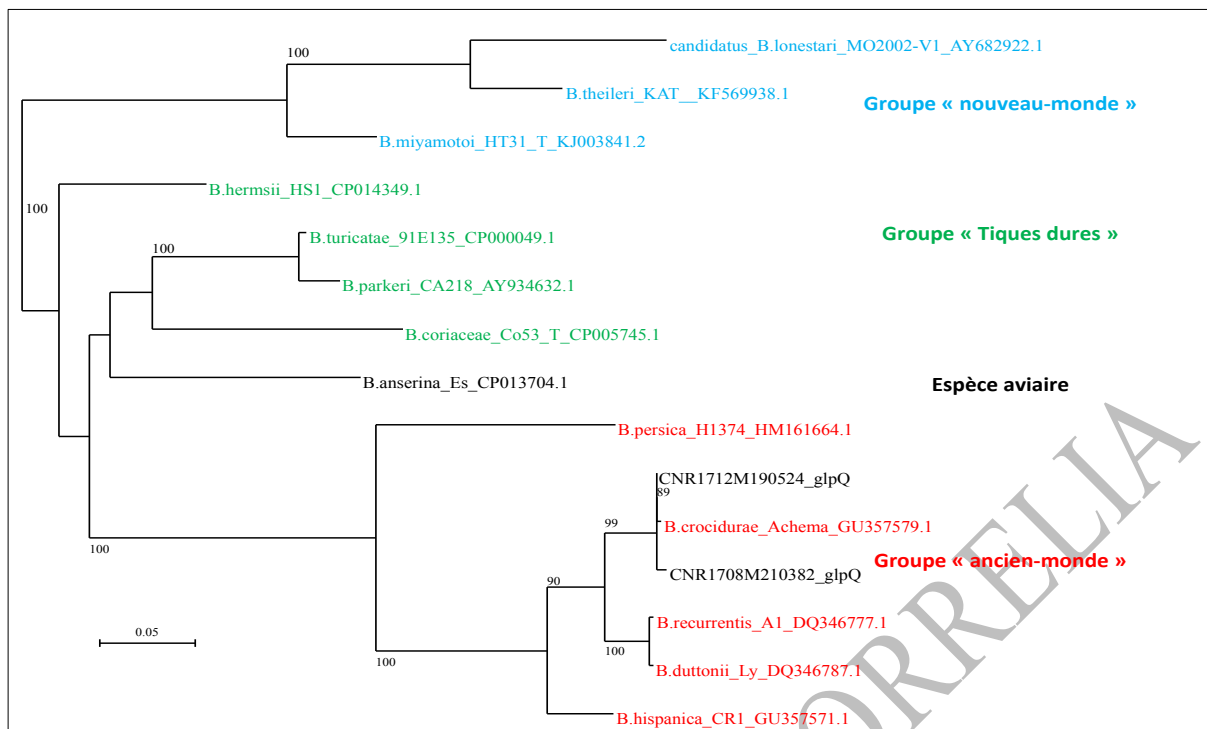
La cible de la PCR actuellement employée pour les agents de fièvres récurrentes au CNR, est située sur le gène de l'ADNr 16S, très conservé au sein du genre *Borrelia*. Le séquençage partiel de ce gène (254 paires de base (bp)) peut ne pas être suffisamment robuste pour une identification au rang d'espèce de certaines souches en particulier pour les espèces *B. crocidurae*, *B. duttonii* et *B. hispanica* (cf. phylogénie ADNr 16S).

Nous avons donc développé une méthode SLPA (single locus sequence typing) permettant d'identifier les souches principalement détectées à partir du sang total de patients lors des épisodes de fièvres récurrentes.

Le gène utilisé pour améliorer l'identification au rang d'espèce est le gène codant de la glycerophosphodiester phosphodiesterase GlpQ (333 acides aminés). Au sein du genre *Borrelia*, ce gène de 999 pb est spécifique et absent du génome des spirochètes du genre *Borrelia* agents de la borreliose de Lyme (<http://borreliabase.org>).

En pratique, 2 PCR en point final sont réalisées afin d'amplifier 2 régions du gène *glpQ* (*glpQ*-fragment 1 de 599 pb et *glpQ*-fragment 2 de 453 pb).

Après vérification de l'amplification par électrophorèse en gel d'agarose, les amplicons de *glpQ*-fragment 1 et *glpQ*-fragment 2 sont séquencés en sens et en anti-sens ; les séquences des 2 fragments de *glpQ* sont nettoyées et concaténées (en un gène partiel de 655 pb). Une phylogénie par maximum de vraisemblance (modèle GTR, 100 bootstraps) est construite en utilisant les données de séquences des souches types disponibles et permet une identification au niveau d'espèce de l'ADN étudié.



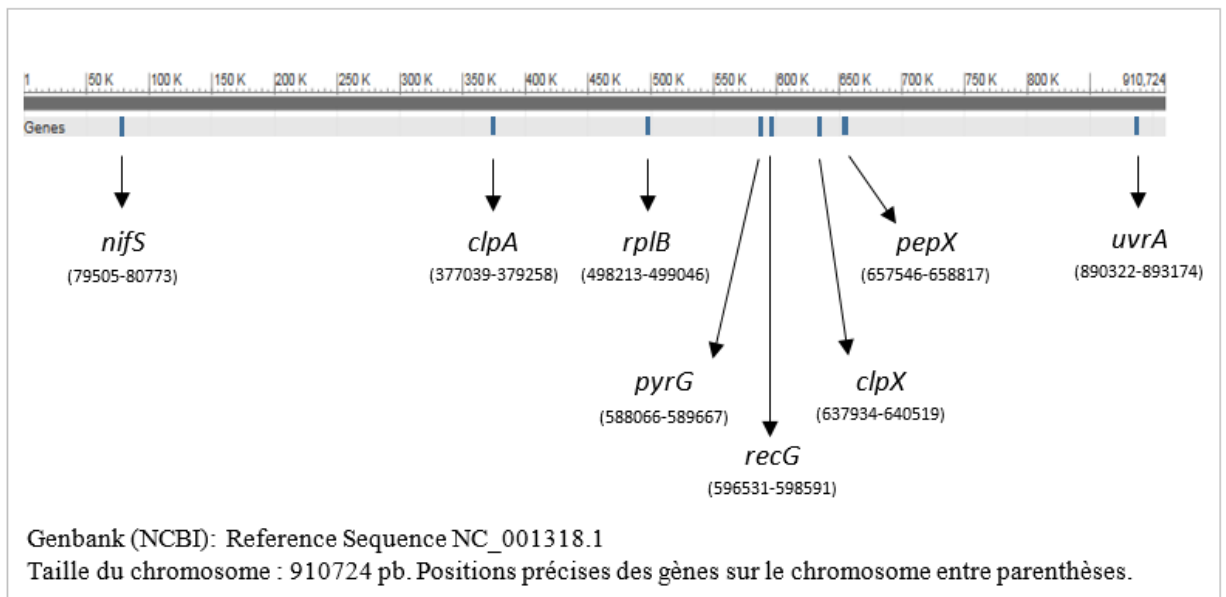
Gène *glpQ* partiel (655 pb). Arbre phylogénétique (modèle PhyML, 100 bootstraps)

Cet arbre montre la bonne séparation des différentes espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes et espèces apparentées.

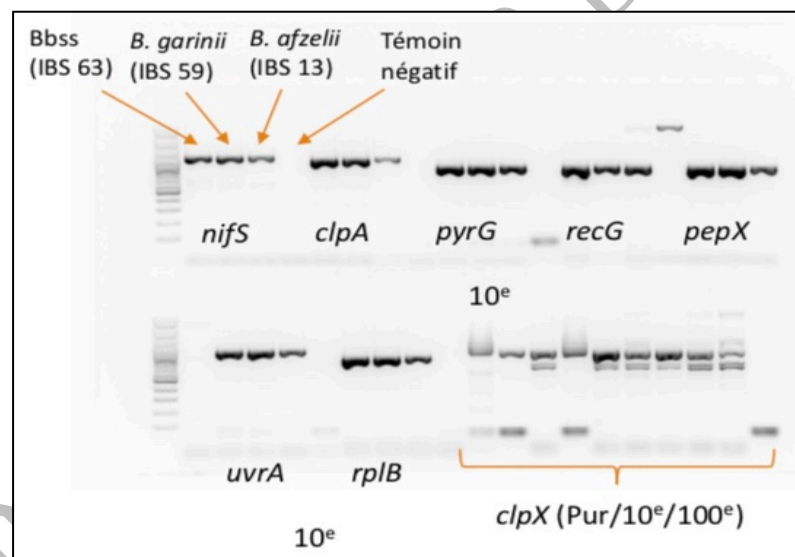
2.1.2. Mise au point d'une technique de typage des *Borrelia* par MLST

Les mécanismes impliqués dans la dissémination des *Borrelia* et déterminant le type d'attente disséminée n'ont à ce jour pas été élucidés. Certains génotypes de *Borrelia* déterminés par le séquençage de séquences intergéniques ribosomiques ou du gène *ospC* ont précédemment été associés à une capacité de dissémination plus importante chez l'Homme. Cependant, il a récemment été suggéré que le typage génotypique par Multi Locus Sequence Typing (MLST) est associé à une meilleure aptitude pour différencier les souches de *B. burgdorferi* selon leur capacité de dissémination [Hanincova K et al. 2013]. Le MLST pourrait donc être un outil précieux pour l'identification éventuelle de génotypes associés à un pouvoir invasif plus important ou à un organotropisme particulier.

Un schéma de MLST adapté au typage des spirochètes du genre *Borrelia* (espèces de fièvre récurrente) et du genre *Borrelia* (espèces de la borréliose de Lyme) existe [Margos et al., 2008]. La technique porte sur le séquençage, après amplification par PCR simple ou nichée, de huit loci de gènes de ménage répartis sur le chromosome linéaire de ces spirochètes. La combinaison des séquences alléliques de l'ensemble des loci étudiés (et donc de ces numéros alléliques) définit un génotype appelé séquence type (ST). Une seule différence de nucléotide au sein de la séquence d'un seul locus suffit pour distinguer deux ST.



Après conseils auprès de G. Margos du CNR allemand des *Borrelia*, nous avons adapté et implanté pour le typage de souches appartenant aux trois principales espèces de *Borrelia* pathogènes pour l'Homme en Europe (*B. afzelii*, *B. garinii* et *B. burgdorferi*) :



Bien que cette approche soit plus lourde que le séquençage de séquences intergéniques ribosomiques ou de *ospC* pour le typage de *Borrelia* spp., le MLST associe un important pouvoir discriminant avec l'utilisation possible des résultats pour mener des études épidémiologiques et phylogénétiques fines. Ainsi, cette technique de typage génotypique a déjà permis la définition de nouvelles espèces de *Borrelia* telles que *B. bavariensis*, *B. kurtenbachii*, *B. yangtsensis*, *B. mayonii* et tout récemment *B. lanei*.

En outre, elle présente l'avantage majeur d'être standardisée et d'être associée à une base de données internationale en ligne qui référence toutes les ST décrites. Ceci permet des études de grande envergure avec l'incorporation de génotypes précédemment décrits par d'autres laboratoires. Le MLST constitue aujourd'hui la référence pour le typage génotypique de *Borrelia* spp. Devant ces multiples intérêts et applications potentielles, nous avons décidé d'implanter la technique de MLST de *Borrelia* spp. au sein du CNR des *Borrelia*.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2017, le CNR a finalisé et rendu public l'évaluation des kits d'immuno-empreinte pour la sérologie de Lyme.

La méthodologie, les références des trousse testées et le détail des résultats obtenus ont été mis sur le site internet du CNR à l'été 2017 : www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia

Le CNR a ensuite répondu à des questions complémentaires de la part des biologistes médicaux sur les différents kits testés.

Principaux résultats :

- Les trousse IgG testées montrent une spécificité très proche sur les donneurs de sang, variant de 94,2 % à 100 % ; des différences existent sur les panels de sérums de réactions croisées, variant de 80,9 % à 100 %.
- Les trousse IgM testées montrent une spécificité sur les donneurs de sang variant de 93,9 % à 100 % ; des différences notables ont été mises en évidence sur les panels de sérums de réactions croisées, variant de 88,5 % à 100 %.
- En terme de sensibilité, des différences entre les trousse IgG apparaissent entre les coffrets sur les panels de sérums de neuroborrélioses. Les valeurs varient de 65,5% à 100 %.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Néant en 2017.

2.4 Collections de matériel biologique

Evolution de nos collections en 2017 :

En 2017, nous avons isolé à partir de prélèvements humains 8 nouvelles souches de *B. afzelii* et 1 souche de *B. burgdorferi*.

La collection de souches du CNR s'élève fin 2017 à 216 souches (tableau en annexe 1.4)

En 2017, à partir de l'étude des fiches de renseignements cliniques adressées au CNR, nous avons conservé 218 nouveaux échantillons (148 sérums et 70 LCR).

La sérothèque humaine du CNR comprend fin 2017 2 560 échantillons humains (cf. tableau en annexe 1.4).

Durant l'année 2017, le CNR a fourni des échantillons à différents laboratoires :

Date d'envoi	Matériel biologique	Souche	Projet	Destinataire
29/03/2017 07/04/2017 24/04/2017 11/05/2017 19/06/2017 11/07/2017	Culture bactérienne Tubes de milieu de culture Extraits d'ADN	<i>Borrelia afzelii</i> IBS 39 <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> B31	"Impact of chronic bacterial infection on NKT cell lymphomagenesis in mice and humans"	Rémy Robinot (PhD student) Laboratoire INSERM U1052/CRCL (Lyon)
18/04/2017	Biopsies cutanées	/	Projet de protéomique <i>Borrelia</i>	Paola Cantero Liz (PhD student) IPHC-ECPM Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (Strasbourg)
16/05/2017	Culture bactérienne	<i>Borrelia garinii</i> IBS 6		Laurent Thiery Enalees SAS (Evry)
08/09/2017	Tiques	<i>Ixodes ricinus</i>	Projet de protéomique <i>Borrelia</i>	Pr. Laurence Sabatier IPHC-ECPM Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (Strasbourg)
20/12/2017	Culture bactérienne	<i>Borrelia afzelii</i> IBS 39	"Impact of chronic bacterial infection on NKT cell lymphomagenesis in mice and humans"	Dr. Laurent Genestier Laboratoire INSERM U1052/CRCL (Lyon)

2.5 Activités d'expertise

	Nombre	Provenance	Origine	Détails
Prélèvements humains	9 082	CHs, CHUs, LABMs	France	Voir chapitre 3.2.1 et 3.5
Analyses humains	11 940	CHs, CHUs, LABMs	France	Voir chapitre 3.2.1 et 3.5
Fiches de renseignements	1 407	CHs, CHUs, LABMs	France	Voir chapitre 3.2.1.5
Prélèvements vecteurs (tiques)	4 829 (4 330 nymphes et 499 adultes)	Collecte par le CNR et collaborateurs	France	Voir chapitre 3.2.2
Analyses vecteurs	7 027 (recherche d'ADN de 3 paramètres)	Collecte par le CNR et collaborateurs	France	Voir chapitre 3.2.2

Délai moyen de restitution des résultats :

- Analyses de sérologie (ELISA, western-blot, Synthèse Intrathécale) : 2 à 10 jours
- Analyses de biologie moléculaire : 2 jours à 3 semaines
- Analyses de culture : 13 semaines

2.6 Activités de séquençage

- Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ? **OUI**
 - Type d'accès (interne ou externe au CNR) : externe
 - si externe, préciser quelle(s) plateforme(s) : GATC – Eurofinsgenomics
 - Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès : Sanger (ABI 3730 XL), WGS (Illumina)
- Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique : **OUI**
 - Type d'accès : interne au CNR ;
 - Outils utilisés pour l'analyse des séquences : ClustalW (Mega 7.0), DnaSP 5.10, START 2.0, W-IQ-Tree, PHYLOViZ, ARLEQUIN 3. Tous outils open source
- Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ? **OUI**
 - Investigations d'épidémies ? **NON**
 - Surveillance ? **OUI**

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites :

- En 2017, nous avons mis au point la technique de MLST.
- En 2018, elle sera appliquée en 2018 sur les souches en collection du CNR et

si le MLST direct sur échantillons positifs est validé, il sera appliqué chaque année à tous les échantillons humains positifs (culture et PCR) du CNR.

- EN 2019, le cgMLST sera testé et comparé au MLST. Son utilisation sera ensuite envisagée en fonction des données internationales (pas de publications actuellement sur cgMLST et *Borrelia*)

Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :

- Nombres de séquences réalisées dans l'année : 2 000
- Modalités de sélection des souches pour séquençage : mise au point de la méthode en 2017. Les modalités de sélection seront définies en 2018

Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastq files) :

- Les séquences sont déposées dans un banque internationale publique : online MLST *Borrelia* database (gestionnaire : G. Margos, CNR *Borrelia* Munich)

3 Activités de surveillance

Résumé des activités de surveillance :

- *Surveillance humaine* : couvre 82 départements. 60 % des demandes pour des troubles neurologiques, 30 % pour des troubles articulaires. L'étude des fiches de renseignements montre 20,8 % de cas certains, probables ou possibles et 53 % de cas improbables.
 - Le western-blot confirme l'ELISA dans 48 % des cas et est donc recommandé devant un ELISA positif ou douteux.
 - La synthèse intrathécale permet d'écarter le diagnostic de NB dans 64 % des cas où le LCR est positif.
 - Aucune arthrite de Lyme séronégative observée en 10 ans d'activité du CNR. Les demandes recherche de *Borrelia* par PCR sur liquide synovial augmente de 24 %.
 - 3 cas de fièvres récurrentes en 2017, toutes venant du Sénégal, toutes à *B. crocidurae*.
 - 3% des suspicions d'infection à *A. phagocytophilum* confirmés par PCR.
 - Participation du CNR au réseau Sentinelles depuis 2009.
- *Surveillance vectorielle* :
 - Densité de nymphes similaire en Alsace et en Bretagne : 22 à 28/100 m².
 - Taux d'infection des tiques par *Borrelia* similaire dans les 2 régions : 12 à 19 %.
 - Taux d'infection des tiques par *A. phagocytophilum* ou à *B. miyamotoi* similaire dans les 2 régions : 0 à 1,2 %.
 - Espèces de *Borrelia* dans les tiques : *B. afzelii* + *B. garinii* : 69 % (*B. afzelii* majoritaire en Alsace, *B. garinii* majoritaire en Bretagne), *B. valaisiana* 20 %. Plus rarement : *B. burgdorferi* : 4 % et *B. spielmanii* : 1 %.

3.1 Description du réseau de partenaires

- a. Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France (PRI 3977)

Voir détails dans la partie 3.5.1

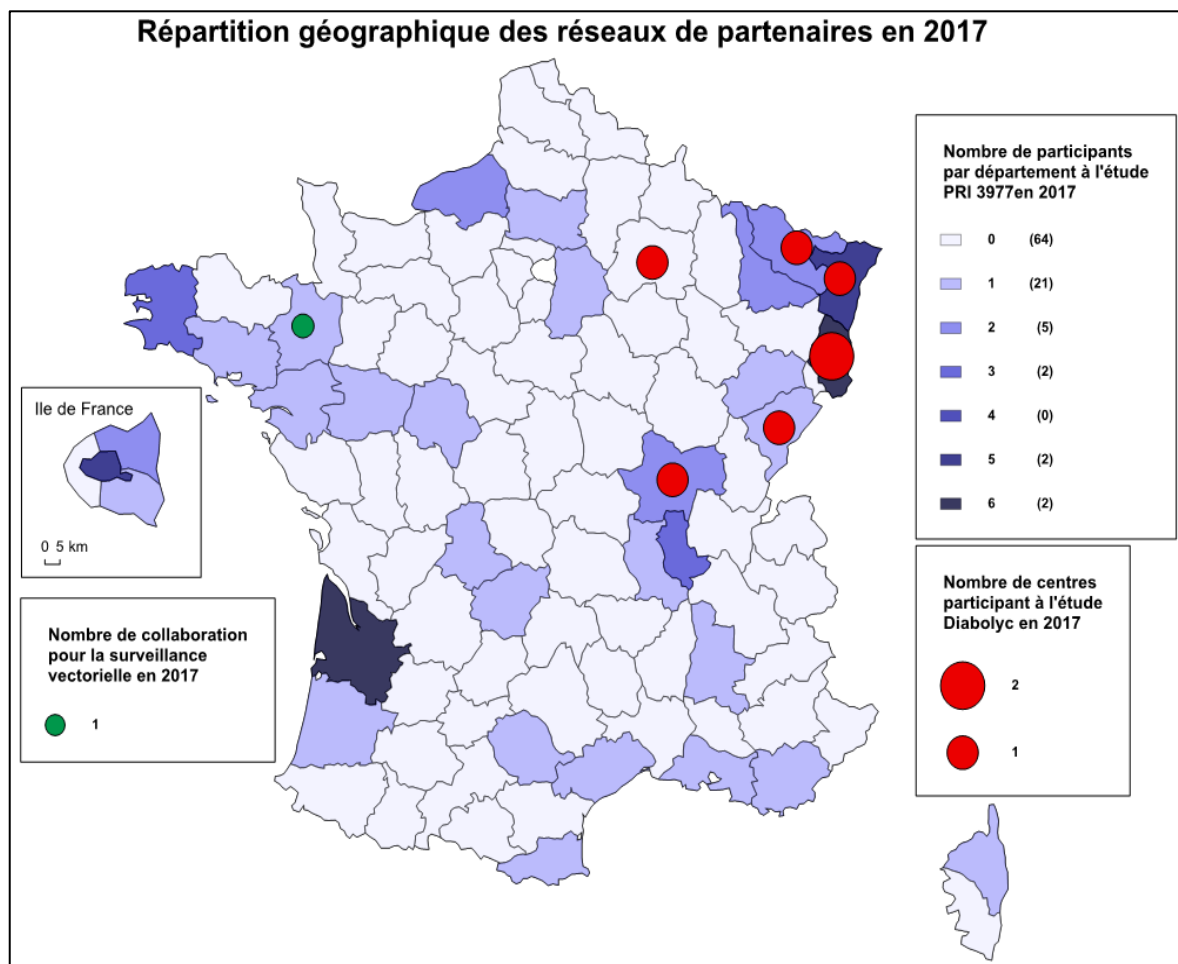
- b. Etude « DIABOLYC : Diagnostic Borréliose de Lyme Cutané »

Voir détails dans la partie 3.5.2

c. Collaboration pour la surveillance vectorielle

Durant le précédent mandat (2015), nous avons mis en place une collaboration avec la Dre Brigitte Degeilh (CHU Rennes). Avec le nouveau mandat du CNR, cette collaboration pour la surveillance vectorielle s'est mise en place.

Ces trois réseaux de partenaires n'ont pas évolué en 2017.



Estimation de la couverture du réseau ou représentativité :

Dans le cadre du PRI biopsies cutanées, nous recevons des prélèvements cutanés (érythème migrant, acrodermatite chronique atrophique ou lymphocytome borrélien) effectués par des dermatologues et infectiologues de 32 des départements français, répartis dans les différentes grandes régions françaises. L'érythème migrant étant lié à la multiplication des *Borrelia* au point d'inoculation de la tique, cela nous permet d'avoir une représentation et un suivi dans le temps de la diversité des espèces de *Borrelia* infectant l'Homme sur le territoire métropolitain, Corse comprise et de voir émerger éventuellement de nouvelles espèces qui seraient pathogènes pour l'Homme sur notre territoire.

Le protocole Diabolyc, plus contraignant sur les prélèvements à effectuer, est centré essentiellement sur le quart Nord-Est de la France

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1. Surveillance humaine

L'activité diagnostique du CNR *Borrelia* repose sur des analyses de sérologie (ELISA, Western-Blot, index de synthèse intrathécale SIT) et des analyses de biologie moléculaire (PCR).

Ces analyses peuvent être réalisées à titre gratuit si elles sont accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et épidémiologique (cf. annexe 2.3.2). Le recueil de ces fiches de renseignements entre dans le cadre de nos activités de surveillance des cas humains de borréliose de Lyme et l'ensemble de ces données sont analysées au chapitre 3.2.1.5. En l'absence de cette fiche de renseignements ou de compte rendu équivalent du cas clinique, l'analyse est réalisée et facturée à l'établissement demandeur par le CHU de Strasbourg.

En 2017, 9 473 échantillons biologiques ont été réceptionnés par le CNR *Borrelia* ; 9 056 (95,6 %) étaient accompagnés de demandes de sérologie, 506 (5,3 %) étaient accompagnés de demande d'analyses en biologie moléculaire et 79 (0,8 %) accompagnés de demande d'analyse par culture. Parmi ces différents échantillons biologiques, 169 (1,7 %) ont été adressés avec une double demande : soit sérologie et PCR soit PCR et culture, ce qui explique que le total des demandes soit supérieur au total des échantillons biologiques réceptionnés.

Sur l'ensemble de ces échantillons, le nombre d'analyses réalisées au total s'élève à 11 940 : 11 320 analyses en sérologie, 546 analyses en biologie moléculaire (433 en PCR *Borrelia*, 10 PCR *Borrelia*, 103 en PCR *Anaplasma*) et 74 en culture.

3.2.1.1 Expertise des sérologies *Borrelia* (anciennement *B. burgdorferi* sensu lato)

3.2.1.1.1 Sérologie de 1^{ère} intention par ELISA en 2017

Le CNR a réalisé 7 623 sérologies par ELISA, sur 5 530 sérums et 2 093 LCR.

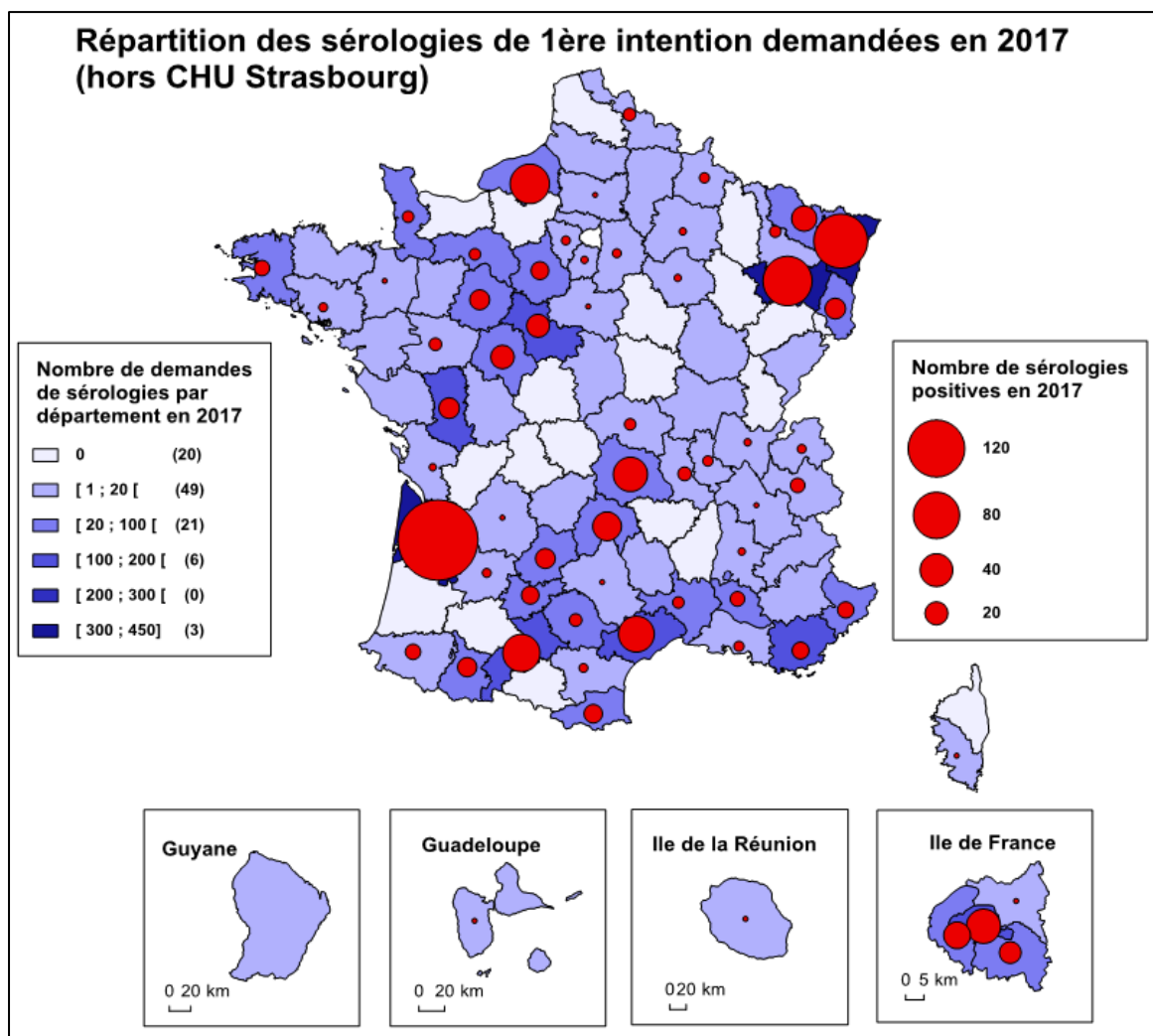
Origine géographique (hors CHU de Strasbourg) des demandes et des résultats positifs pour les sérologies de 1^{ère} intention par ELISA adressées au CNR des Borrelia en 2017 :

En 2017, les demandes, hors CHU de Strasbourg, représentaient 3 230 analyses.

La carte en page suivante objective le nombre d'analyses adressées au CNR par département demandeur et le nombre d'analyses positives en sérologie de 1^{ère} intention. Ces échantillons biologiques provenaient de 79 départements répartis sur l'ensemble du territoire national dont 3 départements d'outre-mer (Guadeloupe, Guyane, Réunion).

Sur cette carte, les départements en blanc ne nous ont adressé aucune demande.

Concernant l'Alsace, les nombreuses demandes du CHU de Strasbourg ont été volontairement exclues, elles seront analysées par la suite dans un paragraphe dédié.



Ces 3 230 demandes nationales (hors CHU de Strasbourg) concernent :

- 2 094 sérums dont 793 (37,9 %) étaient positifs et 195 (9,3 %) douteux en ELISA
- 1 136 LCR dont 303 (26,7 %) étaient positifs et 49 (4,3 %) douteux.

Au total, 1 340 échantillons étaient positifs (33,9 %) ou douteux (7,6 %) en ELISA. La spécificité de ces résultats a ensuite été confirmée par immuno-empreinte, conformément aux recommandations nationales et européennes.

On constate que deux cas sont rapportés Outre-Mer : un à la Réunion et un en Guadeloupe. Après enquête, le patient malade à l'île de la Réunion avait piqué en Ile-de-France ; celui malade en Guadeloupe avait été piqué en Auvergne.

Demandes de sérologie de 1^{ère} intention par ELISA provenant du CHU de Strasbourg en 2017 :

Les demandes du CHU de Strasbourg (Alsace), zone d'endémie de la borréliose de Lyme, représentent 4 393 analyses, soit environ 1,3 fois plus que l'ensemble des demandes nationales.

Les 4 393 demandes du CHU de Strasbourg sont réparties de la manière suivante :

- 3 436 sérums dont 1018 (29,6 %) étaient positifs ou douteux en ELISA

- 957 LCR dont 117 (12,2 %) étaient positifs ou douteux
- Ces taux de positivité et douteux sont plus faibles que parmi les demandes reçues de l'ensemble du territoire français, alors que le taux d'infection des tiques en Alsace est élevée ainsi que l'incidence de cette pathologie. Cela est probablement dû à une demande très fréquente de sérologie *Borrelia*, cette étiologie étant très fréquemment évoquée en Alsace lors du diagnostic étiologique d'une pathologie.

Parmi ces 4 393 demandes du CHU de Strasbourg, 1 135 (25,8 %) sont positives ou douteuses en sérologie de 1^{ère} intention par ELISA.

3.2.1.1.2 Sérologie de confirmation par immunoempreinte (ou western-blot) en 2017

En 2017, 3 286 sérologies de confirmation ont été réalisées par western-blot (WB). Cette activité est en augmentation de 15 % par rapport à 2016.

Répartition géographique des demandes et des résultats positifs de sérologies de confirmation par WB en 2017 :

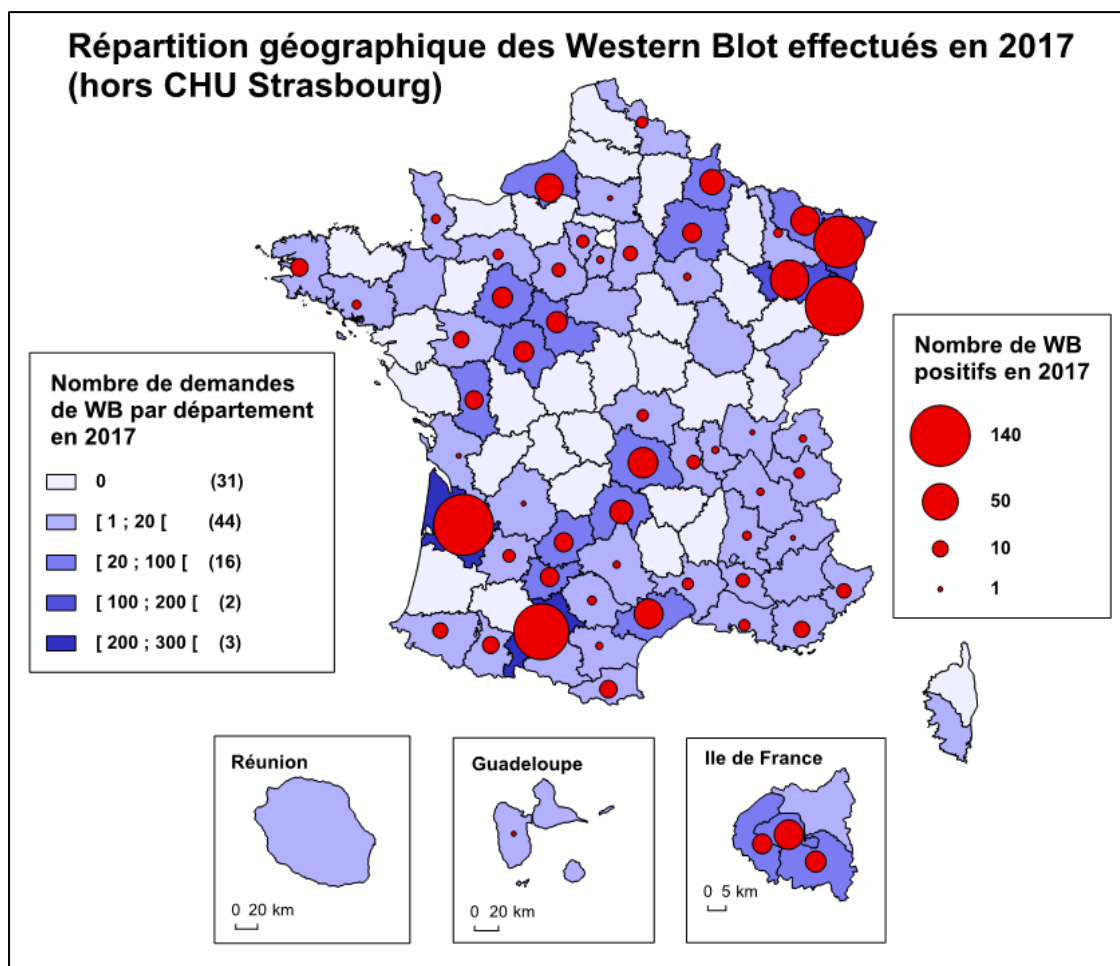
Les demandes de confirmation sérologique adressées en 2017 provenaient de 67 départements répartis sur le territoire national dont 2 départements d'outre-mer (Guadeloupe et Réunion).

En 2017, les demandes hors CHU de Strasbourg, représentaient 2 104 analyses et concernaient :

- 1 663 sérums dont 753 positifs (45,3 %)
- 441 LCR dont 317 positifs (71,9 %)

La carte en page suivante représente le nombre de demandes adressées au CNR *Borrelia* par département demandeur ainsi que le nombre de résultats positifs obtenus par sérologie de confirmation en WB par département.

En 2017, 65 départements nous ont adressé des prélèvements. Les départements en blanc ne nous ont adressé aucune demande. En Alsace, les nombreuses demandes du CHU de Strasbourg ont été exclues, elles sont analysées par la suite dans un paragraphe dédié.



Les sérologies de confirmation ont été réalisées sur 2 678 sérums et 557 LCR.

Sur ces 3 286 analyses, 1 591 étaient positives en WB soit 48,4 %. Le résultat du WB a infirmé plus de la moitié des échantillons initialement détectés positifs ou douteux en 1^{ère} intention. Ce taux élevé de réactions croisées en ELISA objective l'importance de l'analyse de confirmation par WB avant de conclure à la positivité de la sérologie pour la borréliose de Lyme.

Dans 23,8 % des cas, le WB seul a été réalisé sur des sérums ou LCR préalablement dépistés positifs en sérologie de 1^{ère} intention par ELISA par les laboratoires demandeurs. Le but du WB étant de confirmer la spécificité des anticorps dépistés en 1^{ère} intention, il n'est pas systématiquement réalisé par certains laboratoires qui préfèrent externaliser cette prestation, notamment ceux localisés en zone de plus faible endémie. Ces 782 demandes (686 sérums et 96 LCR) provenaient de 35 départements français.

Certains départements ont recouru au CNR très fréquemment (1 à 5 fois/semaine), d'autres épisodiquement :

Nombre de départements	Nombre de demandes en 2017
27	1-10
5	10 - 50
3	50 - 265

Demandes de confirmation de sérologie par western-blot provenant du CHU de Strasbourg en 2017 :

Les demandes du CHU de Strasbourg, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, représentaient 1 182 analyses, soit environ la moitié de l'ensemble des demandes nationales.

Les 1 182 demandes du CHU de Strasbourg étaient réparties de la manière suivante :

- 1 066 sérums dont 457 (42,9 %) étaient positifs
- 116 LCR dont 67 (57,8 %) étaient positifs

3.2.1.1.3 Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti *Borrelia* en 2017

Les neuroborrélioses représentent en France et dans les différents pays d'Europe, la forme disséminée la plus fréquente de la borréliose de Lyme. De plus, la mise en évidence d'une synthèse intrathécale (SIT) spécifique d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* sensu lato fait partie en Europe, à la différence des USA, des critères pour poser le diagnostic de certitude d'une neuroborréliose.

Dans le cadre de nos conseils à professionnels de santé, nous avons continué en 2017, à diffuser auprès des cliniciens et des biologistes, l'intérêt de cet outil pour le diagnostic des neuroborrélioses, notamment par rapport à la PCR qui ne doit être réalisée que dans des cas très précis (tout début des neuroborrélioses aiguës et en complément de la synthèse intrathécale) et à expliquer aux biologistes libéraux ou hospitaliers le protocole pratique pour réaliser cette analyse.

En 2017, 1 478 demandes de recherche de synthèse intrathécale nous ont été adressées. Ce nombre de demandes est stable par rapport à 2016.

In fine, 1 067 (72,2 %) n'ont pas été réalisées en raison de sérologie négative dans le sérum et/ou le LCR ; dans ce cas de figure, la recherche de SIT n'est pas indiquée.

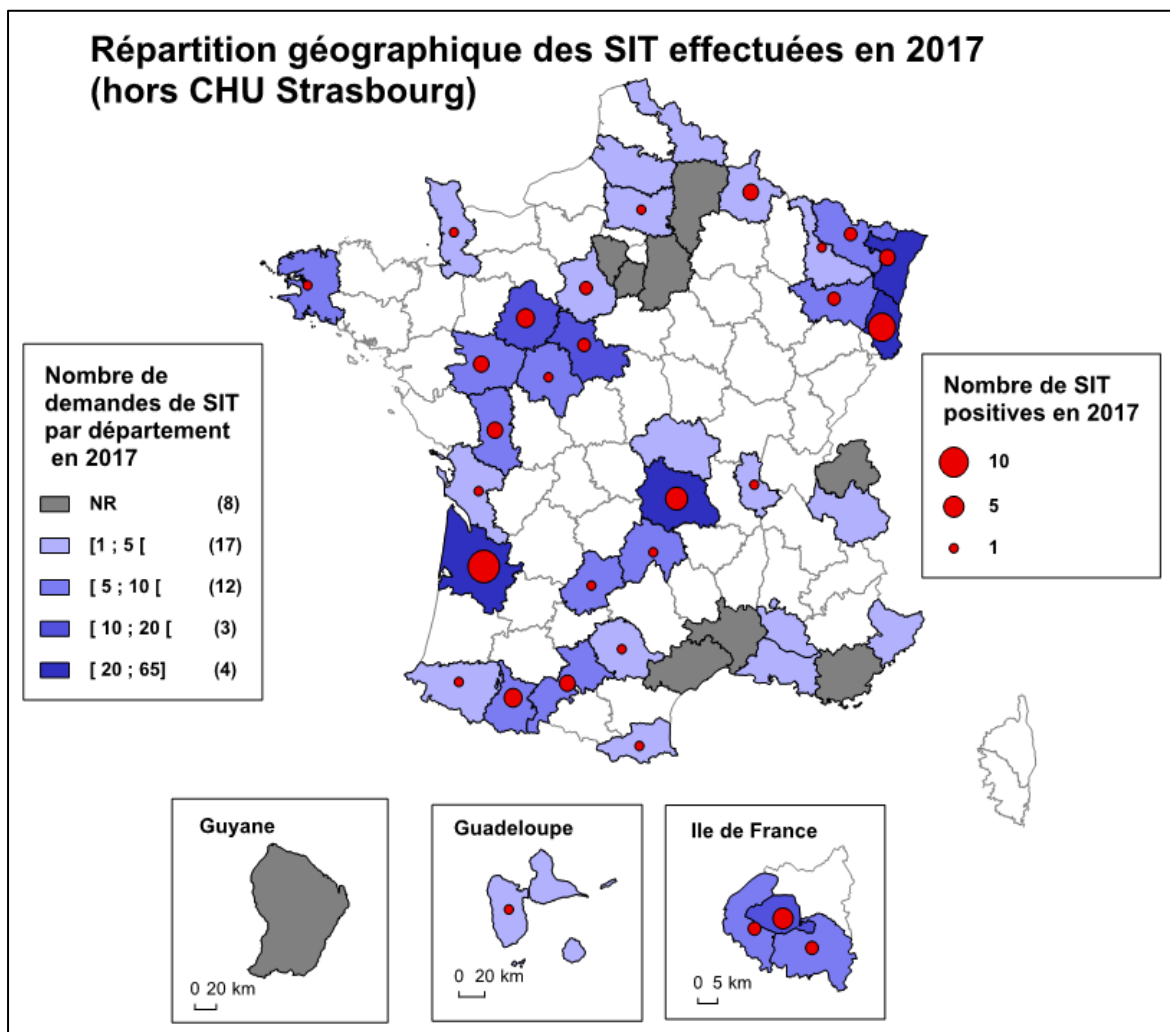
Répartition géographique des demandes et des résultats positifs de recherche de synthèse intrathécale:

Les 1 478 demandes adressées en 2017 provenaient de 46 départements répartis sur le territoire national dont deux départements d'outre-mer (Guadeloupe et Guyane). Les 411 demandes dont l'analyse a pu être réalisée, provenaient de 37 départements dont 1 d'outre-mer (Guadeloupe).

En 2017, les analyses, hors CHU de Strasbourg, représentaient 308 couples sérum/LCR dont 80 avaient une SIT positive (26 %), permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Dans 10 % des cas, le résultat était douteux, ne permettant ni d'affirmer ni d'infirmer le diagnostic.

La carte en page suivante représente le nombre de demandes adressées au CNR *Borrelia* par département demandeur et dont l'analyse a pu être réalisée ainsi que le nombre de résultats positifs obtenus pour la recherche de SIT.

On note que les neuroborrélioses sont observées sur l'ensemble des départements qui nous ont adressé des échantillons. Aucun cas n'a été confirmé sur le pourtour méditerranéen en 2017 (2 cas en 2016), ce qui est concordant avec le fait que la borréliose de Lyme est rare dans cette région.



Les départements en blanc ne nous ont adressé aucune demande.

Les départements en gris nous ont adressé des demandes pour lesquelles la recherche de SIT n'était pas indiquée en raison de l'absence d'anticorps spécifiques dans le sérum et/ou le LCR.

En Alsace, les nombreuses demandes du CHU de Strasbourg ont été volontairement exclues, elles seront analysées par la suite dans un paragraphe dédié.

Demandes de SIT provenant du CHU de Strasbourg en 2017 :

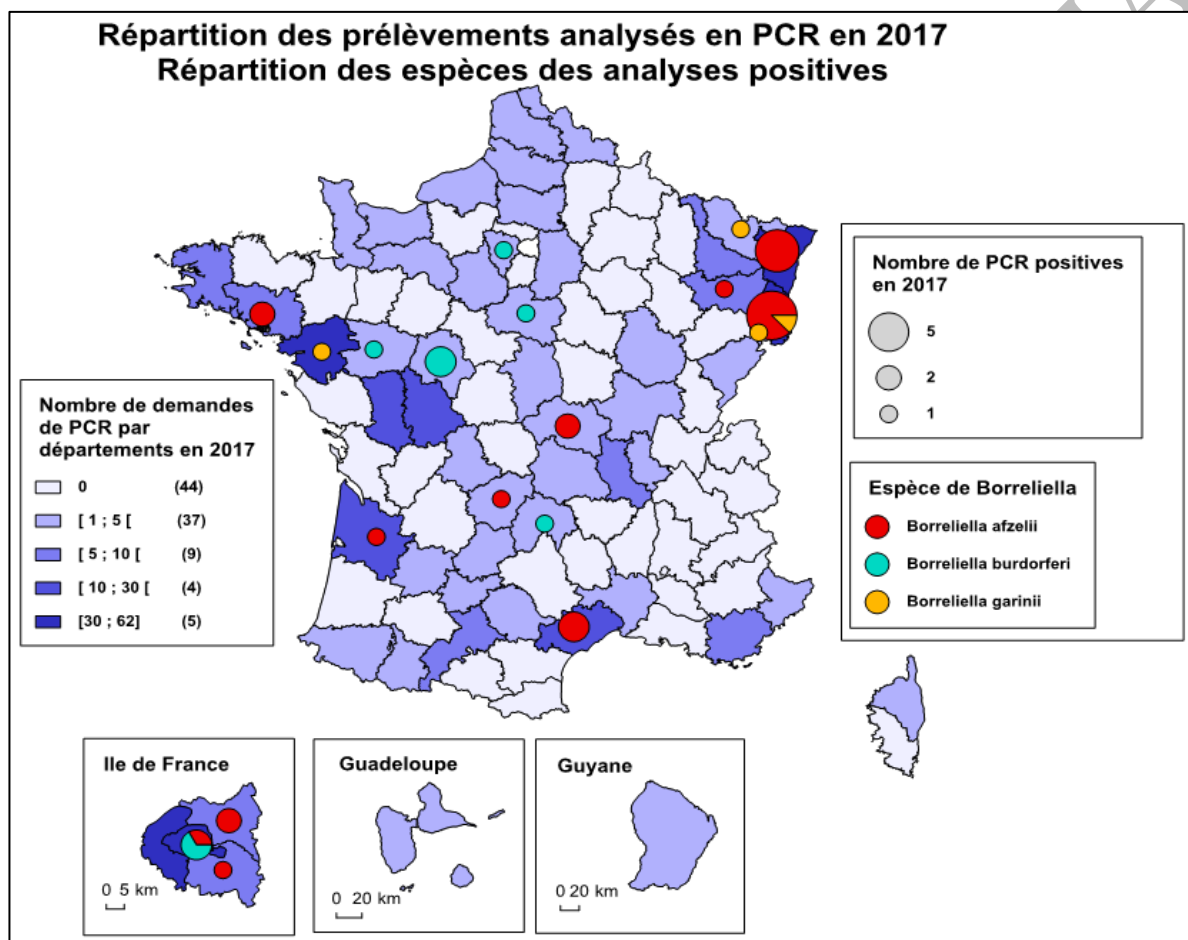
Les demandes du CHU de Strasbourg, situé en Alsace, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, représentent 821 analyses, dont 103 ont été réalisées (12,5 %) soit environ 0,25 fois l'ensemble des demandes nationales.

Les 103 demandes du CHU de Strasbourg dont l'analyse a pu être réalisée sont réparties de la manière suivante, 12 couples LCR/sérum (11,7 %) ont une SIT positive, permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Dans 18,4 % des cas, le résultat était douteux et ne permettait ni d'affirmer ni d'infirmer le diagnostic.

3.2.1.2 Activité d'expertise en Biologie Moléculaire du CNR *Borrelia* en 2017

En 2017, 490 prélèvements provenant de 55 départements répartis sur le territoire national dont 2 départements d'outre-mer (Guadeloupe et Guyane). Ce nombre de demandes a augmenté de 24 % par rapport à l'année 2016.

Parmi ces demandes, 9,2 % n'ont pas pu être réalisées car la nature de l'échantillon biologique n'était pas indiquée pour l'analyse (sérum, sang sur tube EDTA, liquide pleural), dans ces cas, un contact téléphonique avec le prescripteur a permis d'obtenir un prélèvement plus adéquat ou d'orienter le prélèvement vers une autre analyse (sérologie).



Parmi les 433 prélèvements analysés, on comptait 190 LCR, 119 prélèvements articulaires (liquides et biopsies synoviales) et 124 prélèvements de diverses origines (biopsies cutanées ou de tissu profond ; extrait ADN ; humeurs aqueuse ou vitré ; biopsie neuro-musculaire ; fragment de tissu nerveux ; sang sur tube EDTA)

- Ainsi, près de 43,9 % des prélèvements adressés étaient des LCR ; aucun n'était positif.
- 18 sangs sur EDTA ont été analysés. Ces recherches de *Borrelia* ont été effectuées chez des patients présentant des troubles variés mal systématisés depuis de nombreux mois ou années. Tous étaient négatifs en PCR.
- Parmi les 119 prélèvements articulaires reçus, 13 étaient positifs (10,9 %) : 6 à *B. burgdorferi*, 5 à *B. afzelii*, 2 à *B. garinii*.

L'origine géographique des 13 cas d'arthrite de Lyme était variée : Aurillac, Belfort, Le Chesnay, Montpellier, Nantes, Orléans, Paris, S' Mande, Strasbourg, Tours et Vichy.

En 2017, nous avons aussi colligé les données de toutes les arthrites diagnostiquées par PCR *Borrelia* réalisée au CNR *Borrelia* depuis 10 ans et pour lesquelles une sérologie avait été réalisée indépendamment du résultat de la PCR. Au total, 37 cas ont été étudiés. Il s'agissait de mono-arthrites dans 92 % des cas et d'oligo-arthrite dans 8 % des cas ; aucun cas de polyarthrite n'a été observé. L'articulation touchée était le genou dans 97 % des cas (1 cas touchant la cheville, 1 cas touchant le coude).

Par ailleurs, pour ces 37 arthrites de Lyme, la PCR avait été demandée indépendamment du résultat la sérologie (celle-ci ayant été prélevée en même temps ou lors du rendu du résultat de la PCR). L'ensemble des 37 patients atteints d'arthrite de Lyme PCR (+) étaient positifs en ELISA IgG anti *Borrelia*. La possibilité d'arthrite de Lyme négative en sérologie ELISA apparaît donc très faible.

B. burgdorferi était l'espèce détectée dans 54 % des cas (différence significative), *B. afzelii* dans 29 % des cas, *B. garinii* dans 17 % des cas. Cette répartition étant différente de celle observée dans les tiques, il existe donc un tropisme de *B. burgdorferi* pour les articulations.

- Enfin, parmi les 124 prélèvements de nature diverse : 1 biopsie neuro-musculaire (provenant du CHU d'Angers) était positive à *B. burgdorferi* et 29 biopsies cutanées étaient positives (24,2 %), 25 à *B. afzelii*, 2 à *B. burgdorferi*, 2 à *B. garinii*. Parmi ces biopsies cutanées positives, 25 provenaient du « protocole biopsies cutanées » - Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France, les 5 autres ont été adressées par différents hôpitaux : Paris, Angers, Epinal, Libourne et Vichy).

Espèces de Borrelia détectées en PCR en 2017 selon la nature des prélèvements

Espèces de <i>Borrelia</i>	Prélèvements articulaires	LCR	Biopsies cutanées	Autres éch.	Total (%)
<i>B. afzelii</i>	5	0	25	0	30 (69%)
<i>B. burgdorferi</i>	6	0	2	1 (biopsie neuro-musculaire)	9 (21%)
<i>B. garinii</i>	2	0	2	0	4 (9%)
Autres espèces	0	0	0	0	0

3.2.1.3 Détection de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes

En 2017, nous avons reçu 10 demandes d'analyses pour suspicion de fièvres récurrentes. Les prélèvements provenaient de : CH Beauvais (n=2), CHU Dijon (n = 2), CHU de Garches (n = 1), CHU de Paris-Cochin (n = 1), CHU de Rouen (n = 1), CHU de Strasbourg (n=2), CHU de Toulouse (n = 1).

Les patients étaient 4 femmes et 6 hommes, âgés de 5 ans à 69 ans.

La majorité de ces patients présentaient une fièvre au long cours ou récurrente, accompagnée ou non d'autres signes, parfois peu spécifiques suivant les cas : asthénie, syndrome grippal, myalgie, arthralgie, prurit, cytolysé hépatique.

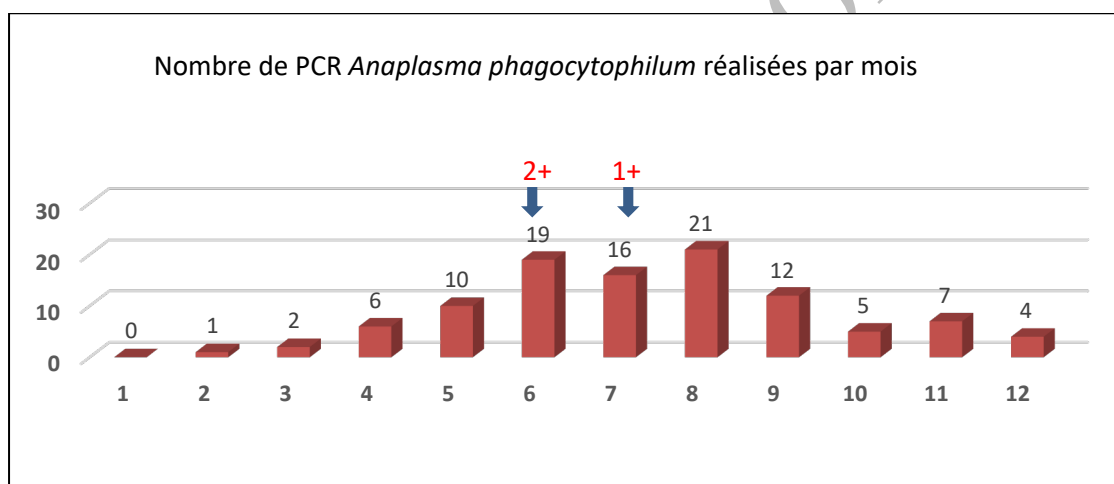
Parmi ces demandes, 6 (60 %) faisaient suite à un retour de voyage (Congo, Guyane, Sénégal (n = 3) et Turquie (n =3)). Les 4 autres demandes correspondaient à des recherches pour des patients présentant une fièvre sans cause apparente et sans facteur de risque : pas de voyage à l'étranger, sans récurrence de l'épisode fébrile.

Sur ces 10 échantillons analysés, 3 échantillons étaient positifs et le résultat du séquençage précisent l'espèce : *Borrelia crocidurae* dans les 3 cas.

Ces 3 patients (2 hommes et 1 femme entre 16 ans et 65 ans) revenaient tous d'un séjour au Sénégal et présentaient des épisodes fébriles récurrents. Dans tous les cas, leur évolution a été favorable sous antibiothérapie par bêta-lactamines.

3.2.1.4 Surveillance des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine

En 2017, nous avons reçus 103 demandes de PCR *Anaplasma phagocytophilum*. Trois ont été positives, deux en juin et une en juillet.



Les 3 patients présentant une anaplasmose granulocytaire aiguë, deux hommes et une femme, étaient âgés de 55, 61 et 64 ans. Ils avaient consulté l'un au CHU de Strasbourg, les deux autres aux hôpitaux civils de Colmar (Haut-Rhin).

Ces patients avaient tous, dans leurs antécédents récents, été piqués par des tiques (un des patients avait déjà présenté une borréliose de Lyme et un, une encéphalite virale à TBE) et ont été hospitalisés pendant 4 à 6 jours. Ces patients présentaient un syndrome pseudo-grippal avec fièvre ± frissons, accompagné dans un cas, d'un syndrome méningé (dont la ponction lombaire s'est révélée normale ainsi qu'une absence d'infection à TBE).

Les bilans biologiques étaient également en faveur d'une anaplasmose avec classiquement l'association d'un syndrome inflammatoire (CRP élevée), d'une neutropénie, d'une thrombopénie et d'une perturbation des enzymes hépatiques.

Les trois patients ont bénéficié d'une antibiothérapie adaptée par doxycycline 200 mg/j pendant 10 jours. Leur évolution a été rapidement favorable.

3.2.1.5 Analyse des fiches de renseignements accompagnant certains échantillons

Le recueil de fiches de renseignement entre dans le cadre de nos activités de surveillance des cas humains de borréliose de Lyme.

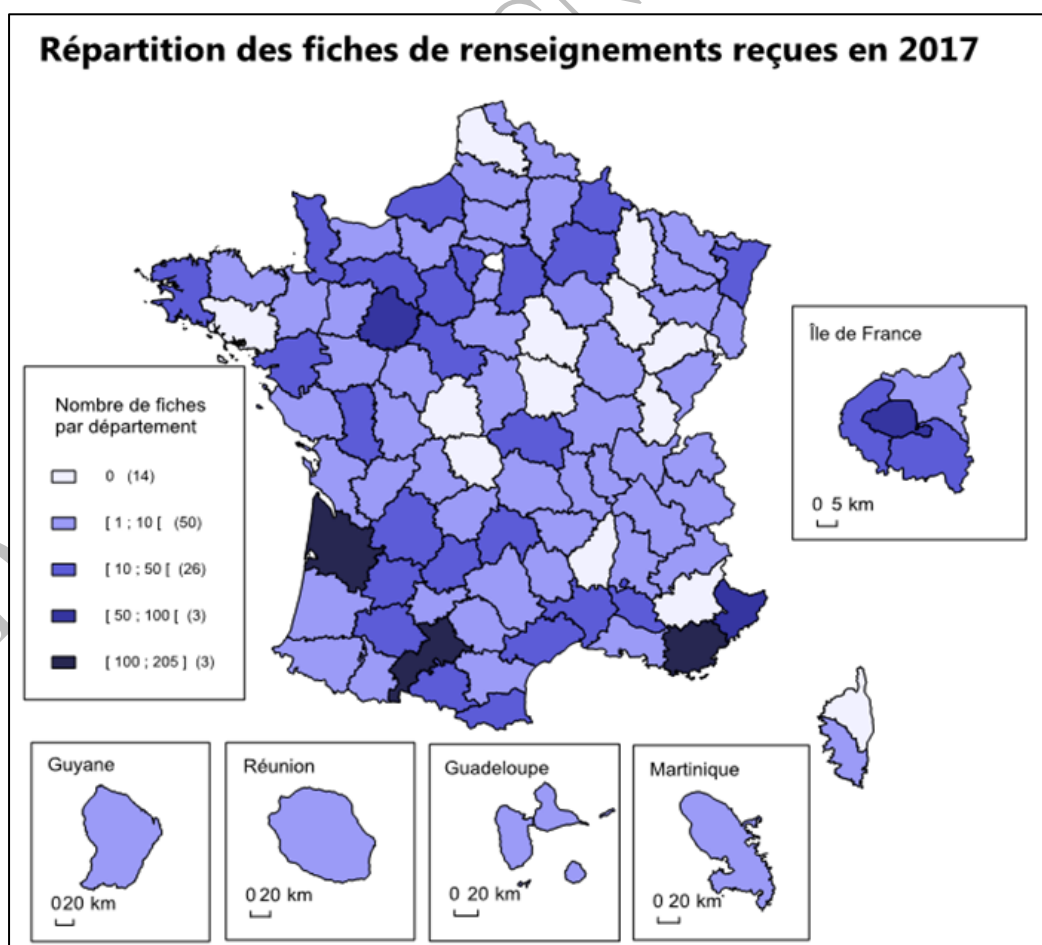
L'analyse de ces fiches permet d'extraire des informations pour l'analyse épidémiologique comme l'âge des patients, le sexe, les facteurs de risque, les signes cliniques, etc. Les données recueillies sont saisies dans un fichier Excel® contenant la retranscription manuelle des fiches de renseignements réceptionnées dans l'année du CNR des *Borrelia* ainsi que les résultats biologiques relatifs à chaque analyse. Chaque fiche est ensuite classée en différentes catégories en fonction des critères diagnostiques de l'ESGBOR (European Study Group on Lyme Borreliosis).

Durant l'année 2017, 1 407 fiches de renseignements ont été reçues ; soit une augmentation de 14 % du nombre de fiches reçues par rapport à l'année précédente. Cette augmentation régulière est constatée depuis 2013.

Parmi ces fiches, 16 % ont été inexploitable car elles étaient insuffisamment remplies, voire complètement vides d'informations épidémiologiques.

En 2016, afin de pallier cette insuffisance, les prescripteurs avaient été prévenus que les dossiers inexploitable sur le plan épidémiologique et/ou clinique ne peuvent pas être utilisés pour les activités de surveillance du CNR et ne bénéficient pas de la prise en charge financière des analyses par le CNR *Borrelia*. Suite à cette démarche, nous avons noté une diminution de 15 % du nombre de fiches inexploitable par rapport à 2016.

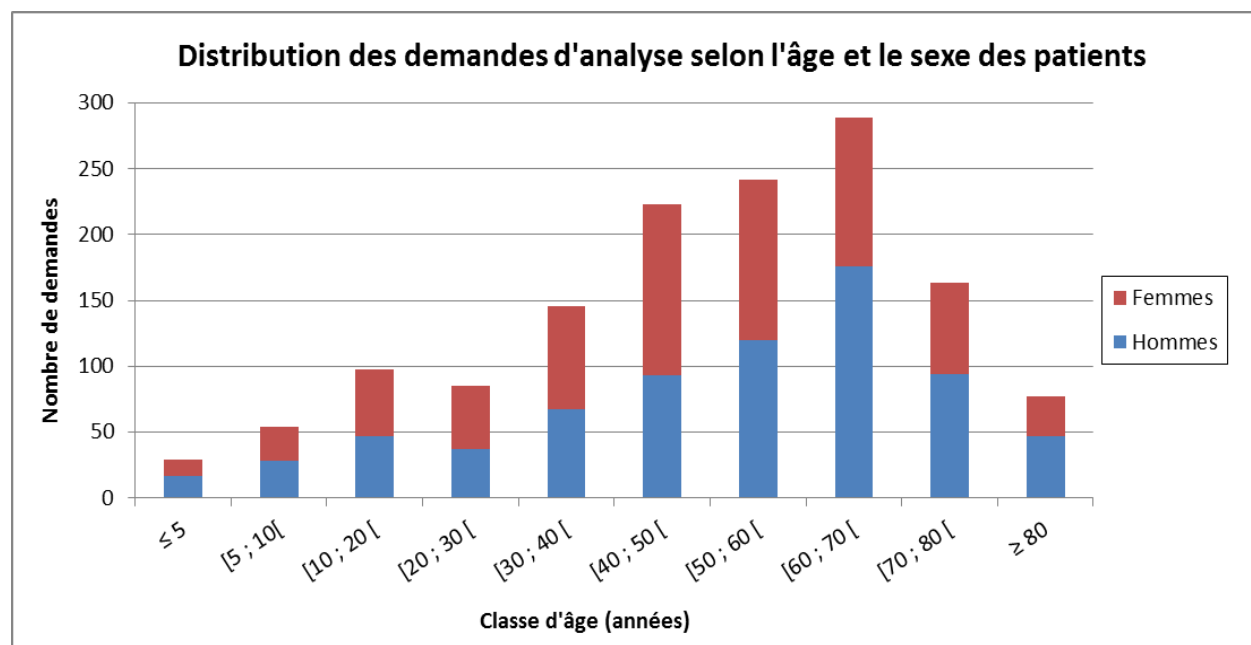
Les fiches reçues couvrent quasiment tout le territoire Français, elles proviennent de 82 départements :



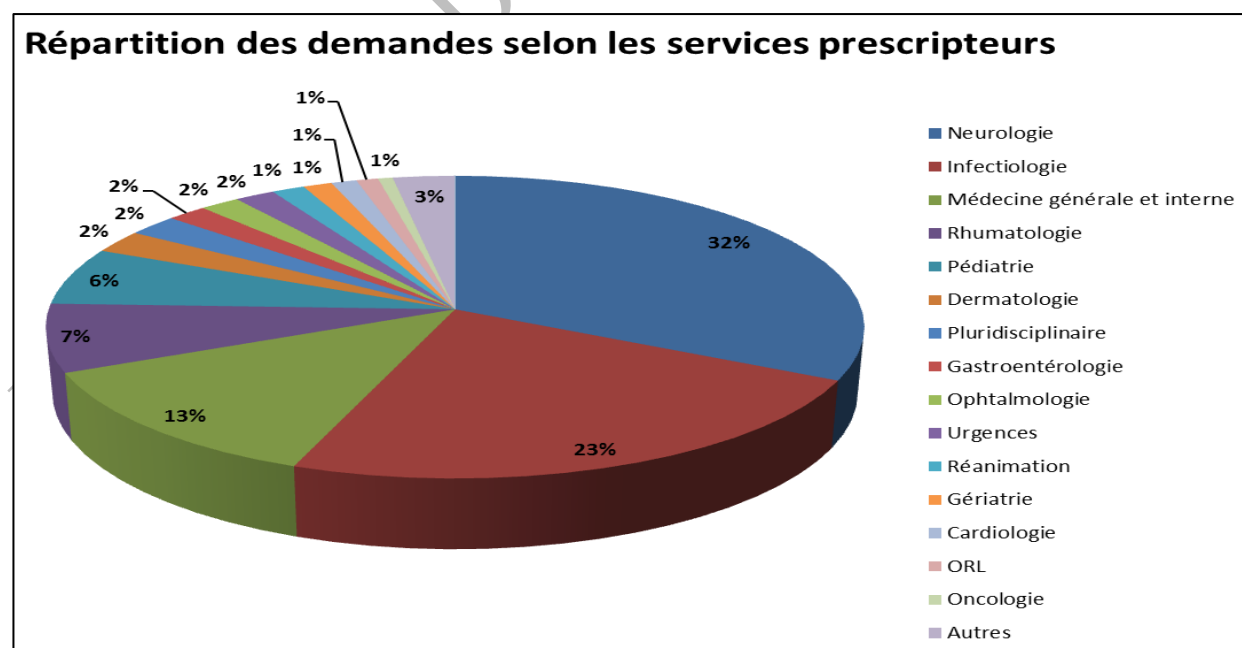
La majorité des fiches réceptionnées (95,6 %) proviennent de CHU ou de CH.

En 2017, l'âge des patients analysés varie de 8 mois à 95 ans. Le sexe ratio est de 1,07 homme/femme.

On note un pic des demandes d'analyses pour les patients de 60 à 70 ans, cette classe d'âge est habituellement plus exposée au risque de contamination (augmentation du temps de loisirs en pleine nature lié à la retraite par exemple) :



Les fiches de renseignements ont également été analysées en fonction du service hospitalier prescripteur :

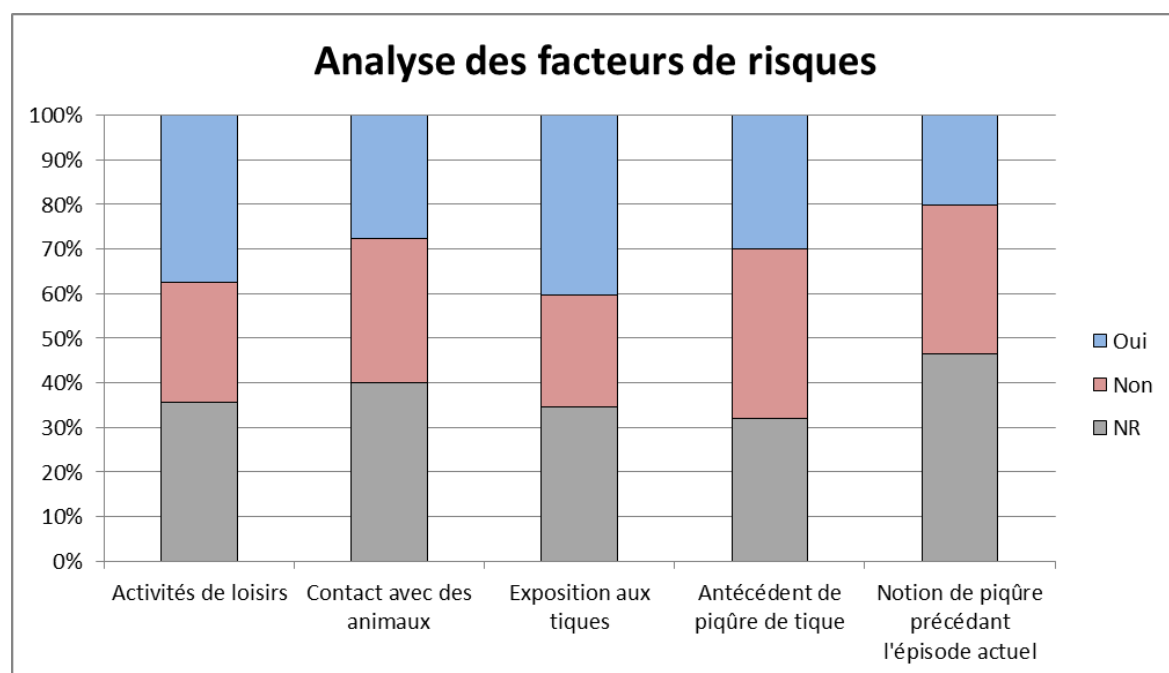


Ne sont représentées, dans le graphique ci-dessus, que les fiches dont le service hospitalier prescripteur est renseigné soit 44 % du total des fiches de l'année 2017 (hors laboratoires, médecins généralistes et fiches provenant de CH non complétées pour cet item).

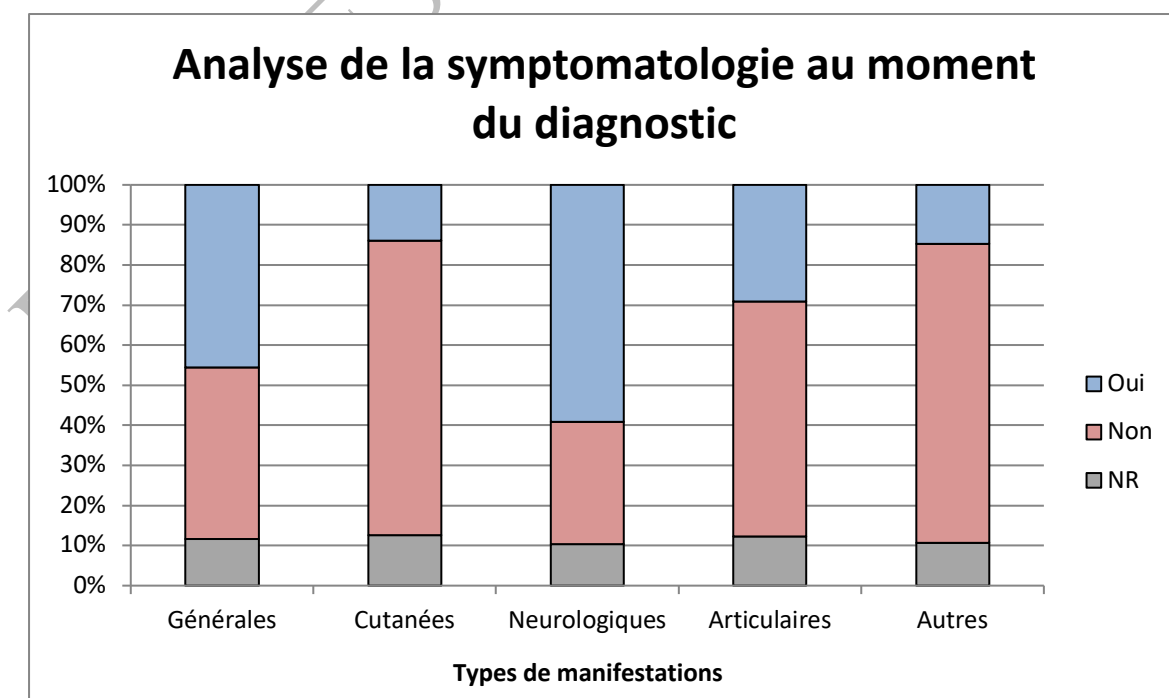
Depuis 2012, la neurologie est la spécialité la plus demandeuse de sérologie *Borrelia*. Ceci est dû au fait que la neuroborréliose peut être un diagnostic différentiel de plusieurs pathologies neurologiques et que les neuroborrélioses sont la forme disséminée de Lyme la plus fréquente en Europe.

La catégorie « autres » (3 %) regroupe des spécialités peu représentées comme la pneumologie, la diabétologie, l'allergologie, la médecine légale, etc.

La fiche de renseignements permet le recueil des facteurs de risques suivants : activité de loisirs, contact avec des animaux, exposition aux tiques, antécédent de piqûre de tique :



Les fiches de renseignements permettent également le recueil des grandes catégories de symptômes présentés par le patient au moment du diagnostic :



La catégorie « autres » regroupe des manifestations diverses, comme par exemple des symptômes oculaires (7,6 %), cardiaques (3,8 %), auriculaires, dépression,

Chaque fiche est analysée et triée en fonction des critères diagnostiques de l'ESGBOR (cf. annexe).

En 2017, 9,2 % des fiches n'ont pas pu être analysées en raison du manque de renseignements concernant la symptomatologie au moment du prélèvement. De plus, 37,4 % des cas adressés au CNR sont définis comme « hors ESGBOR » car aucun critère diagnostique de borréliose de Lyme selon l'ESGBOR n'était rapporté. Chez la plupart de ces cas « hors ESGBOR », une borréliose a été suspectée face à des symptômes peu ou non spécifiques (algies, asthénie, fièvre, vertiges, troubles mnésiques, lésions cutanées atypiques, etc.) voire inappropriés (anémie, cancer, douleurs dentaires, vomissements, etc.).

Au total, parmi les données analysées en 2017, 129 patients soit 8,8 % présentaient un diagnostic certain d'infection à *Borrelia*, toutes manifestations cliniques confondues, selon la définition des cas de l'ESGBOR.

Pour les cas non certains : probables, possibles, peu probables, improbables ou indéfinissables, les critères de classification de ces cas sont détaillés en annexe.

	NB	ART	EM	OC.	ACA	CARD	LB	Total (%)
Certain	38	16	60	5	7	2	1	129 (16%)
Probable	3							3 (0,3%)
Possible	11	14	6	3	2			36 (4,5%)
Peu probable	42	1						43 (5,4%)
Improbable	321	37	5	42	5	12	3	425 (53%)
Indéfinissable	137	13		7	2	2	1	162
Total	552 (39,2 %)	81 (5,8 %)	71 (5 %)	57 (4 %)	16 (1,1 %)	16 (1,1 %)	5 (0,4 %)	798

Ainsi, nous pouvons conclure que les patients atteints d'une borréliose de Lyme certaine sont issus de profils hétérogènes et ne représentent qu'un faible pourcentage des demandes accompagnées de fiches de renseignement.

Le diagnostic de maladie de Lyme reste délicat et l'interprétation des différentes analyses n'est pas toujours aisée pour les prescripteurs.

3.2.2 Surveillance vectorielle

3.2.2.1 Objectifs de la campagne de collecte de 2017

Dans le cadre des missions du CNR *Borrelia*, la surveillance acarologique investigue :

- la répartition du vecteur *Ixodes ricinus* dans deux régions du Nord de la France, une à l'Est, une à l'Ouest : en Alsace et en Bretagne,
- le risque acarologique de borréliose de Lyme (BL) également en Alsace et en Bretagne,
- le taux de nymphes infectées par *Borrelia* mais également par d'autres pathogènes comme *Anaplasma phagocytophilum* ou les *Borrelia* agents de fièvre récurrente (*B. miyamotoi*) dans ces deux régions.

3.2.2.2 Choix des sites de collecte et méthodes

L'objectif est de pouvoir comparer le risque acarologique dans deux grandes régions de France, au Nord-Ouest (climat océanique) et au Nord-Est (climat continental).

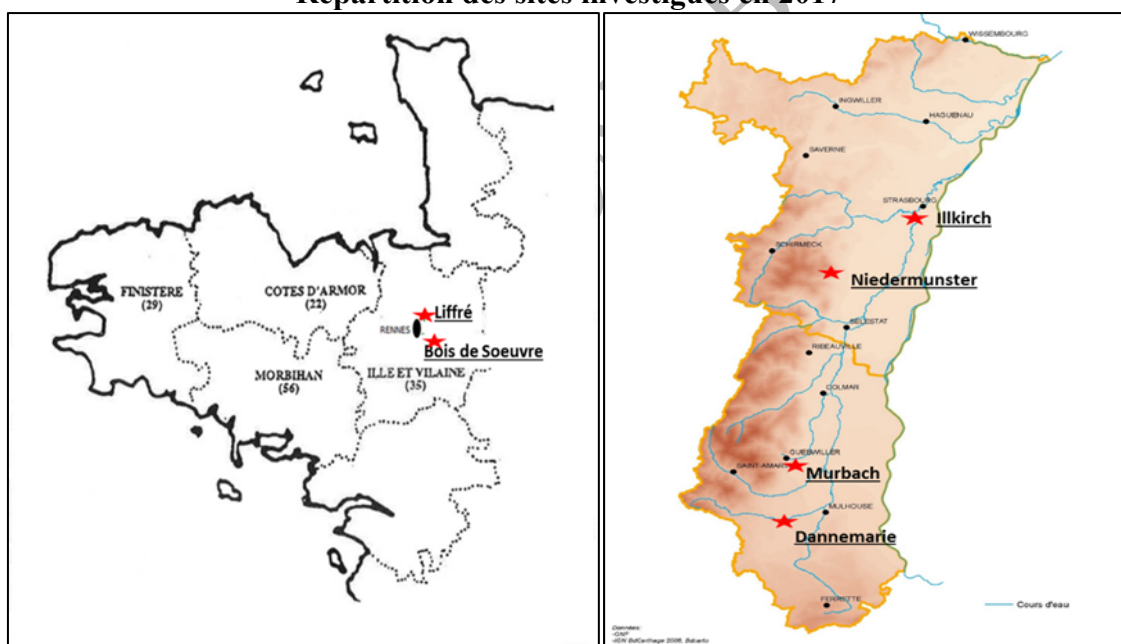
En 2017, afin d'étudier la répartition du vecteur *I. ricinus*, nous avons effectué 35 collectes sur quatre sites répartis dans le Bas-Rhin et le Haut-Rhin (voir carte ci-dessous) et 28 collectes sur deux sites en Bretagne (voir carte ci-dessous).

Ces sites ont été choisis en fonction de leur localisation géographique, de l'activité humaine qui s'y déroule et des données bibliographiques, en particulier l'étude du CNR *Borrelia* réalisée en Alsace en 2003 et 2004 (Ferquel et al., 2006). L'enquête épidémiologique humaine réalisée en Alsace au début des années 2000, avait montré que l'Alsace avait la plus forte incidence de borréliose de Lyme en France.

Les grandes vallées vosgiennes de Munster et de Guebwiller avaient alors été identifiées comme zones à risque pour la borréliose de Lyme. Le canton de Dannemarie avait été sélectionné pour sa faible incidence.

Nous surveillons également le site d'Illkirch qui constitue une zone périurbaine, à risque acarologique également, du fait de sa grande fréquentation.

Répartition des sites investigués en 2017



Les sites collectés mensuellement sont :

- Niedermunster et d'Illkirch pour le Bas-Rhin
- Murbach et Dannemarie pour le Haut-Rhin
- Liffre (Forêt de Rennes) et Bois de Soeuvre pour la Bretagne.

Dans tous les sites, la méthode de collecte utilisée correspond à la technique du drapeau. Cette technique privilégie la capture des tiques à l'affût sur la végétation. Une étoffe de tissu d'1 m² est trainée au sol sur une distance de 10m, ce qui correspond à « un tir ». Sur chaque transect, trente tirs sont effectués. Après chaque tir, les tiques présentes sur le tissu sont prélevées vivantes, mises en tube et ramenées au laboratoire où elles sont congelées à -80°C

dans les 24h, jusqu'à analyse. L'étoffe de tissu faisant 1 m², cela permet de définir la densité en tiques par 100 m².

Nombre de tiques collectées par site de collecte

Mois de collecte	Dannemarie (68)		Murbach (68)		Illkirch (67)		Niedermunster (67)	
	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes
Février	NC		NC		NC		0	0
Mars	17	11	69	2	47	2	29	26
Avril	23	12	78	10	41	6	54	42
Mai	176	16	280	12	286	6	76	53
Juin	103	9	204	7	333	10	42	13
Juillet	73	4	67	0	38	2	23	4
Août	22	1	14	2	27	1	26	3
Septembre	32	0	42	1	23	1	23	2
Octobre	13	0	36	3	18	1	5	1
Novembre	NC		NC		1	0	1	0
Total	459	53	790	37	814	29	279	144

NC : Non collectable (neige, pluie, gel, etc.)

Mois de collecte	Liffré – Forêt de Rennes (35)		Bois de Soeuvre (35)	
	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes
Janvier	1	0	3	0
Février	28	2	79	4
Mars	93	4	134	5
Avril	133	9	186	20
Mai	265	18	337	55
Juin	103	6	163	15
Juillet	123	4	105	36
Août	94	12	24	2
Septembre	53	7	24	18
Octobre	6	7	2	4
Novembre	1	2	15	5
Décembre	5	0	11	1
Total	905	71	1083	165

Pour l'Alsace, les collectes ne peuvent en général pas être réalisées en décembre, janvier ni février compte tenu du gel, de la neige ou des précipitations. En hiver, on observe une diapause hivernale avec absence de tiques certains mois comme novembre ou décembre.

La comparaison des données de collectes entre les régions Alsace et Bretagne durant l'année 2017 montre que la Bretagne avec son climat océanique, présente une activité continue des tiques durant l'année avec une activité intense dès le mois de mars par différence avec l'Alsace (climat continental), où elle est retardée d'un à deux mois et s'arrête un mois plus tôt. Ces tendances sur une année nécessitent d'être confirmées par une étude sur plusieurs années.

Au total sur l'ensemble des sites, nous avons collectées 4 330 nymphes et 499 adultes.

3.2.2.3 Analyse des données de densité de nymphes en 2017

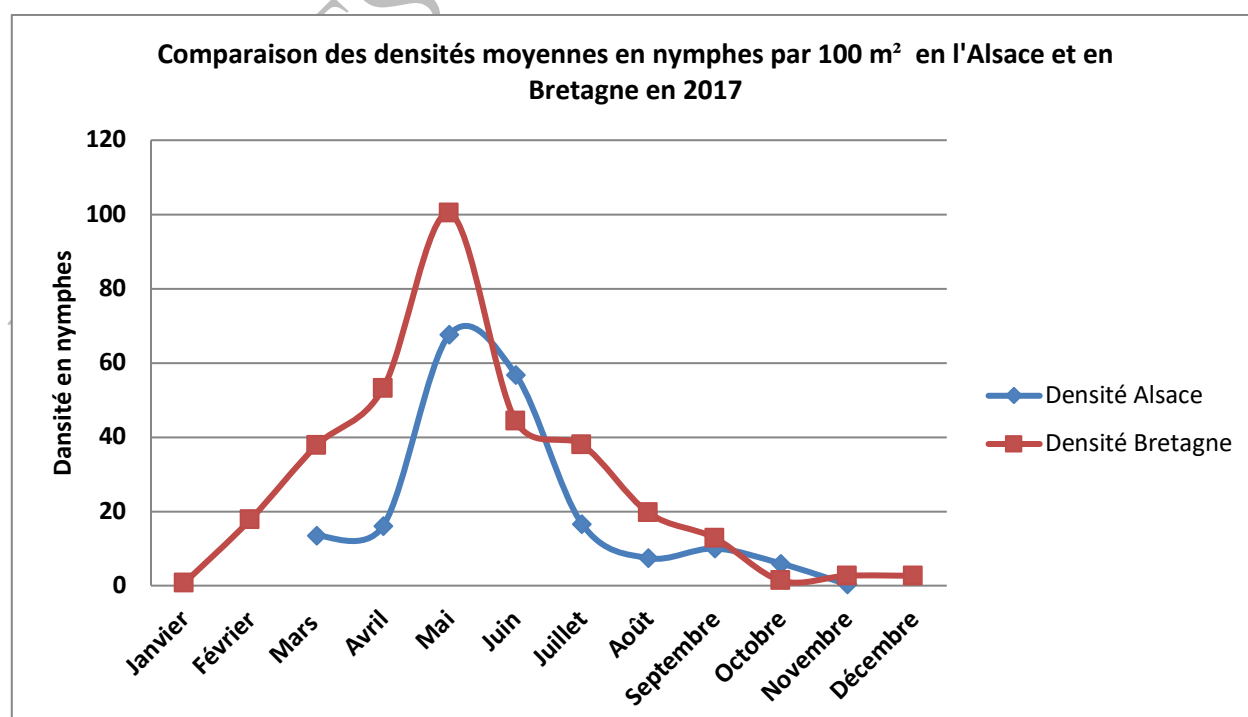
La densité en nymphes notée D a été calculée sur les différents sites de la façon suivante :

$$D = \sum n_i / t$$

n correspond au nombre de nymphes totales prélevées sur le lieu de collecte i, et t : le nombre de tirs effectués.
La densité D est rapportée à une surface de 100 m².

En Alsace, les densités en nymphes les plus élevées ont été observées à Murbach et Illkirch, et les densités les plus élevées en adultes à Niedermunster. Les sites de Murbach et de Niedermunster correspondent à des sites de moyenne montagne (altitude d'environ 500 m) par opposition à Illkirch (périurbain) et Dannemarie (site de plaine agricole).

Densités des nymphes par 100 m² en Alsace et en Bretagne :



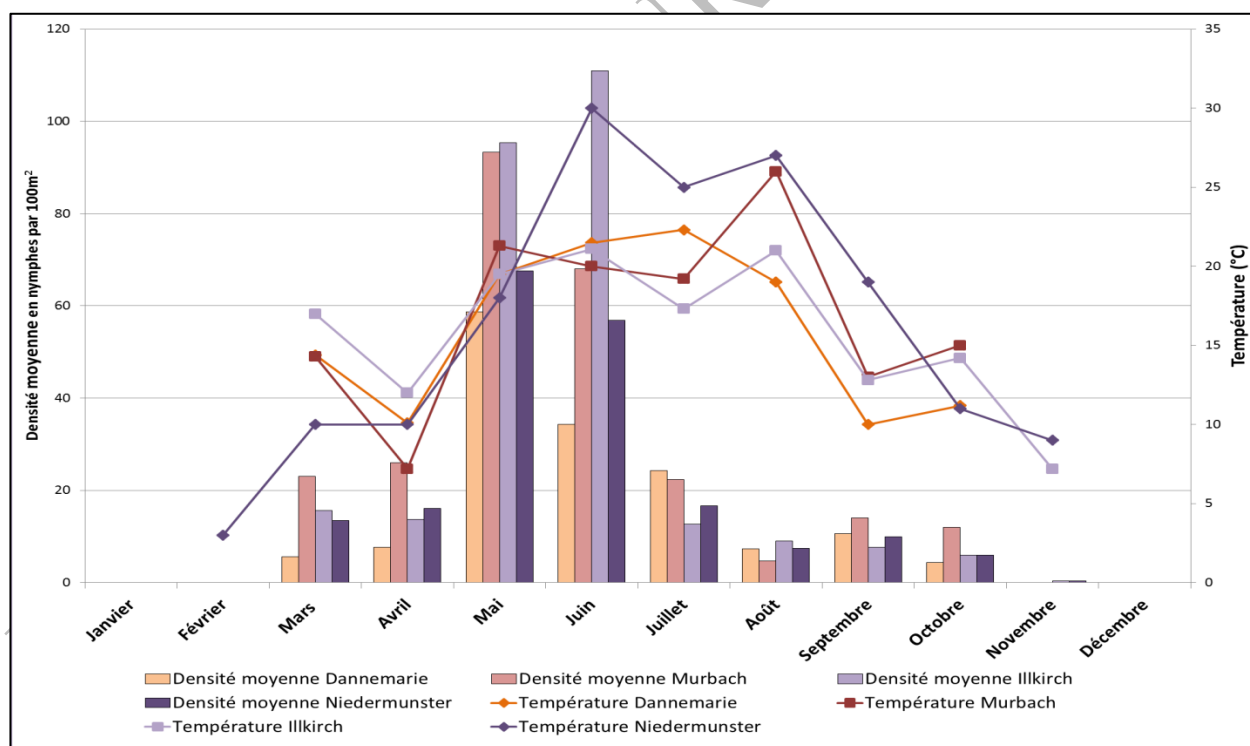
Sites	Nymphes	Adultes	Densité en nymphes /100 m ²	Densité en adultes / 100 m ²
Alsace (Mars-Novembre)				
Total Haut-Rhin	1249	110	26	1,85
Total Bas-Rhin	1093	173	20,1	3,2
TOTAL Alsace	2342	263	22,8	2,6
Bretagne (Janvier-Décembre)				
TOTAL Bretagne	1988	236	27,6	3,3

De façon intéressante, nous constatons que les densités moyennes en nymphes et en adultes collectées en Bretagne sont aussi importantes qu'en Alsace.

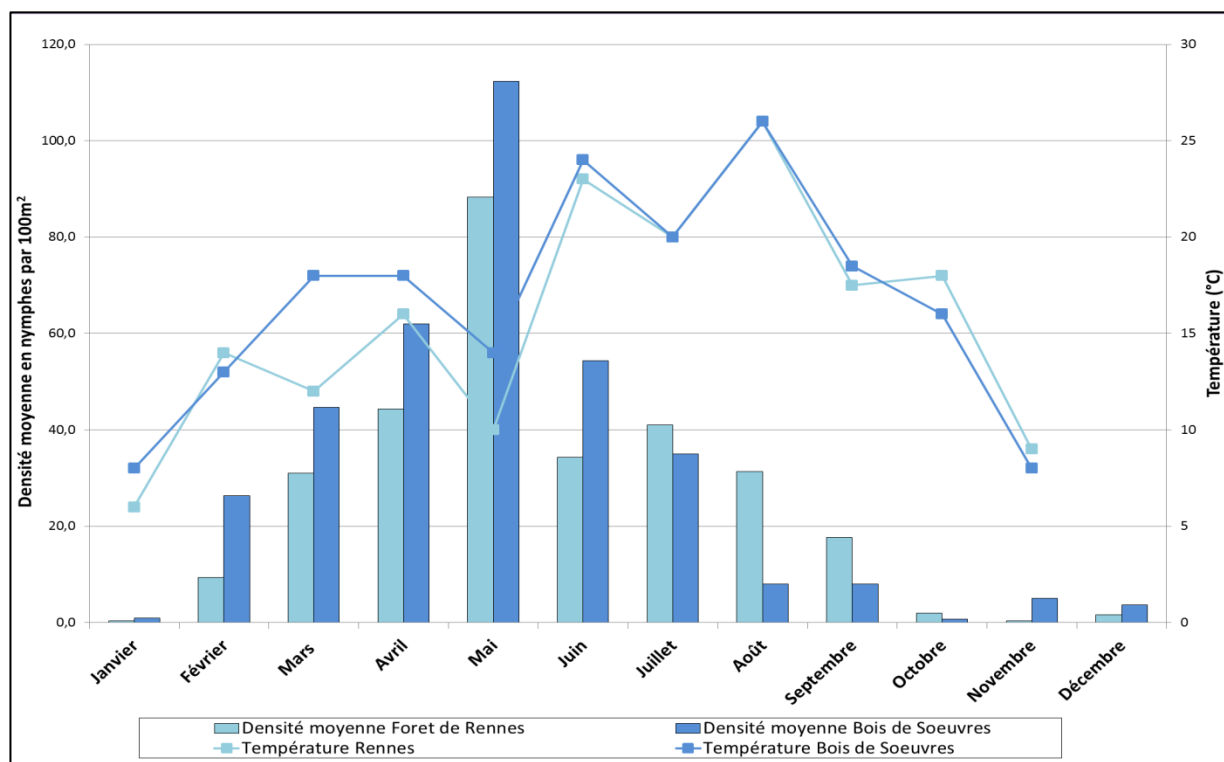
En 2017, nous avons également été attentifs à certains facteurs comme la température et l'hygrométrie. Elles constituent des facteurs abiotiques importants qui peuvent avoir un impact notable sur la densité en tiques du genre *Ixodes*, très sensibles à la dessiccation.

Evolution au cours de l'année 2017 de la densité de nymphes d'*Ixodes* en Alsace et en Bretagne et étude de la corrélation avec la température :

Alsace :



Bretagne :



En comparant les sites de l'Est (Alsace) et de l'Ouest de la France (Bretagne), les densités en tiques à la stase nymphale montrent que le pic d'activité des nymphes est situé en Bretagne un mois avant celui observé en Alsace.

Par ailleurs, en Alsace, le pic sur le site de moyenne montagne (Murbach) survient un mois avant le pic en zone péri-urbaine (Illkirch).

D'autres facteurs que la température interviennent probablement pour expliquer cela.

3.2.2.4 Analyse des données d'infection des nymphes en 2017

Les nymphes analysées sont issues des collectes effectuées sur les mêmes quatre sites échantillonnés mensuellement en Alsace et les deux sites en Bretagne.

Un échantillonnage de 60 nymphes est réalisé parmi les tiques récoltées sur chaque site et chaque mois de collecte. Chaque tique est ensuite testée individuellement pour la détection des agents infectieux sélectionnés.

3.2.2.4.1 Infection des nymphes par *Borrelia*

En 2017, 2 128 nymphes ont été testées par PCR *Borrelia* ciblant le gène *flaB*.

Parmi ces nymphes analysées, 343 étaient positives à *Borrelia* soit un taux moyen d'infection d'environ 16,1 %. Ce taux est stable par rapport à l'année précédente (16,3 % en 2016).

Le détail des données par site est indiqué dans le tableau ci-dessous :

Sites	Nombre de nymphes testées	Nombre de nymphes positives	Taux d'infection (%)	Densité en nymphes par 100 m ²	Densité en nymphes infectées/100 m ²
Sites du Haut-Rhin (68)					
Dannemarie	288	32	11,1	19,1	2,1
Murbach	383	111	29	32,9	9,5
Sites du Bas-Rhin (67)					
Illkirch (peri-urbain)	314	48	15,3	30,1	4,6
Niedermunster	249	40	16,1	10,1	1,6
Total Alsace	1234	231	18,7	22,8	4,3
Sites de l'Ille-et-Vilaine (35)					
Total Bretagne	894	112	12,5	27,6	3,5

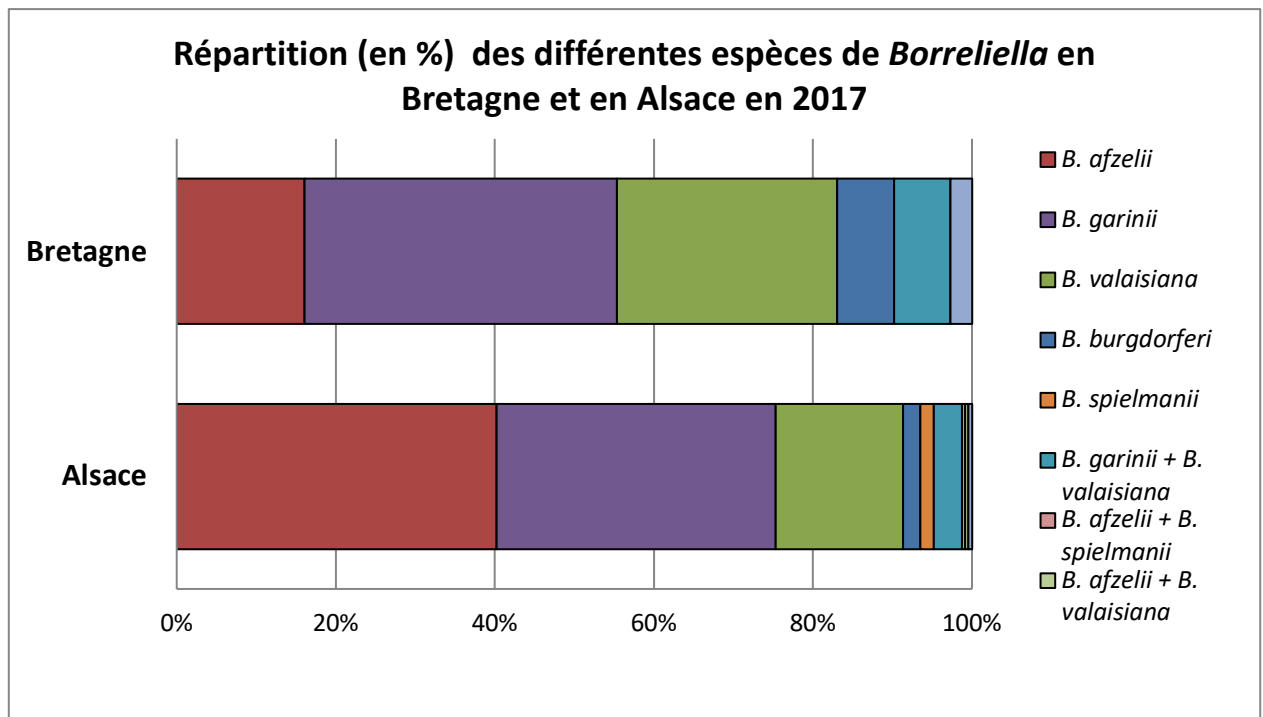
Le taux d'infection des nymphes, comme la densité moyenne en nymphes et en adulte collectées en Bretagne, est globalement aussi élevé qu'en Alsace (excepté du site de Murbach).

Répartition des différentes espèces de *Borrelia* par site de collecte en 2017 :

Espèces Sites de collectes	Nombre nymphes positives	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. spielmanii</i>	co-infection de <i>Borrelia</i>
Sous-total Alsace	231 (19 %)	93 (40 %)	81 (35 %)	37 (16 %)	5 (2 %)	4 (2 %)	11 (5 %)
Sous-total Bretagne	112 (13 %)	18 (16 %)	44 (39 %)	31 (28 %)	8 (7 %)	0	11 (10 %)
TOTAL	343 (16 %)	111 (32%)	125 (37%)	68 (20 %)	13 (4 %)	4 (1 %)	22 (6 %)

En Alsace, sur les différents sites de collecte, on trouve dans les nymphes *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* et *B. valaisiana*.

Les deux espèces les plus fréquentes sont *B. afzelii* (réservoir rongeurs) et *B. garinii* (réservoir oiseaux tout comme *B. valaisiana*), les autres espèces notamment *B. burgdorferi* sont en proportions moins importantes :



Il est intéressant de noter la présence d'ADN de *B. spielmanii* dans des tiques collectées sur le site de Dannemarie uniquement. Géographiquement, ce site est proche du site de la « Petite Camargue Alsacienne » (environ 40 km), où cette espèce a été décrite pour la 1^{ère} fois en Alsace en 2011 : « Reservoir competence of various rodents for the Lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii* ; Dania Richter et al., Appl Environ Microbiol. 2011 ».

3.2.2.4.2 Infection des nymphes par *Anaplasma phagocytophilum*

La famille des *Anaplasmataceae* regroupe les bactéries des genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* et *Wolbachia* qui sont des organismes intracellulaires stricts des cellules eucaryotes. *A. phagocytophilum* se multiplie sous forme de morula dans les globules blancs et est responsable de l'anaplasmose granulocytaire humaine. Cette maladie est cosmopolite puisqu'elle est décrite au niveau animal et humain aussi bien en Europe, qu'en Asie et aux Etats-Unis.

Les prévalences de cette bactérie varient d'un pays à l'autre, d'une espèce de tique à l'autre, avec des taux compris entre moins de 1 % et 20 % chez *I. ricinus* selon les pays d'Europe de l'Ouest.

Les nymphes ont été testées par PCR ciblant un gène d'*A. phagocytophilum* (*msh2/p44*).

Parmi les 2 128 nymphes analysées, 15 étaient positives en Alsace à *A. phagocytophilum* et aucune en Bretagne, soit un taux d'infection moyen de 1,2 % en Alsace.

Ce taux en 2017 est comparable en Alsace à ceux déjà obtenus les années précédentes qui variaient entre 1 et 2 % des tiques infectées.

Sites	Nombre de nymphes testées	Nombre de nymphes (+) à <i>A. phagocytophilum</i>	Taux d'infection (%)	Densité en nymphe par 100 m ²	Densité en nymphes infectées par 100 m ²
ALSACE					
Total Alsace	1234	15	1,2	22,8	0,3
BRETAGNE					
Total Bretagne	894	0	0	27,6	0

Il est intéressant de noter que ce taux était nul en Bretagne cette année alors qu'il était de 1,4 % en 2016. Cette variation est sans doute la résultante de la suppression du suivi d'un site de collecte par rapport à 2016 (Bois de Soeuvre). En 2016, c'est sur ce site que la majorité des tiques positives à *Anaplasma* avaient été collectées.

Les cas cliniques humains d'anaplasmose granulocytaire humaine sont principalement répertoriés en Alsace. Il conviendrait néanmoins de rechercher ce pathogène en Bretagne chez des patients présentant un syndrome pseudo-grippal estival et pour lesquels une sérologie de Lyme serait négative.

3.2.2.4.3 Infection des nymphes par des *Borrelia* agents de fièvres récurrentes

Borrelia miyamotoi, agent de fièvre récurrente (FR) a été décrit pour la première fois en 1995 au Japon chez *Ixodes persulcatus*. Le premier cas humain a été décrit en Russie en 2011. En 2013, le premier cas européen a été rapporté chez un patient profondément immunodéprimé en Hollande, un second cas humain a été décrit en Allemagne en 2016. A ce jour, aucun cas humain n'a été signalé en France.

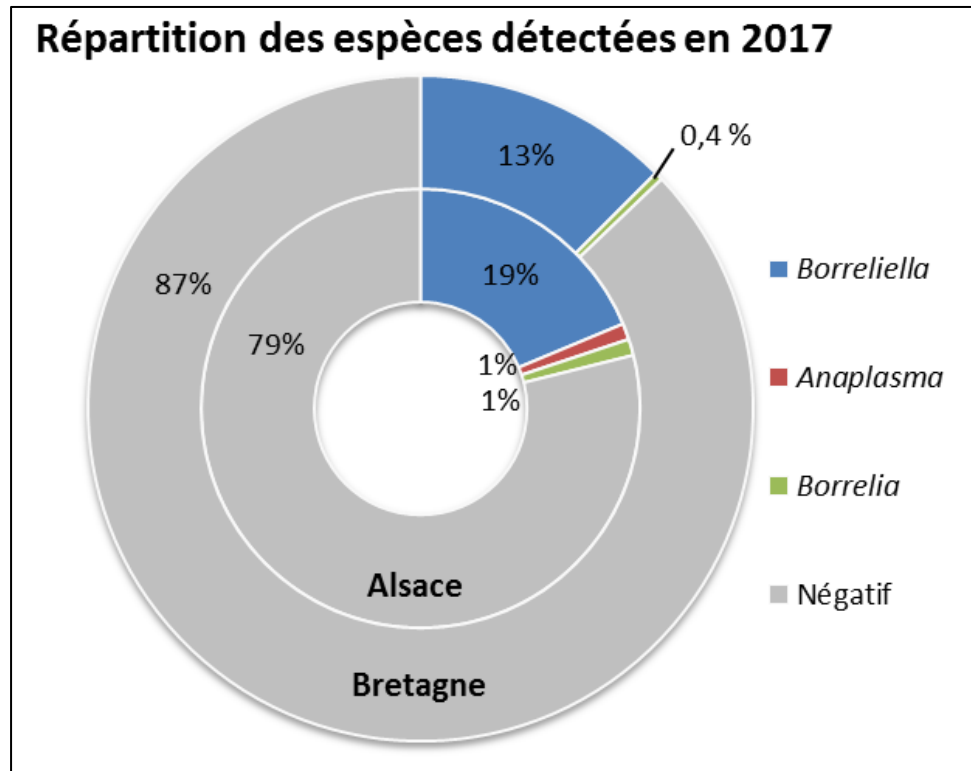
Nous avons cherché à savoir si cette espèce de *Borrelia*, ou d'autres espèces responsables de fièvre récurrente, était présente en Alsace et en Bretagne. La surveillance de ces pathogènes dans les tiques *Ixodes* est réalisée par le CNR depuis 2013 en Alsace et a été étendue en 2016 à la Bretagne.

La méthode utilisée est une PCR en temps réel ciblant une région conservée de l'ADNr 16S du genre *Borrelia* (Hovius, JR, 2013). Un séquençage du produit amplifié positif est ensuite réalisé pour identification précise de l'espèce. Cette PCR détecte ainsi de façon spécifique *Borrelia miyamotoi*.

Sites	Nombre de nymphes testées	Nombre de nymphes positives	Taux d'infection (%)	Densité en nymphe par 100 m ²	Densité en nymphes infectées par 100 m ²
ALSACE					
Total Alsace	1234	15	1,2	22,8	0,3
BRETAGNE					
Total Bretagne	894	4	0,4	27,6	0,1

Les résultats de séquençage des produits de PCR des nymphes positives indiquent uniquement la présence de l'espèce *B. miyamotoi* dans tous les échantillons séquencés à ce jour.

En conclusion, concernant les trois pathogènes étudiés, nous observons les répartitions suivantes :



En 2017, 29 nymphes présentaient un co-portage des bactéries pathogènes suivantes :

- 22 nymphes présentaient un co-portage de deux espèces différentes de *Borreliella*,
- 6 nymphes présentaient un co-portage de *B. miyamotoi* et *Borreliella*,
- 1 nymphe présentait un co-portage de *Borreliella* et d'*A. phagocytophilum*

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Sans objet pour le CNR *Borrelia*

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

3.4.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France et le réseau Sentinelles

Ce travail prospectif repose sur le réseau des médecins généralistes sentinelles. La surveillance est coordonnée par l'UMR-S 1136. Ses objectifs sont de décrire les caractéristiques cliniques des cas recensés afin d'améliorer leur prévention et leur

traitement, d'estimer l'incidence de ces pathologies dans les différentes régions de France et de comparer cette incidence à celle observée les années précédentes.

Le CNR participe ainsi à des réunions téléphoniques trimestrielles ou semestrielles de validation des cas et à la relecture du rapport d'activité du réseau Sentinelles pour la partie le concernant. Ces données sont publiées annuellement sur le site du réseau <https://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?page=bilan>.

En 2016, le réseau a validé 194 cas de borréliose de Lyme répondant aux critères de définition de cas retenus par le réseau, donnant une estimation de l'incidence annuelle de la borréliose de Lyme estimée au niveau national à 54 647 cas et un taux d'incidence annuel de 84 cas/100 000 habitants (IC 95% : 70 – 98) avec de fortes disparités régionales (>150 cas/100 000 habitants en Limousin et en Alsace par exemple). Ceci représente une augmentation significative par rapport aux années précédentes (taux d'incidence annuel en 2015 de 51 cas/100 000 habitants, IC 95% : 38 – 64).

Le suivi sur les prochaines années avec la même méthodologie est donc important pour voir si la tendance à l'augmentation de l'incidence se confirme. La validation des cas 2016 n'est pas terminée au jour de ce rapport.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.5.1. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance - Réseau ALSA(CE)TIQUES

Un réseau piloté par la CIRE (cellule inter-régionale d'épidémiologie) Nord-Est a mis en place en Alsace une étude épidémiologique « Alsa(ce)tiques » du 1^{er} janvier 2014 au 31 décembre 2015. L'analyse des caractéristiques des cas recensés a été terminée et rendue publique en 2017.

Cette étude prospective a porté sur 3 maladies transmises par les tiques : la borréliose de Lyme, l'encéphalite à tiques (TBEV) et l'anaplasmose granulocytaire humaine. Au total, 388 médecins ont participé au réseau, soit 11 % des praticiens d'Alsace.

L'étude Alsa(ce)tique 2014-2015 a permis d'estimer le nombre de cas de borréliose de Lyme à 2 200 cas par an en Alsace, soit un taux d'incidence annuel moyen de 117 cas / 100 000 habitants [IC 95% : 109-126]. Ce taux était stable sur les deux années d'étude. Ce taux était aussi stable par rapport à une précédente étude similaire en 2001-2003 et concordant avec les données du réseau Sentinelles dans cette région. Par contre, les taux d'incidence variaient fortement selon le canton d'exercice, les plus élevés étant dans les cantons situés à proximité du massif vosgien.

Presque 80 % des cas correspondaient à un érythème migrant unique. Les formes disséminées représentaient environ 21 % des cas, principalement des arthrites de Lyme et des neuroborrélioses.

Si la quasi-totalité des cas a été traitée avec un traitement antibiotique, 28 % des personnes présentant un érythème migrant se sont vus prescrire à tort une sérologie pour un diagnostic d'érythème migrant.

Pour les 2 autres manifestations liées aux tiques surveillées dans cette étude, 13 cas certains et un cas probable d'encéphalite à tiques ont été observés et trois cas d'anaplasmose granulocytaire humaine ont été confirmés biologiquement.

3.5.2. Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme (PRI 3977)

Nous réalisons une surveillance des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France par deux protocoles sur biopsies cutanées (celui-ci et celui présenté en 3.5.3).

Durant les précédents mandats du CNR, nous avons débuté l'analyse prospective de biopsies cutanées de patients présentant des lésions typiques ou atypiques dans le cadre d'une suspicion d'infection cutanée à *Borrelia*. Ces prélèvements nous sont adressés de toute la France, essentiellement par des dermatologues volontaires pour participer à ce réseau, mais également aussi par certains infectiologues et internistes.

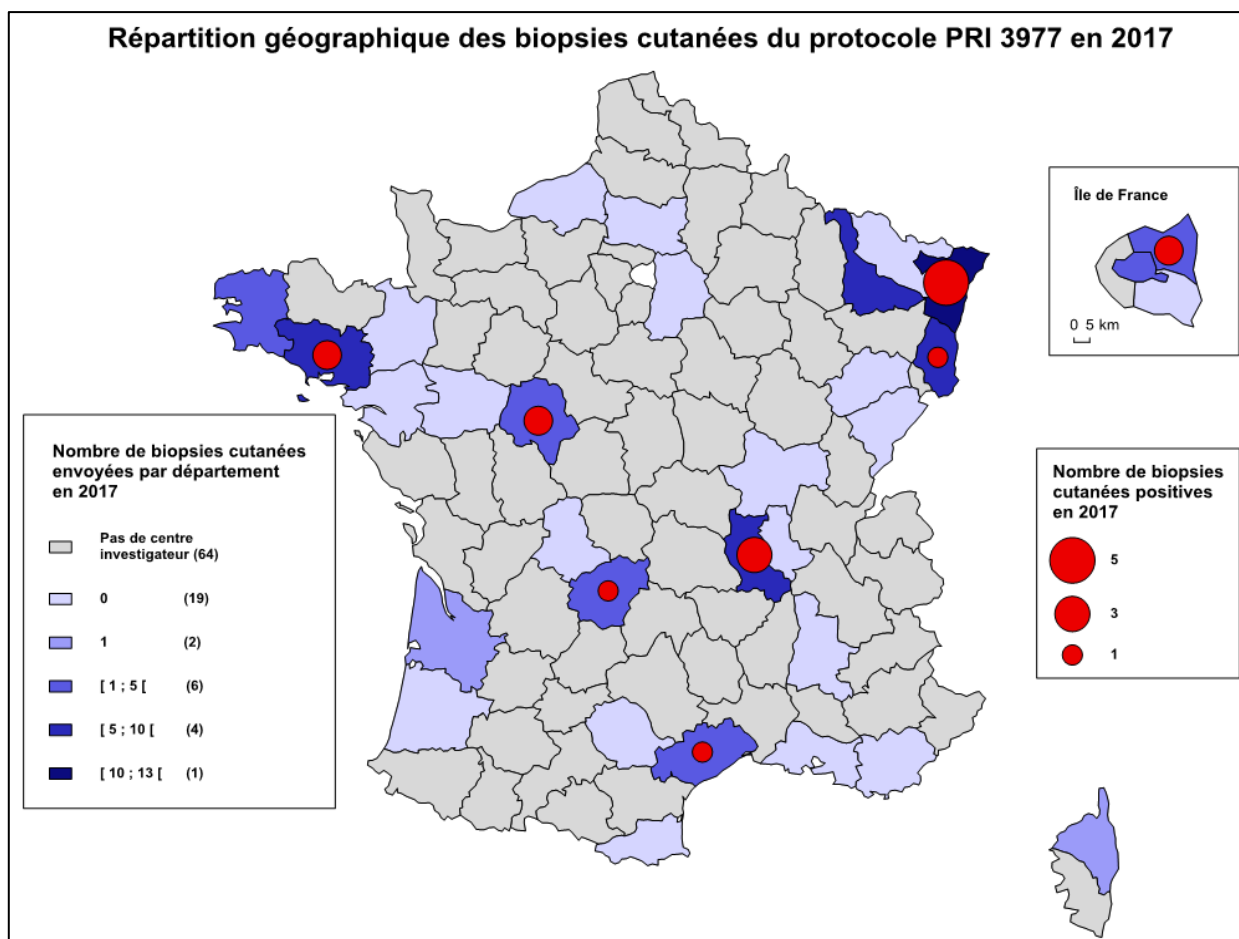
Tous les échantillons biopsiques proviennent d'adultes et sont conformes au protocole « Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France », accepté par le CPP (Comité de Protection des Personnes). Le financement des réactifs et consommables de ce protocole est assuré par une bourse de la Société Française de Dermatologie. Les analyses sont effectuées par le personnel du CNR *Borrelia*.

En 2017, 54 prélèvements nous ont été adressés. Ces biopsies nous ont été adressées de 13 départements répartis sur le territoire.

Parmi ces 54 prélèvements, 32 (59,3 %) ont été adressés pour suspicion d'EM, 15 (27,8 %) pour suspicion d'acrodermatite chronique atrophique, 6 (11,1 %) pour suspicion de lymphocytome borrélien et 5 (9,3 %) avec des manifestations atypiques (hypodermite, état scléreux) ou non renseignées.

La carte ci-dessous représente le nombre de demandes adressées au CNR *Borrelia* par département investigateur ainsi que le nombre de résultats positifs obtenus par culture et/ou biologie moléculaire.

Les départements en gris ne possèdent pas de centre investigateur pour ce protocole.



Sur les 54 biopsies, 17 biopsies (31,5 %) sont positives en PCR dont 7 (13 %) également en culture. La répartition des espèces de *Borrelia* dans ces biopsies cutanées positives en culture et/ou PCR, est représentée dans le chapitre 3.2.1.2.

3.5.3 PHRC « DIABOLYC : Diagnostic Borréliose de Lyme Cutané »

Ce PHRC interrégional réunit un réseau de dermatologues et d'internistes de 7 centres hospitaliers de la région Grand-Est.

En 2017, 20 prélèvements nous ont été adressés. Des biopsies nous ont été adressées de 4 centres répartis sur la région Grand-Est. Parmi ces 20 prélèvements, 70 % (n = 14) étaient positifs.

Centre investigateur (département)	Nombre biopsies cutanées	Nombre biopsies positives en culture et/ou PCR	Espèces
Colmar (68)	1	1	<i>B. afzelii</i>
Metz (57)	1	1	<i>B. garinii</i>
Mulhouse (68)	13	7	<i>B. afzelii</i> (100 %)
Strasbourg (67)	5	5	<i>B. afzelii</i> (100 %)

4 Alerte

Pas d'alerte recensée en 2017.

La procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal est décrite en annexe 1.

5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1. Liste des enseignements

« Pathologies liées aux tiques » **B. Jaulhac**, Séminaire Master II « Zoonoses et environnement », Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale, Limoges, 26 octobre 2017.

« Infections émergentes transmises par les arthropodes », **S. DE MARTINO**, cours au Master 1 de Microbiologie Médicale, Faculté de Médecine de Strasbourg, cours dispensé chaque année.

« *Borrelia* », **B. JAULHAC**, enseignement sciences biocliniques, agents infectieux, 2^o cycle Médecine cours dispensé aux étudiants de DFGSM3, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg.

« Modèles animaux de la maladie de Lyme », **B. JAULHAC**, enseignement « Modèles animaux et Mécanismes physiopathologiques », 2^o cycle - Médecine, cours dispensé aux étudiants de DFASM1 et DFASM2, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg.

« *Borrelia* », **B. JAULHAC**, cours de Microbiologie Médicale - dispensé aux étudiants de 3^o et 4^o année - Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg.

« La borréliose de Lyme », **S. DE MARTINO**, cours de DES aux internes de biologie de l'Université de Strasbourg.

« Entomologie médicale », **N. BOULANGER**, Travaux pratiques 5^{ème} année - Faculté de pharmacie de Strasbourg.

« La borréliose de Lyme », **N. BOULANGER**, cours dispensé aux étudiants de 6^{ème} année - Faculté de pharmacie de Strasbourg.

« Rôle des arthropodes dans la transmission des pathogènes » : exemple de la borréliose de Lyme - **N. BOULANGER**, Master de physiopathologie moléculaire et cellulaire, Faculté de médecine de Strasbourg.

5.1.2. Formation médicale continue aux professionnels de santé

Les membres du CNR *Borrelia* ont participé à des actions de formations :

- des médecins : Formation continue des biologistes des hôpitaux, DPC pour les médecins généralistes :

1. Bourée P., Bricaire F., **Jaulhac B.**
« La maladie de Lyme
Les entretiens de Bichat 2017
Paris, 05 octobre 2017.
2. **Jaulhac B.**, Lenormand C.
Journées Dermatologiques de Paris
Ce que le dermatologue doit savoir
Paris, 15 décembre 2017.
3. **S. De Martino** : DPC : « *La maladie de Lyme et son actualité* » 08/06/2017.
4. **S. De Martino** : ANDPC – Rhumatologie – programme DPC 2017 : « *Maladie de Lyme ce que le rhumatologue doit savoir* » : 5 soirées

- des pharmaciens :

formation continue des pharmaciens :

UTIP, Bar Le Duc : Les tiques : mieux les connaître pour mieux s'en protéger ;
N. Boulanger, 10 Janvier 2017.

UTIP, Strasbourg : Les tiques : mieux les connaître pour mieux s'en protéger.
N. Boulanger, 01^{er} Juin 2017.

APEPPU, Strasbourg : Formation continue des pharmaciens d'officine : Borréliose de Lyme : biologie des tiques, actualités, plan Lyme. **N. Boulanger**, 09 et 16 octobre 2017.

5.1.3. Information pour les médias grand public et site internet

➤ Médias

En 2017, le CNR a fait, comme les années précédentes, l'objet de différentes sollicitations de la part des media grand public que ce soit la presse écrite ou télévisée, media régionaux et nationaux :

N. Boulanger :

- **20 minutes** : Reportage Journal sur le « Projet de vaccin Lyme ». Janvier 2017
<https://www.20minutes.fr/strasbourg/1999667-20170120-strasbourg-chercheurs-avancent-vaccin-contre-maladie-lyme>
- **Le Monde** (Magazine scientifique, article, Pascale Santi, 17 mai 2017. Plan Lyme)
- **France Culture** : Emission, Le monde scientifique : maladie de Lyme : 22 mai 2017
[https://www.franceculture.fr/Émissions/La Méthode scientifique](https://www.franceculture.fr/Émissions/La_Méthode_scientifique)

- **Radio France Internationale** : Interview journaliste RFI, Cristelle Duos, Emission du 30 juin 2017
- **Que choisir** : Article: les répulsifs contre les tiques. Journaliste AS Stamane, Juin 2017
- **Science et Pseudo-sciences** : Article, numéro spécial « Lyme »: Juillet-septembre 2017, N°321.<http://www.pseudo-sciences.org/spip.php?article2841>
- **Science et Santé INSERM**, Article N°37, Maladie de Lyme, Septembre-octobre 2017
- **Science et Avenir** : Article sur la salive des tiques et allergie. Novembre 2017

B. Jaulhac :

- **Magazine de la Fondation pour la Recherche Médicale** – Interview Emilie Gillet
- **Magazine « Mieux pour moi** - Interview Sarah Ellero
- **France 5** – « Enquête de Santé » – Interview Stéphanie Ratscheck
- **LCLFr** – Interview Julie Bernichan
- **Science et Pseudo-sciences** : Article, numéro spécial « Lyme »: Juillet-septembre 2017, N°321.<http://www.pseudo-sciences.org/spip.php?article2841> – Jean-Paul Krivine

➤ **Le site internet du CNR *Borrelia* :**

- Adresse du site : <http://www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia>

5.1.4. Accueil de stagiaires

Stage de master M1 :

- R Barosi, Mars-Mai 2017 : Emergence des maladies Parasitaires et Infectieuses, Université des Sciences de Montpellier
- M Mutchler, Juin 2017 : Master de Physiopathologie

Stage de master M2 :

- M Paz : Novembre 2016 - Octobre 2017 : Master Physiopathologie
- F Gallais : Novembre 2016 - Octobre 2017 : Master Physiopathologie
- B Giroudot : Novembre 2016 - Mai 2017 : Master Immunologie

Stage de Pharmacie 5^o année :

- S Moog : Janvier 2017 – Avril 2017 : option Officine
- L Eulert : Janvier 2017 – Avril 2017 : option Industrie-Recherche
- S Rietsch : Janvier 2017 – Avril 2017 : option Officine
- S Levêque : Mai 2017 – Août 2017 : option Officine
- V Scavazzin : Septembre 2017 – Décembre 2017 : option Internat.

5.1.5. Thèse de doctorat, participation à des jurys

Thèses soutenues au laboratoire :

- **Valérie Goldstein** : Septembre 2012 – Octobre 2017 : « Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en Europe » ; Interne en pharmacie
- **Antoine Grillon** : Septembre 2013 – Octobre 2017 : « Rôle de la latence cutanée de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans la physiopathologie de la borréliose de Lyme » ; AHU en médecine

Participation à des jurys de thèses soutenues dans l'Université

Néant en 2017

Participation à des jurys soutenus hors de l'Université :

- **Andrea Gomez** : **Thèse d'Université** : Septembre 2016 – Février 2017 : Doctorante de l'université de Neuchâtel stagiaire au CNR pour 6 mois. Collaboration avec l'université de Neuchâtel sur l'épidémiologie de la borréliose de Lyme
- **Anne-Claire Lagrée** : **Thèse d'Université** : Approche multi-échelles (élevage, cellule, -omique) des mécanismes de transmission inter-espèces d'*Anaplasma phagocytophilum* et de sa circulation chez les bovins. Maisons-Alfort le mercredi 20 décembre 2017.
Directeur : Pr. Henri-Jean Boulouis.
- **Alejandro Cabelas-Cruz** : **dossier de candidature à l'HDR** "Tick research in the uprise of tick-borne diseases". Université Paris-Est.
- **Sara Moutailler** : **dossier de candidature à l'HDR** "Tiques et agents pathogènes transmis : de l'épidémiologie moléculaire aux interactions hôtes-pathogènes". Université Paris-Est.

Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Néant en 2017

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

➤ *Expertises nationales*

- **Expert en tant que membre de réseaux :**

N. Boulanger :

- Membre du **réseau CNEV: Centre National Expertise des Vecteurs**. Responsable. Dr. F. Chandre. Expert pour les tiques. Membre du consortium CNEV.
- Membre du **réseau REID** (Réseau des Interactions durables: Maladies à Tiques).

- **ANSES 2017:** demande d'expertise pour l'attribution de thèse de doctorat.
Sujet de thèse : Cartographie des interactions protéiques entre la tique *Ixodes ricinus* et les virus qu'elle transmet.
- **DIM1Health :** Région Ile de France – Septembre 2017. Expertise pour l'attribution d'une bourse de Thèse.

➤ *Expertises internationales*

- *Expertise pour l'Attribution de financements :*

N. Boulanger :

Ministère Belge de la Recherche : Application CRP UAntwerp – TOP BOF 2018-2021 : expertise sur la leishmaniose, attribution de financement. Juillet 2017.

- *Participation à des comités d'experts*

B. Jaulhac :

- Comité scientifique du **groupe européen ESGBOR**, Vienne, 20-22 janvier 2017.
- Comité Scientifique du « **International Symposium on Tick-Borne Pathogen** », Vienne, 24-26 septembre 2017.
- **ECDC** – Expert Meeting “Roadmap for Lyme neuroborreliosis surveillance in the EU”. Stockholm, 19-20 octobre 2017.
- **Plan National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Lyme**, organisé par la HAS et la SPILF. Paris, 8 réunions durant l'année 2017.

- *Activités de referee pour des revues scientifiques*

N. Boulanger :
Vector Borne and Zoonotic diseases,
Tick and Tick Borne diseases,
PlosOne.

B. Jaulhac :
Médecine & Maladies Infectieuses,
Tick and Tick Borne diseases,

5.3 Conseil pour d'autres cibles

Conférences grand public :

N. Boulanger : « Tiques et maladies à tiques : mieux les connaître pour mieux s'en protéger »

- Société Philomatique d'Alsace et de Lorraine, Strasbourg, 13 mars 2017
- INRA Bordeaux, Conférence aux personnels INRA, 21 mars 2017
- INSERM, Jardin des Sciences, Strasbourg, 23 mars 2017

- Association Les Baraques, St Quirin, Moselle (57), 7 avril 2017
- Association forêt et nature, Cirey sur Vezouze, Meurthe et Moselle (54), 30 avril 2017
- Conférence grand public, Club Vosgien, Aubure (68) : Les tiques, 10 novembre 2017.

5.4 Conseil aux professionnels

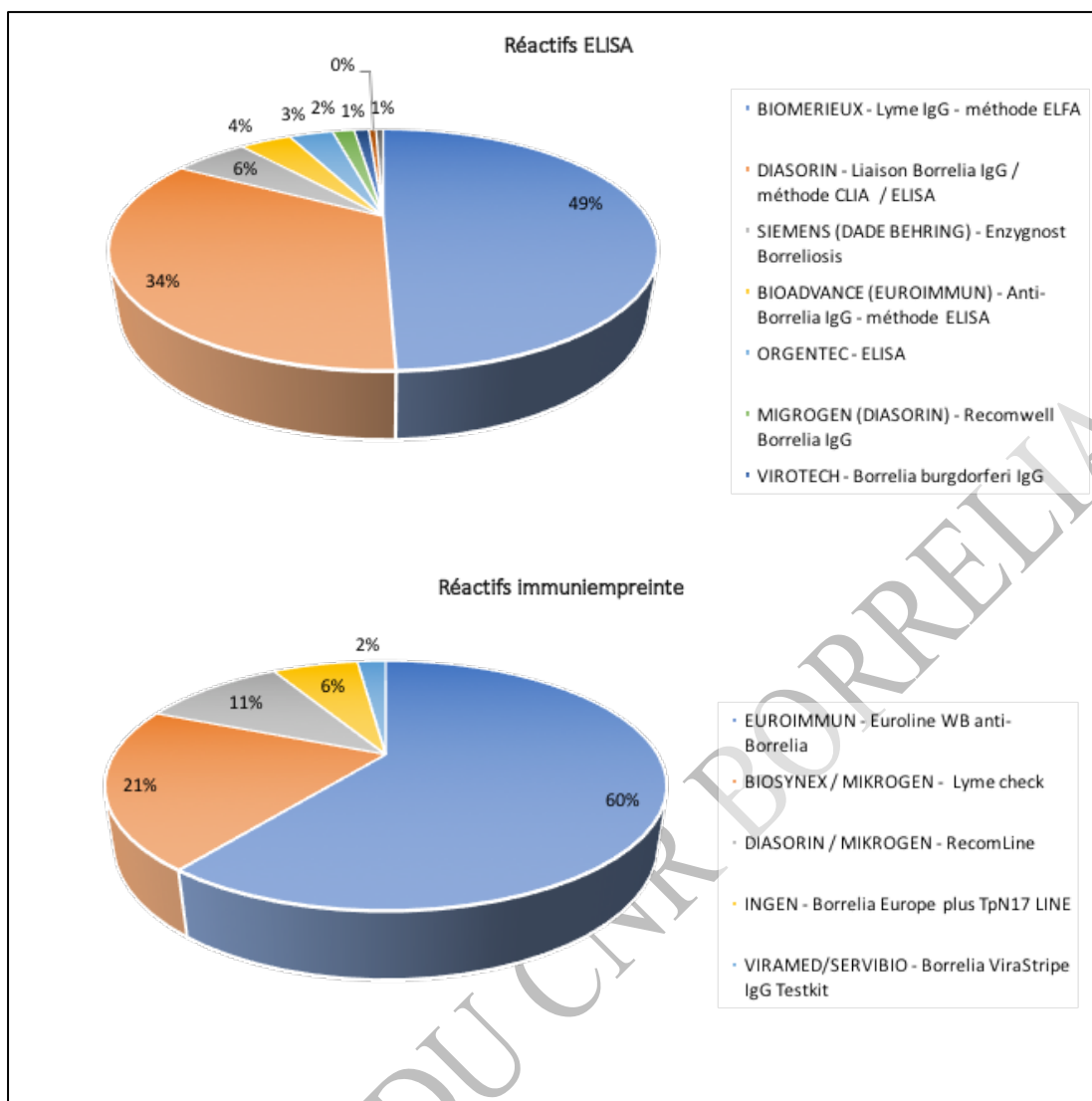
5.4.1. Organisation annuelle d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé par le CNR

Quatre sérums de contrôle de qualité externe (EEQ) ont été proposés aux laboratoires d'analyses médicales volontaires *via* Biologie Prospective (organisme associatif d'organisation de contrôle de qualité – DPC et formation professionnelle) pour la sérologie de *Borrelia*.

L'objectif de ces contrôles est de permettre à chaque laboratoire de tester sa qualité technique analytique ainsi que sa capacité d'interprétation et de conseil biologique face à un cas clinique.

Près de 180 laboratoires ont participé en 2017 à au moins 2 des 4 EEQ dans l'année.

Près d'une dizaine de réactifs différents étaient utilisés par ces laboratoires en ELISA et deux fois moins de réactifs différents en immuno-empreinte (ou western-blot).



En moyenne, les résultats analytiques fournis par l'ensemble des laboratoires étaient satisfaisants dans plus de 98 % des cas.

Pour les interprétations sérologiques et les conseils, les taux de concordance variaient selon les enquêtes de 67 % à 96 %. Les points de progression concernaient la reconnaissance de possible réaction croisée en IgM et la quasi-absence d'indication de la PCR sur le LCR et/ou le sang en cas de suspicion de neuroborréliose. Ces deux points seront des axes de formation lors des séminaires réalisés par le CNR.

5.4.2. Activités de conseil et organisation des communications écrites et orales

Organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails :

- Les mails sont centralisés sur une adresse unique : cnr.borrelia@unistra.fr, et selon leur contenu sont soit transmis aux biologistes soit répondu directement par les techniciennes et ingénieurs du CNR.
- Une permanence téléphonique du CNR est effective du lundi au vendredi de 9h à 12h et de 13h à 16h30 (03.69.55.14.27), une boîte vocale est également mise en place : 03.69.55.16.66. Selon la nature et l'interlocuteur les appels sont traités soit par les biologistes soit par les techniciennes et ingénieurs du CNR.
-

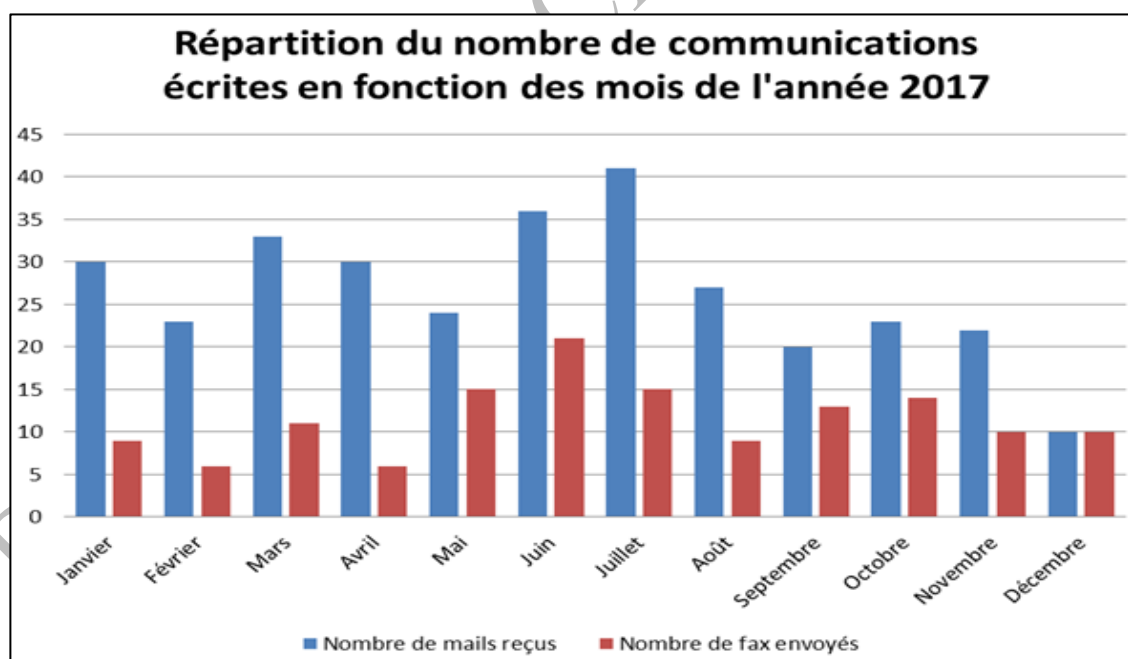
5.4.2.1. Communications écrites : e-mails / fax / lettres

L'analyse de l'activité de conseil du CNR *Borrelia* a été réalisée à partir d'un fichier Excel® contenant la saisie manuelle des e-mails et fax de l'année 2017. La base de données a été constituée à partir de l'extraction des données suivantes dans chaque e-mail : la date, l'émetteur, le destinataire, la provenance géographique et le thème de la demande.

En 2017, 458 communications écrites ont été recensées : 319 e-mails, 139 fax et 2 courriers.

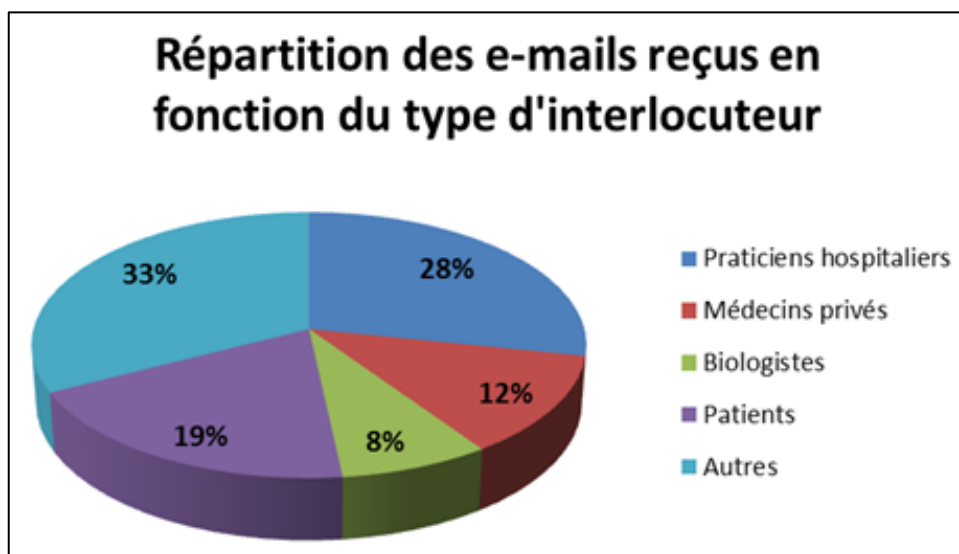
Le graphique ci-dessous représente la répartition de ces communications en fonction des différents mois de l'année.

On observe une répartition relativement homogène des demandes durant l'année. Le nombre de demandes variait entre 10 et 41 par mois.



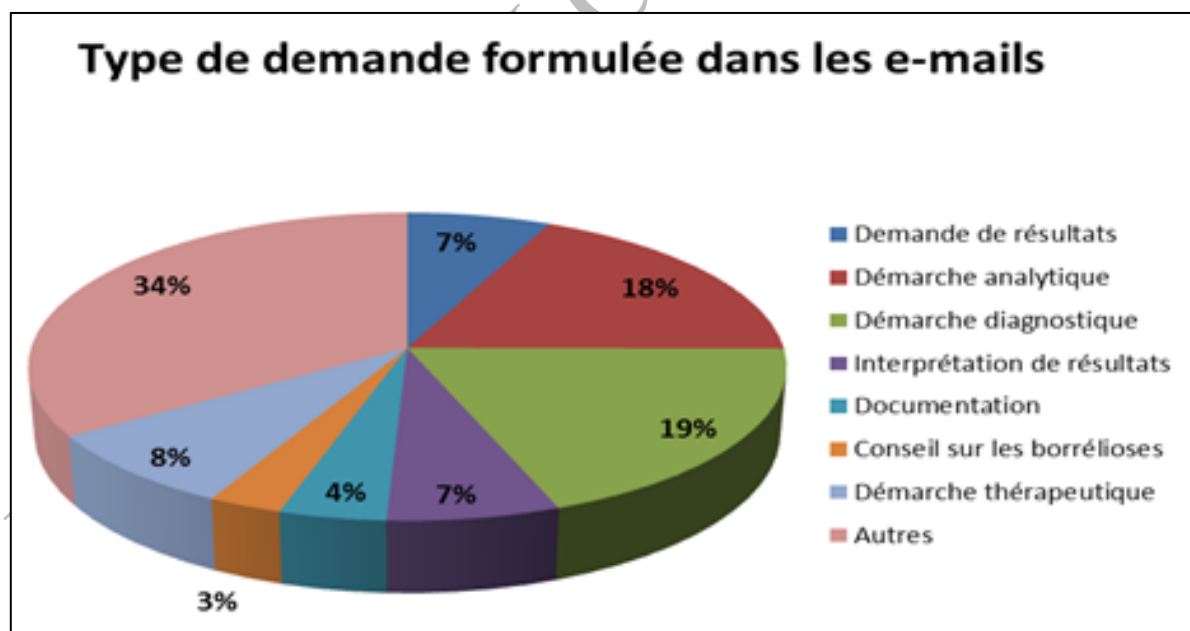
Parmi les 139 fax envoyés, 98 % correspondaient à des résultats d'analyses demandés par les prescripteurs. Les autres demandes correspondaient à des envois de documentation.

Les e-mails ont été analysés en fonction du type d'interlocuteur :



Les demandes provenaient essentiellement de praticiens hospitaliers et de médecins privés qui représentaient à eux deux 40 % des e-mails reçus. Les demandes de patients représentaient 19 % des e-mails reçus. On recensait 33 % d'e-mails provenant d'autres interlocuteurs comme des journalistes (6 %), des organismes liés à la santé ou à la recherche.

Les e-mails ont été ensuite analysés en fonction de la demande formulée :



La majorité des e-mails envoyés au CNR étaient dans l'optique d'une aide à la démarche diagnostique (19 %) à la démarche analytique (18 %), thérapeutique (8 %), ou d'aide à l'interprétation des résultats (7 %).

Dans la catégorie « autres » qui représentait 34 % des e-mails reçus, on trouve principalement des demandes d'informations précises (ex : épidémiologie, modes de transmission, etc.).

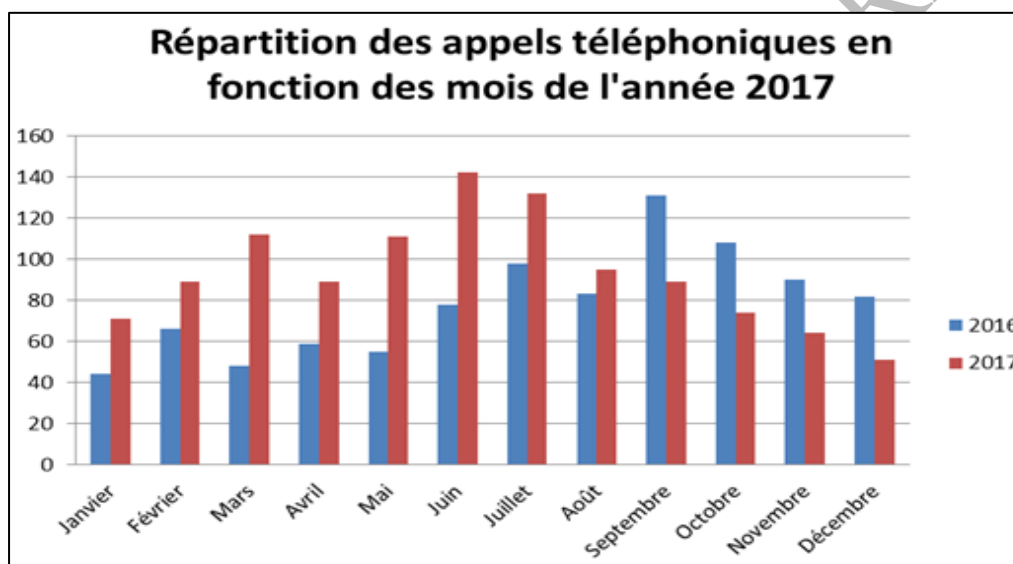
5.4.2.2.Communications téléphoniques

Les données des communications téléphoniques ont été analysées à partir d'un fichier Excel® contenant la saisie manuelle des conversations téléphoniques recensées durant l'année 2017.

Le CNR a reçu 1 119 appels en 2017, soit une augmentation de 19 % par rapport à 2016.

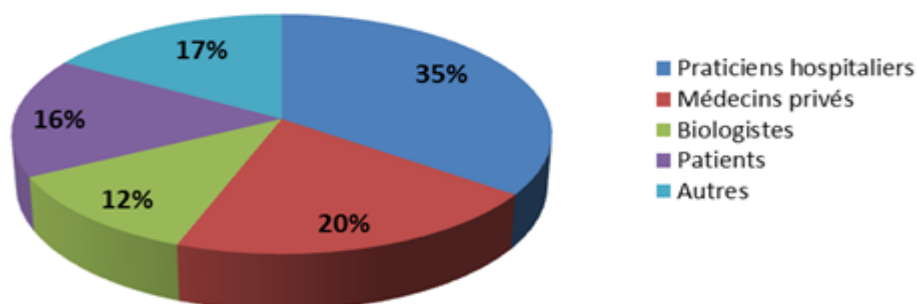
Au total, 93 h ont été passées au téléphone par le personnel du CNR. Parmi ces appels, 270 appels (24 %) ont été réceptionnés par les biologistes du CNR et 849 appels (76 %) ont été réceptionnés par les techniciennes et ingénieurs du CNR. La durée d'un appel est en moyenne de 5 minutes. Les biologistes apportent des conseils essentiellement analytiques, diagnostiques ou thérapeutiques alors que les techniciennes répondent aux questions relatives aux démarches pour l'envoi de prélèvements ou de documents ou des demandes de résultats.

La répartition des appels variait selon les mois de l'année :



Un pic du nombre d'appels est observé aux mois de juin et de juillet, le nombre moyen d'appels par mois est 93,3 appels.

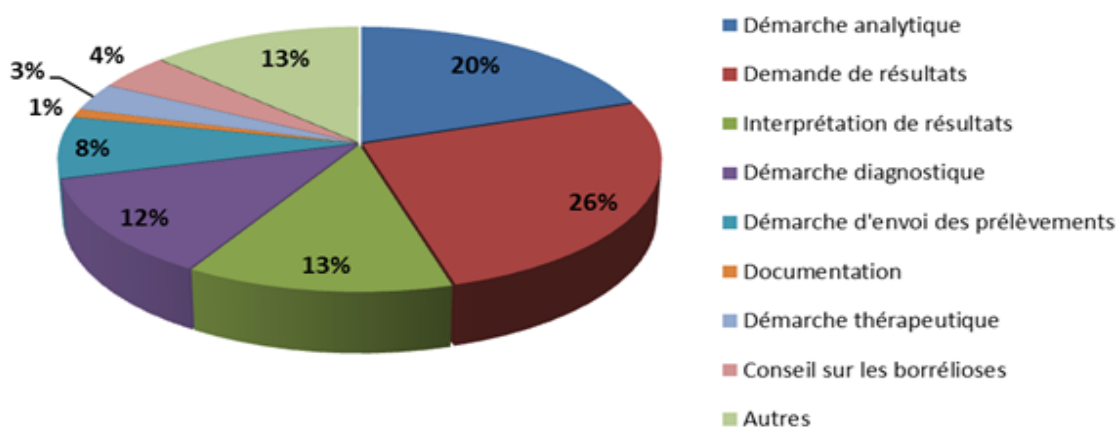
Répartition des appels téléphoniques en fonction du type d'interlocuteur



En 2017, la majorité des communications téléphoniques ont été réalisées avec des médecins (55 %), toutes spécialités et origines confondues. Dans 55 % des cas, il s'agissait de médecins qui rencontraient des problèmes avec leurs patients et qui demandaient conseil au CNR. Les autres interlocuteurs étaient des biologistes et des patients, dans respectivement 12 % et 16 % des cas. Les 17 % des appels restants concernaient d'autres interlocuteurs (ARS, DRCI, journalistes, etc.).

Les thèmes principaux de ces conversations téléphoniques sont représentés ci-dessous :

Type de demande formulée dans les conversations téléphoniques



Les grands thèmes correspondaient aux :

- demandes relatives aux analyses biologiques (54 %) : demandes de résultats (26 %), démarche analytique (20 %), et modalités de prélèvement et d'envoi des échantillons (8 %)
- demandes relatives au diagnostic (28 %) : interprétations des résultats (13 %), démarche de diagnostic clinique (12 %) et démarche thérapeutique (3 %).

En conclusion, cette analyse des communications révèle que l'activité du CNR des *Borrelia*, a enregistré une nouvelle hausse par rapport à 2016 (+19%). Il ne s'agissait pas seulement d'une activité analytique et d'expertise, le conseil et l'information occupaient également une place importante. Les demandes présentaient des diversités géographiques, thématiques et provenaient de divers interlocuteurs, la majorité des demandes étant celles des cliniciens à propos de la démarche diagnostique et analytique en cas de suspicion de borréliose de Lyme.

En effet, le diagnostic de maladie de Lyme peut être délicat et l'interprétation des différentes analyses n'est pas toujours aisée pour les prescripteurs.

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1. Activités de recherche en 2017 en lien direct avec les missions et activités du CNR

Les différents axes fondamentaux et vectoriels de l'équipe de recherche (EA7290 : virulence bactérienne précoce : groupe *Borrelia*) ont été les suivants :

1. Analyse du rôle de la peau dans la transmission précoce de *Borrelia* et de son rôle potentiel dans la physiopathologie de la maladie. Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de *Borrelia* dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse.
2. Analyse de la latence de *Borrelia* et de l'organotropisme de *Borrelia* pour la peau par une approche protéomique : application à un diagnostic tardif de la borréliose de Lyme.
3. Mise au point d'une technique de détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les tiques par spectrométrie de masse
4. Analyse du rôle du microbiome cutané sur la transmission précoce de *Borrelia burgdorferi* sensu lato : rôle sur l'attraction des tiques et dans la transmission de *Borrelia* au niveau de la peau.
5. Développement d'un vaccin vétérinaire contre la borréliose de Lyme.
6. Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en zone d'endémie : identification des tiques *Ixodes* par spectrométrie de masse, MALDI-TOF.
7. Mise au point d'un modèle de fièvres récurrentes à *Borrelia crocidurae*.

6.1.1. Analyse de la latence et de l'organotropisme de *Borrelia* dans la peau par une approche protéomique de *Borrelia*: application à un diagnostic tardif de la borréliose de Lyme.

6.1.1.1. Objectifs

Confirmer le rôle de la peau dans la persistance de *Borrelia* et mettre en évidence des protéines bactériennes qui pourraient servir de marqueurs d'infection active dans la phase chronique de la borréliose.

6.1.1.2. Partenariats

Professeur L. Sabatier et une étudiante de doctorat (Paola Cantero) et une étudiante contractuelle (Ludivine Esteves-Gloria), Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France

6.1.1.3. Etat d'avancement

B. burgdorferi a été inoculée par voie intradermique chez la souris. Des biopsies de souris, réactivées au préalable avec un dermocorticoïde, ont été prélevées à 40 jours afin de rechercher des protéines de *Borrelia* par LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry). Des protéines bactériennes ont été identifiées dans la peau des souris infectées et vont constituer des marqueurs d'infection active de *Borrelia*.

Ce travail a fait l'objet d'une thèse de Doctorat, par Antoine GRILLON, AHU en bactériologie.

Un financement ANR a été obtenu pour ce projet.

6.1.2. Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de *Borrelia* dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse

6.1.2.1. Objectifs

Mettre au point une nouvelle technique de diagnostic précoce. Comparaison d'une technique de spectrométrie de masse détectant des protéines bactériennes dans la peau aux deux techniques existantes : la PCR et la culture de *Borrelia*.

6.1.2.2. Partenariats

Professeur L. Sabatier et une étudiante de doctorat (Paola Cantero), Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France.

- Cette étude se fait en collaboration avec :
 - le service d'Infectiologie (Prof Hansmann) et de Dermatologie (Prof D. Lipsker et Dr. C. Lenormand) du CHU de Strasbourg,
 - les CHU de Besançon et de Reims,
 - le CH de Mulhouse (Dr Kieffer),
 - le CH de Colmar (Dr Martinot),
 - le CH de Metz.

6.1.2.3. Etat d'avancement

Nous avons mis au point sur modèle murin une technique de diagnostic ciblée, la SRM-MS/MS (Selected Reaction Monitoring / Mass spectrometry). Nous nous sommes placés

au 7^{ème} jour (pic de multiplication de *Borrelia*) après infection intradermique à la seringue de *B. burgdorferi* ss

Sur biopsies cutanées, nous avons préalablement recherché l'ensemble des protéines bactériennes de *Borrelia* présentes par LC-MS/MS : 25 ont été identifiées. Parmi ces 25 protéines, se trouvait OspC et la flagelline que nous avons choisies pour rechercher spécifiquement par SRM-MS/MS dans la peau de souris et qui y ont été retrouvées. Afin de valider la méthode pour une application éventuelle chez l'Homme, nous l'avons testée sur 3 biopsies d'érythème migrant de patients infectés par *B. afzelii*. De façon tout à fait intéressante, OspC et la flagelline ont été retrouvées chez les trois patients.

Afin de valider la technique de diagnostic précoce à plus large échelle, nous avons déposé un projet « IDEX : étude pluridisciplinaire » auprès de l'Université de Strasbourg sur ce sujet afin d'obtenir un accès à plus de patients. Nous avons obtenu un financement partiel pour ce travail.

6.1.3. Mise au point d'une technique d'identification de tiques par spectrométrie de masse, notamment d'*Ixodes*

6.1.3.1. Objectifs

Mettre au point une technique rapide d'identification des tiques par spectrométrie de masse pour remplacer l'identification à la loupe binoculaire (longue) ou par biologie moléculaire (coûteuse).

6.1.3.2. Partenariats

Ce travail se fait en étroite collaboration avec l'équipe de recherche IRBA (Institut de Recherche des Armées) de Marseille (Dr L. Almeras).

6.1.3.3. Etat d'avancement

Le travail a été initié par un étudiant en master M2 en 2013, cet étudiant P. Boyer poursuit par une thèse de doctorat.

Nous avons commencé à constituer une base de données de tiques en utilisant leurs pattes, le reste du corps (idiosome) peut être utilisé pour rechercher des agents infectieux par PCR ou identifier l'espèce de tique par biologie moléculaire pour la constitution de banque de données.

6.1.4. Analyse du rôle du microbiome cutané dans l'attraction des tiques et sur la transmission précoce de *Borrelia*

6.1.4.1. Objectifs La flore cutanée de l'Homme pourrait avoir un impact majeur sur (1) l'attraction vis-à-vis des tiques, (2) puis sur la transmission d'agents infectieux. Les bactéries commensales moduleraient potentiellement l'inflammation lors de la transmission de la borréliose de Lyme, rendant les personnes plus ou moins sensibles à la maladie.

6.1.4.2. Partenariats

Ce travail a été initié par plusieurs masters M2 (Aurélien Rietsch, Jonathan Wolfgramm, Magali Paz) et nous un autre master M2 poursuivra le projet en 2018 (Alexandre Muler).

6.1.4.3. Etat d'avancement

Nous analysons le rôle des bactéries commensales de la peau dans la transmission de *Borrelia* en co-incubant la bactérie infectieuse *Borrelia* avec une bactérie de la peau *Staphylococcus epidermidis*

6.1.5. Développement d'un vaccin canin contre la borréliose de Lyme

6.1.5.1. Objectifs

Basée sur l'identification de protéines de *Borrelia* dans la peau par protéomique (spectrométrie de masse), nous recherchons des antigènes-candidats-vaccins susceptibles d'être utilisés pour un vaccin chez le chien.

6.1.5.2. Partenariats

- Pr L. Sabatier, Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France - Satt-Conectus, cellule de valorisation de l'université.
- Ecole vétérinaire de Munich (Allemagne), Dr R. Straubinger.

6.1.5.3. Etat d'avancement

Nous avons identifié par protéomique chez la souris infectée à la seringue avec *B. burgdorferi* (plusieurs souches), 25 protéines au jour 7 (pic de multiplication de *Borrelia*).

Ce protocole a ensuite été évalué chez le chien : 5 protéines candidates ont été sélectionnées pour une production de protéines recombinantes.

Les protéines lipidées devraient être produites en 2018 pour un test d'efficacité chez le chien.

Ce projet est financé par la cellule de valorisation de l'Université de Strasbourg.

6.1.6. Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en zone d'endémie

6.1.6.1. Objectifs

Etude du rôle de la faune sauvage : rongeurs et cervidés.

6.1.6.2. Partenariats

Partenariats avec l'ONF, l'ONCSF et l'ANSES-faune sauvage de Nancy.

6.1.6.3. Etat d'avancement

Mettre en parallèle les populations de rongeurs, cervidés et l'abondance de tiques avec certains paramètres météorologiques.

Test ELISA sur rongeurs pour mesurer la positivité de ces animaux à *Borrelia*.

6.1.7. Mise au point d'un modèle murin de fièvres récurrentes à *Borrelia crocidurae*

6.1.7.1. Objectifs Analyse du rôle de la tique molle *Ornithodoros* dans la transmission

Analyse du rôle de la peau dans la transmission et dans la persistance de la bactérie : tentative de mise au point d'une technique diagnostique en protéomique sur peau infectée.

6.1.7.2. Partenariats

Partenariat avec le Dr S. Bergstrom (Suède), spécialiste européen des fièvres récurrentes et avec le Dr L. Vial, spécialiste des fièvres récurrentes en Afrique de l'Ouest et experte sur les tiques molles.

6.1.7.3. Etat d'avancement

Mise au point du modèle sur souris Balb/C avec inoculation à la seringue. Mise en place d'un élevage de tiques molles *Ornithodoros*. Analyse de la physiopathologie chez la souris

6.2. Liste des publications et communications en 2017

6.2.1. Publications nationales

Livre ANOFEL : Participation rédactionnelle sur le chapitre « Les tiques » N. Boulanger, B. Degeilh. Ouvrage collectif des enseignants de parasitologie. 2017.

6.2.2. Publications internationales

Bernard Q., Wang Z., Di Nardo A., **Boulanger N.** (2017). Interaction of primary mast cells with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto: role in transmission and dissemination in C57BL/6 mice. *Parasites and Vectors*, 10(1):313.

Boyer PH, **De Martino SJ**, Hansmann Y, **Zilliox L**, **Boulanger N**, **Jaulhac B.** No evidence of *Borrelia mayonii* in an endemic area for Lyme borreliosis in France. *Parasit Vectors*. 2017 Jun 5;10(1):282.

Boyer PH, **Boulanger N**, Nebbak A, Collin E, **Jaulhac B**, Almeras L. (2017) Assessment of MALDI-TOF MS biotyping for *Borrelia burgdorferi* sl detection in Ixodes ricinus. *PLoS One*. Sep 26;12(9):e0185430.

Grillon A., Westermann B., Cantero P., **Jaulhac B.**, Voordouw M.J., Kapps D., Collin E., Barthel C., Ehret-Sabatier L., **Boulanger N.** (2017) Identification of *Borrelia* protein candidates in mouse skin for potential diagnosis of disseminated Lyme borreliosis. Scientific Reports, 7(1):16719.

Margos G, Marosevic D, Cutler S, Derdakova M, Diuk-Wasser M, Emler S, Fish D, Gray J, Hunfeldt KP, **Jaulhac B.**, Kahl O, Kovalev S, Kraiczy P, Lane RS, Lienhard R, Lindgren PE, Ogden N, Ornstein K, Rupprecht T, Schwartz I, Sing A, Straubinger RK, Strle F, Voordouw M, Rizzoli A, Stevenson B, Fingerle V. (2017) There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*. Int J Syst Evol Microbiol, 67(4):1081-1084.

6.2.3. Communications nationales

Boyer P., Almeras L., **Zilliox L.**, Plantard O., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.** Détection des tiques du genre *Ixodes* par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Journées du REID : groupe Tiques et Maladies à tiques, 7-9 mars 2017.

Diop K., Collin E., Talagrand E., Vial L., Bergstrom S., Barthel C., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.** Mise au point d'un modèle murin de fièvre récurrente a *Borrelia crocidurae*. Journées du REID : groupe Tiques et Maladies à tiques, 7-9 mars 2017.

Raguet. S., le Strat. Y., Hansmann Y., Martinot M., Kieffer P., **De Martino S.J.**, **Jaulhac B.** Couturier E. Incidence de la Borréliose de Lyme en Alsace, l'étude ALSA(CE)TIQUE 2014-2015. Communication orale aux 18^{èmes} Journées Nationales d'Infectiologie, St Malo, 21-23 juin 2017.

6.2.4. Communications internationales

Boulanger N. Lyme borreliosis : proteomic approach on skin biopsies to develop a vaccine and diagnosis. Anvers, Belgique, 8 juin 2017. Second meeting on skin and arthropod vectors.

Boyer P., Cantero P., Nebbak A., Sabatier L., **Jaulhac B.**, Almeras L., **Boulanger N.** Mass spectrometry analyses to identify *Ixodes* species and its associated pathogens. ITPD 1, Vienne, 24-26 septembre 2017.

Boyer P., **De Martino S.J.**, Hansmann Y., **Zilliox L.**, **Boulanger N.**, **Jaulhac B.** *Borrelia mayonii* : a species limited to the US ? Communication affichée. 27th ECCMID, Vienne, Autriche, 22-25 avril 2017.

Boyer P., **Zilliox L.**, Koetsveld J., **De Martino S.J.**, Hansmann Y., **Boulanger N.**, Hovius J.W., **Jaulhac B.** Evidence for *Borrelia miyamotoi* infection of ticks and in febrile patients after tick bite in France. Communication affichée, 27th ECCMID, Vienne, Autriche, 22-25 avril 2017.

6.2.5. Conférences sur invitation, congrès, séminaires

Boulanger N. Lyme borreliosis: proteomic approach on skin to develop vaccine and diagnosis. CEA, Saclay, 27 juin 2017

Boulanger N. Tiques et maladies à tiques. Journées scientifiques de la SPILF (Société de Pathologie Infectieuse de Langue française), Les Pensières, Veyrier du Lac, 11-12 Septembre 2017.

Boulanger N. Role of mast cells in Arthropod borne diseases, NIH Network on Arthropod Borne Diseases, Rockville, 14-15 septembre 2017.

Boulanger N. Borreliose de Lyme: biologie des tiques, physiopathologie de la borréliose de Lyme et actualités sur les maladies à tiques. Journée d'infectiologie du Grand Est, Strasbourg, 12 octobre 2017.

Boulanger N. Office Fédéral Suisse de la Santé: "Lyme borreliosis and skin: opportunities and challenges for vaccine and diagnostic". Bern, 12 décembre 2017.

Jaulhac B. Conférence « Pathologies liées aux tiques ». Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale. Limoges, 26 octobre 2017.

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

L'abondance des tiques dans un écosystème est associée à des facteurs abiotiques (température, humidité, etc.) et à des facteurs biotiques (végétation, écosystème forestier et faune sauvage).

Nous avons commencé dans le cadre du COPIL « maladies à tiques » présidé par l'ARS-Alsace de 2011 à 2014, une réflexion commune avec l'ONF sur le rôle de la faune sauvage, notamment des cervidés.

Le site de Murbach sera plus particulièrement ciblé afin d'analyser pourquoi ce site présente un plus fort risque acarologique que les différents sites étudiés depuis des années en Alsace ; cela pourrait être dû à sa faune sauvage.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR *Borrelia*

- Développer et diffuser des méthodes pour le diagnostic des différentes formes de borréliose
- Développer des techniques de typage de *Borrelia*
- Evaluer les tests diagnostiques commercialisés
- Apporter aux LABM son expertise
- Collaborer avec les structures expertes en entomologie et en santé animale pour caractériser l'écologie de *Borrelia*
- Contribuer à la surveillance épidémiologique et participer aux réseaux internationaux

Contribuer à l'alerte à SpF de tout événement inhabituel (nombre de cas, cas groupés, modification de la présentation clinique, etc)

1.2 Organisation du CNR *Borrelia*

Le CNR *Borrelia* est intégré depuis janvier 2012 au laboratoire de Bactériologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg sur le Plateau Technique de Microbiologie. Le CNR *Borrelia* a fonctionné en 2017 avec les moyens humains constants suivants :

- Pr. Benoît Jaulhac : médecin biologiste, directeur du CNR, PU-PH, 25 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Dr. Sylvie De Martino : médecin biologiste, MCU-PH, 20 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Mme Nathalie Boulanger : pharmacienne, MCU-PA, 50 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Dr. Pierre Zachary : médecin biologiste, PA, 10 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Madame Laurence ZILLIOX : Ingénieure Biologiste Hospitalier, 60% ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR
- Techniciennes : technicienne 2,75 ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR
- Secrétaire : 52 % ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR

1.3 Locaux et équipements

Locaux et équipements du CNR *Borrelia* (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

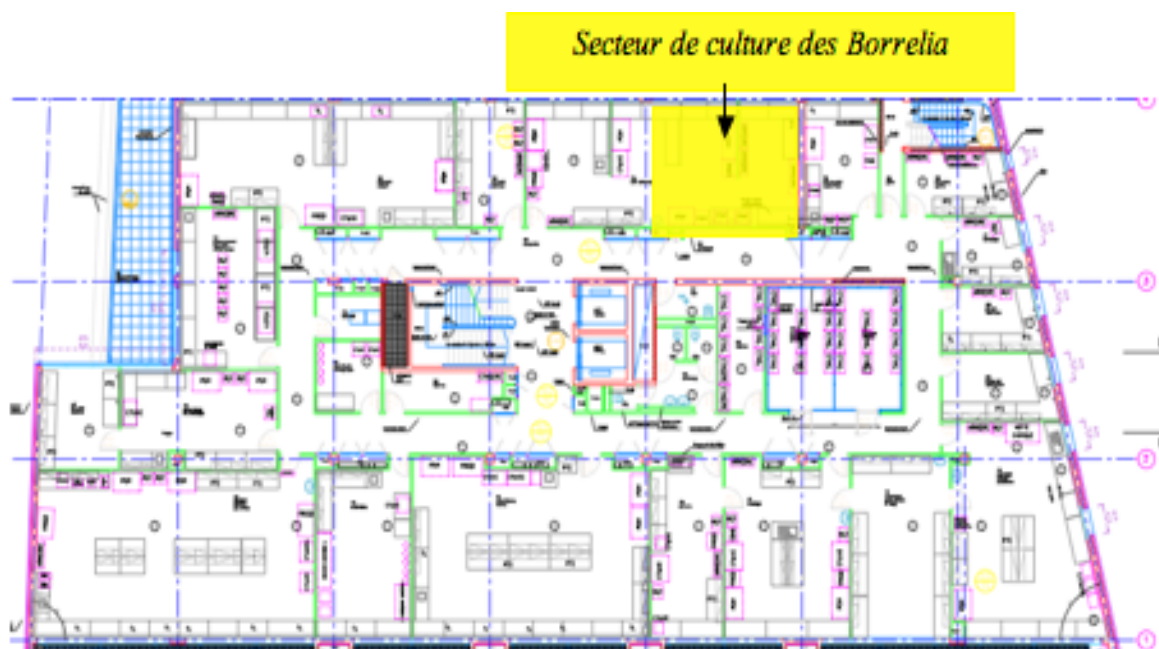
Surface, plan :

Depuis 2012, le CNR est localisé au sein du Plateau Technique de Microbiologie (bâtiment de 3 500 m² utiles). Son activité s'effectue en fonction des analyses à réaliser dans les différents Secteurs Techniques d'Activité Partagée (STAP) présentés ci-après.

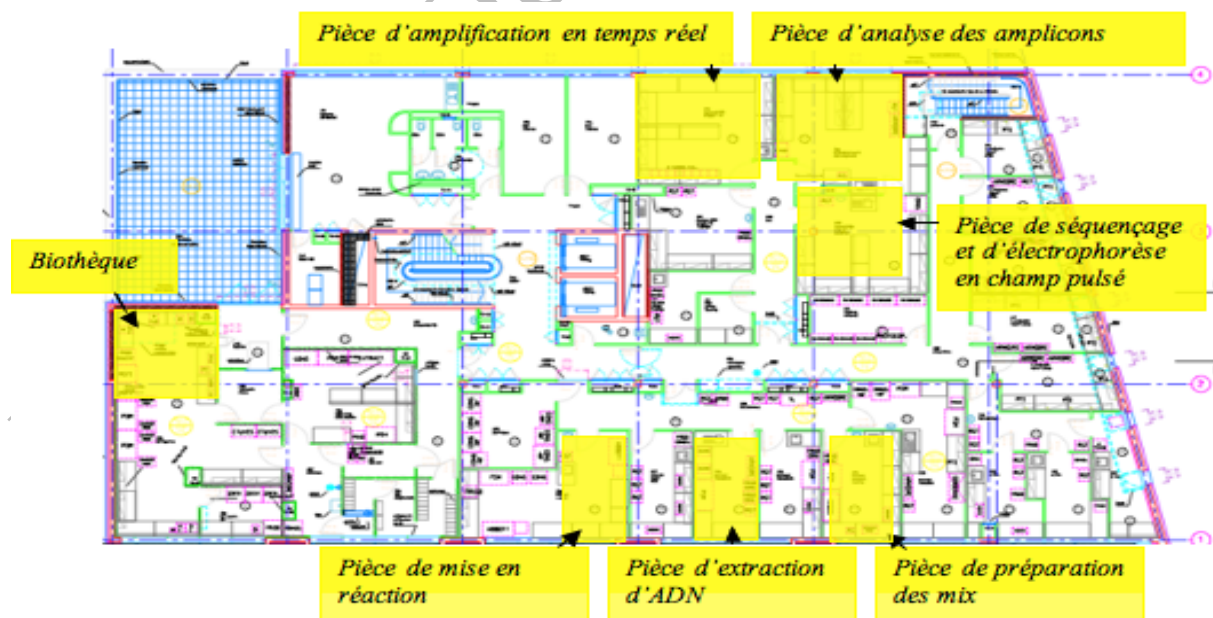
Rez-de-chaussée : secteur sérologie automatisée et manuelle, sérothèque, souchothèque

La souchothèque et les tiques sont conservées à -80°C, la sérothèque est conservée à -30°C. Elles sont situées dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif

1^{er} étage - secteur de culture :



2^{ème} étage - secteur biologie moléculaire :



Les différents secteurs de biologie moléculaire (préparation des mix, extraction, mise en réaction, amplification, analyse des amplicons) sont séparés les uns des autres par des sas en dépression ou en surpression selon l'activité. La tenue de protection est changée systématiquement lors du passage d'une zone à l'autre.

La Biothèque à -80°C (échantillons biologiques humains, ADN extraits) est située à cet étage dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif.

Principaux équipements du CNR *Borrelia* :

- ▶ 1 PSM
- ▶ Etuves de culture microbiologique à 30°C, 33°C et à 37°C (avec ou sans enrichissement en CO₂) toutes équipées d'un système d'enregistrement en continu de la température.
- ▶ Microscopes dont un microscope à fond noir (Leica) et un à contraste de phase pour l'observation des *Borrelia* avec système d'enregistrement d'images fixes et mobiles.
- ▶ Loupe binoculaire (Leica) à lumière froide pour la dissection des tiques
- ▶ Réfrigérateurs à +4°C, congélateurs à -30°C (conservation des sérums), à -80°C (conservation des souches bactériennes, des ADN et des tiques) et à -150°C (conservation des souches bactériennes). Une connexion à un système d'alerte centralisé en temps réel 24H/24 est en place.
- ▶ Deux appareils de PCR en temps réel (Roche 480, ABI 7500)
- ▶ Accès à deux automates pour ELISA (BEP III, BEP 2000)
- ▶ Accès à un appareillage pour western-blot (Autoblot, Ingen)
- ▶ Accès à deux extracteurs d'acides nucléiques (Roche, BioMérieux)
- ▶ Accès à un appareil de PCR en temps réel (Roche Light Cycler 2.0)
- ▶ Accès à appareillage d'électrophorèse d'ADN
- ▶ Accès à système d'acquisition d'images (Bio-Rad)
- ▶ Accès à une hotte à produit chimique
- ▶ Accès à un autoclave
- ▶ Accès à une animalerie infectieuse agréée n° A 67 482 37.

1.4 Collections de matériel biologique

La collection de souches du CNR s'élève fin 2017 à 216 souches :

	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. burgdorferi</i>	Autres	Non déterminé	Total
Isolement au CNR (souches humaines)	69	14	9		2	94
Provenance externe (souches variées)	21	18	45	33	5	122

La catégorie « autres » regroupe diverses espèces de :

- *Borrelia* : *B. miyamotoi*, *B. reccurentis*, *B. hermsii* etc.
- et de *Borrelia*, présentant un risque pathogène ou non pour l'Homme :

B. spielmanii, *B. lusitaniae*, *B. turdi*, *B. mayonii*, *B. japonica*, etc.

La sérothèque humaine du CNR s'élève à 5 711 échantillons humains :

1. Sérothèque issues de l'activité du CNR *Borrelia* avec fiches de renseignements Lyme des années précédentes ou étiquetée pour d'autres pathologies (réactions croisées possibles en sérologie de Lyme) : 1 081 sérums
2. Sérothèque « Forestiers » : 441 tubes, transmis par l'ONF (année de collecte : 1996)
3. Sérothèque « DDS » : 344 tubes (donneurs de sang), collection cédée par Biomérieux en 2010
4. Sérothèque « EFS » : 695 tubes (donneurs de sang, année de collecte 2005)
5. Sérothèque « MSA » : 3 150 sérums (collectés dans le ¼ Nord-Est de la France en 2003)

1.5 Démarche qualité du laboratoire

La politique qualité du CNR des *Borrelia* s'inscrit dans le projet global de certification des HUS et d'accréditation du pôle de Biologie et de ce fait dans celle du laboratoire de bactériologie.

Le CNR a choisi d'intégrer la démarche qualité du pôle de Biologie afin de bénéficier des outils et supports mis en place au sein du pôle de biologie.

Au même titre que le chef du pôle de biologie, le Pr Jaulhac s'est engagé, en tant que chef de service, à soutenir la démarche qualité du CNR.

Depuis le 1er novembre 2015, le laboratoire est accrédité par la section Santé Humaine du Comité Français d'Accréditation (COFRAC) selon la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du COFRAC sous le numéro 8-3524.

Le Cofrac a prononcé le maintien et l'extension de l'accréditation de notre laboratoire suite à l'évaluation de surveillance S2 et d'extension en date du 20.02.2018.

Les activités couvertes par cette accréditation relèvent de différentes spécialités (cf www.cofrac.fr).

Afin de répondre aux exigences de la version 2012 de la norme « NF EN ISO 15189_Laboratoire d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence », le pôle de Biologie a mis en place un système de management de la qualité (SMQ) basé sur l'approche processus.

Les processus du laboratoire sont :

- Le processus de management
- Le processus support
- Le processus de réalisation
 - Processus pré-analytique
 - Processus analytique
 - Processus post-analytique
 - Prestations de conseils

1. Le processus de management :

Les finalités sont de :

- Définir la politique qualité et les objectifs « qualité »

- Décliner la politique et les objectifs en actions
- Surveiller, mesurer et analyser les processus, les prestations et le niveau de satisfaction des clients et des partenaires.

Une cartographie décrit les différents processus du laboratoire et leurs interactions :

La démarche qualité du CNR s'est mise en place progressivement depuis 2012 en parallèle à celle du pôle de biologie. Le CNR a ainsi pu bénéficier des outils mis en place au niveau du pôle de biologie :

1. un logiciel de gestion des événements indésirables (EI) Norméa® par les HUS avec déploiement au pôle de Biologie et au CNR depuis 2014
2. un logiciel de gestion documentaire Norméa® par les HUS avec déploiement prévu au pôle de Biologie fin 2016 puis au CNR en 2017
3. une organisation qualité avec le groupe qualité des laboratoires composé des pilotes et copilotes de processus, des référents spécifiques, des responsables qualité des structures, des cadres de santé et de la cellule qualité du pôle.

Mesure, analyse et amélioration en routine au CNR :

- Réception et enregistrement des envois extérieurs d'échantillons biologiques (sérums,
- LCR, biopsies cutanées en vue de la réalisation de sérologies, PCR spécifiques et culture)
- Rédaction de modes opératoires (MOPE) spécifiques de l'activité du CNR (37 MOPE)
- Traçabilité de la gestion du matériel et des réactifs utilisés dans le cadre des activités du CNR (suivi des enceintes thermostatées utilisées pour le stockage des réactifs et des échantillons en continu *via* un système centralisé; suivi des équipements *via* un logiciel de Gestion des Mainténances Assistée par Ordinateur ou GMAO ; gestion des réactifs et consommables par lot et par arrivage)
- Mise en place de fiches de non conformités et traitement de ces non conformités, avec acquisition du logiciel Norméa depuis 2014
- Suivi des contrôles internes de qualité (CIQ) en sérologie et en biologie moléculaire.
 - des CIQ sont intégrés à chaque série d'analyse de sérologie :
 - après une qualification réalisée sur une période probatoire. Elle permet de définir la moyenne et l'écart-type acceptable pour chaque CIQ. Les résultats des différents CIQ sont saisis dans des tables de calculs permettant la réalisation de courbes de suivi (diagrammes de Levey Jennings). L'exploitation des résultats est réalisée à chaque série d'analyse en suivant les règles définies par Westgard.
 - une conduite à tenir a été établie en cas de dérive des CIQ. Elle est détaillée dans le mode opératoire BACT-M2-MOPE-002, intégré au système de management de la qualité (SMQ) du laboratoire.
 - des CIQ (témoins positif et négatif d'amplification et d'extraction) sont intégrés à chaque série d'analyse de biologie moléculaire.
- Participation du CNR aux programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) :
 - de Labquality® et de Probioqual® pour la sérologie de Lyme

En 2017, nous avons obtenus 100 % de conformité pour l'ensemble des contrôles de qualité réalisés

- de QCMD®, un EEQ européen de PCR *Borrelia*

En 2017, le CNR *Borrelia* a participé au Contrôle Européen de Qualité pour la détection de différentes espèces de *Borrelia* par amplification génique.

Sur l'ensemble des 10 extraits fournis contenant de l'ADN de *Borrelia*, de *Treponema* et deux négatifs, tous les résultats fournis par le CNR ont été conformes.

2. Processus support :

La finalité est de :

- fournir les ressources nécessaires aux processus de réalisation.

Ressources humaines :

- Les fiches d'habilitation et de maintien d'habilitation ont été mises à jour en 2017.

Maîtrise des achats :

Les achats et/ou mises à disposition sont effectués par l'intermédiaire des services concernés des HUS, à savoir :

- La Direction des Equipements (DE) pour les équipements mobiliers et biomédicaux ainsi que les achats de consommables médicaux,
 - La Direction des Achats et de la Logistique (DAL) pour les fournitures de bureau, les travaux d'imprimerie, etc.,
 - Le Centre de Ressources Informatiques Hospitalières (CRIH) : pour le matériel informatique. Ces services se conforment aux obligations réglementaires du code des marchés publics.
- La sélection des fournisseurs est réalisée conjointement avec les services supports selon les critères prédéfinis.
 - La gestion des stocks et la vérification des dates de péremption sont assurées par le personnel technique.
 - L'évaluation des fournisseurs critiques est réalisée chaque année par le personnel du CNR.

Maîtrise des équipements :

Les enceintes thermostatées du CNR ont été cartographiées en 2017.

Hygiène et sécurité :

La liste des réactifs dangereux établie en 2012 a été mise à jour en 2017.

Maîtrise des documents et de l'information :

- La mise à jour des modes opératoires se poursuit.
- La validation des systèmes informatiques a été poursuivie en 2017 par le CRIH (Centre Régional Informatique Hospitalière)

3. Processus de réalisation :

La finalité est de :

- contrôler la qualité des différentes activités du laboratoire : accueil du patient, pré-analytique, analytique, post-analytique et prestations de conseils ; ils permettent de satisfaire aux attentes des clients et des partenaires

- Accueil et prise en charge du patient :

Le CNR ne reçoit pas de patient. Il travaille avec des réseaux de médecins prescripteurs.

- Processus pré-analytique :

Amélioration des procédures de réception, d'enregistrement et d'envoi des échantillons biologiques: réception et saisie informatique en temps réel d'un échantillon biologique pour analyse par culture et PCR, vérification de la saisie, procédure d'envoi de kits de prélèvement de biopsie cutanée pour analyse par culture, conditionnement pour envoi d'ADN, protocole de prélèvement pour recherche par PCR.

- Poursuite de la rédaction et réactualisation des modes opératoires pré-analytiques (cf : liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*).
- Mise en place de l'édition d'un accusé de réception automatique quotidien des examens demandés au CNR en 2017 (via courrier de confirmation de réception : traçabilité, réponse préliminaire au prescripteur).

- Processus analytique :

Finalisation du dossier de validation de méthode de la détection des IgG et IgM spécifiques dirigés contre *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans le sérum afin de répondre aux exigences de la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189.

- Processus post-analytique :

La validation des résultats est réalisée par les biologistes après analyse des résultats des différents CIQ.

- Prestation de conseil :

Le CNR des *Borrelia* est particulièrement impliqué dans le conseil donné aux cliniciens et aux patients en ce qui concerne les modalités de prélèvement et d'envoi d'échantillons biologiques, le choix des techniques à réaliser en fonction du contexte clinique et l'interprétation des résultats (cf. 5.3.1).

1.6 Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS

Le contexte épidémiologique de la borréliose de Lyme est moins propice à la notion d'alerte épidémiologique que pour d'autres pathogènes bactériens ou viraux. Le nombre de cas de borréliose peut varier progressivement par suite d'un contact accru de la population avec les tiques, par suite d'une augmentation du nombre de tiques ou par suite de l'augmentation de leur taux d'infection. La surveillance habituelle est donc généralement suffisante.

Néanmoins, en effectuant une surveillance vectorielle et humaine annuelle dans certaines régions, le CNR est à même de détecter et de faire remonter à l'INVS toute augmentation anormale du nombre de cas observés ou qui seraient signalés au CNR par les ARS par exemple, ou toute survenue d'une pathologie non usuelle qui pourrait apparaître comme liée à une infection par *Borrelia* ou *Borrelia*.

Dans de tels contextes, le CNR transmettra sans délai ces informations à Santé publique France et vérifiera la réalité des données biologiques et des critères de définition des cas remontés au CNR.

Cette alerte couvre potentiellement :

- une augmentation rapide anormale du nombre de cas de borréliose de Lyme, observés par le CNR ou qui lui seraient signalés par des cliniciens du territoire français ou par les ARS par exemple
- la survenue d'une nouvelle forme clinique ou d'une forme clinique rare de borréliose de Lyme. Ainsi, le CNR a fait état durant son mandat précédent et publié un cas d'endocardite de Lyme et un cas d'atteinte articulaire du gros orteil
- une augmentation de la fréquence de détection dans *Ixodes ricinus* d'un agent pathogène rare peu isolé jusqu'à présent, tel que *B. miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, identifiés actuellement dans 2 % environ des tiques
- la détection dans *Ixodes ricinus* d'un agent pathogène non isolé jusqu'à présent, tel que :
 - * une autre espèce de *Borrelia* agent de fièvres récurrentes
 - * *B. mayonii*, non encore détecté en Europe mais présent dans quelques états des USA. Notre méthode PCR pour *Borrelia* couvre sa recherche systématique
- une augmentation de la détection des cas humains d'anaplasmose. Ce pathogène ne fait pas partie des *Borrelia-Borrelia* mais il est transmis à l'Homme par *Ixodes ricinus* et son importance clinique est indéniable et la fréquence de ces manifestations cliniques non exceptionnelle, au moins dans le Grand-Est de la France.

En outre, pendant ce mandat, le CNR a été confronté à des signalements effectués auprès de l'ANSP à la suite de constats de pratiques de laboratoires inappropriées. L'INVS et la DGS en ont alors été rapidement informés par le CNR *Borrelia*.

Le signalement de ces alertes se fera par mail et appel téléphonique au département maladies infectieuses de Santé publique France

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1. Liste des techniques disponibles pour le diagnostic et l'identification

* *Techniques de recherche directe des Borrelia (agents de fièvre récurrentes) :*

- **Examen microscopique** : après coloration de Giemsa
- **Culture** à partir du sang ou de tiques disséquées en milieu liquide BSK
- **Inoculation à l'animal** (souris) de sang infecté au sein d'une animalerie agréée
- **Amplification génique in vitro** :

- PCR en point final du genre *Borrelia* avec séquençage du produit amplifié pour identification de l'espèce. Cibles : gènes chromosomiques de l'ADNr 16 S et de la flagelline (Brahim H, EID, 2005 et Assous MV, CMI, 2009).
- PCR en temps réel et sonde Taqman® ciblant une région conservée de l'ADNr 16S du genre *Borrelia* (Hovius, JR, 2013). Un séquençage du produit amplifié est ensuite réalisé pour identification de l'espèce. Cette PCR détecte notamment *B. miyamotoi*
- Développement en 2017 d'une nouvelle technique PCR par double PCR en point final pour l'identification des espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes (cf 2.1.1) plus précise sur les espèces *B. crocidurae* et *B. hispanica*.

* *Techniques de recherche directe des Borreliella (agents de la borréliose de Lyme) :*

Culture :

- Culture en milieu liquide BSK-H à partir d'échantillons biologiques humains ou de tiques.
- Culture en milieu BSK-H modifié, optimisé pour la culture de *B. afzelii* et *B. garinii*.
- Culture de souches sur milieu solide, méthode mise au point par le laboratoire (but : production de souches clonales).

Amplification génique in vitro :

- Plusieurs PCR en temps réel et sondes TaqMan® sur prélèvements biologiques humains ou de tiques pour la détection de l'ensemble des espèces connues en 2017 de *Borreliella*. Deux cibles sont disponibles en PCR temps réel : gène chromosomique de la flagelline et gène *hbb*.
- PCR en temps réel et sonde TaqMan sur prélèvements biologiques pour recherche d'*Anaplasma phagocytophilum*, autre pathogène transmis par *I. ricinus*, (cible : gène *msp2* codant la protéine de surface p44).
- PCR universelle sur le gène de l'ADNr 16 S pour rechercher d'autres pathogènes transmis par les tiques.

* *Techniques sérologiques Borreliella :*

- Sérologie ELISA IgG et IgM séparés (Enzygnost VlsE Siemens®) pour la réalisation de sérologie sanguine, de sérologie sur LCR et pour la recherche d'une synthèse intrathécale spécifique anti *Borreliella*.
- Sérologies de confirmation par technique d'immuno-empreinte « maison » et commerciale sur sérum et/ou LCR des résultats positifs ou douteux lors du dépistage, pour étude des anticorps anti *Borreliella*.

2.1.2. Liste des techniques disponibles pour le typage

- Typage direct sur prélèvements ou sur culture par sondes fluorescentes spécifiques des principales espèces de *Borreliella* : 12 sondes actuellement disponibles pour identifier *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii* et

B. lusitaniae ainsi que pour *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. tanuki*, *B. turdi* et pour *B. mayonii*.

- Identification au rang d'espèce direct sur prélèvements ou sur culture par PCR puis séquençage pour les résultats atypiques obtenus avec la méthode précédente et pour les *Borrelia* des fièvres récurrentes
- Technique de typage des *Borrelia* par MSLT (cf 2.1.2) : technique de PCR nichée basée sur l'étude de 8 loci (méthode adaptée de Margos et al., 2008).

2.1.3. Autres techniques disponibles : techniques d'étude de *Borrelia* et *Borrelia* in vivo :

(Réalisées au sein d'une animalerie infectieuse agréée)

- Inoculation à l'animal (souris C3H et rats Lewis) sensibles à l'infection par différentes espèces de *Borrelia*.
- Inoculation à l'animal (souris BalB/C) sensibles à l'infection par *Borrelia crocidurae*
- Lignée de tiques *Ornithodoros* pour étude des *Borrelia* agents de fièvre récurrentes.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

- Techniques de culture : utiliser le milieu BSK-H (Sigma)
- Technique PCR *Borrelia* : PCR en temps réel et sonde TaqMan® (gène *fla*) détectant l'ensemble des espèces de *Borrelia* connues (méthode du CNR, transférable sur demande)
- Techniques d'immuno-empreinte : cf évaluation sur le site du CNR des kits disponibles sur le marché français : www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia

2.3 Liste des critères utilisés pour l'analyse des fiches de renseignements

2.3.1 Critères de l'ESGBOR

TABLE 1. Summary of clinical case definitions for Lyme borreliosis

Term	Clinical case definition	Laboratory evidence: essential	Laboratory/clinical evidence: supporting
Erythema migrans	Expanding red or bluish-red patch (≥ 5 cm in diameter) ^a , with or without central clearing. Advancing edge typically distinct, often intensely coloured, not markedly elevated.	None	Detection of <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy.
Borrelial lymphocytoma (rare)	Painless bluish-red nodule or plaque, usually on ear lobe, ear helix, nipple or scrotum; more frequent in children (especially on ear) than in adults.	Seroconversion or positive serology ^b Histology in unclear cases	Histology. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy. Recent or concomitant EM.
Acrodermatitis chronica atrophicans	Long-standing red or bluish-red lesions, usually on the extensor surfaces of extremities. Initial doughy swelling. Lesions eventually become atrophic. Possible skin induration and fibroid nodules over bony prominences.	High level of specific serum IgG antibodies	Histology. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy.
Lyme neuroborreliosis	In adults mainly meningo-radicularitis, meningitis; rarely encephalitis, myelitis; very rarely cerebral vasculitis. In children mainly meningitis and facial palsy.	Pleocytosis and demonstration of intrathecal specific antibody synthesis ^c	Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from CSF. Intrathecal synthesis of total IgM, and/or IgG and/or IgA. Specific serum antibodies. Recent or concomitant EM.
Lyme arthritis	Recurrent attacks or persisting objective joint swelling in one or a few large joints. Alternative explanations must be excluded.	Specific serum IgG antibodies, usually in high concentrations	Synovial fluid analysis. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by PCR and/or culture from synovial fluid and/or tissue.
Lyme carditis (rare)	Acute onset of atrio-ventricular (I–III) conduction disturbances, rhythm disturbances, sometimes myocarditis or pancarditis. Alternative explanations must be excluded	Specific serum antibodies	Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from endomyocardial biopsy. Recent or concomitant erythema migrans and/or neurologic disorders.
Ocular manifestations (rare)	Conjunctivitis, uveitis, papillitis, episcleritis, keratitis.	Specific serum antibodies	Recent or concomitant Lyme borreliosis manifestations. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from ocular fluid.

^aIf < 5 cm in diameter a history of tick-bite, a delay in appearance (after the tick bite) of at least 2 days and an expanding rash at the site of the tick-bite is required.

^bas a rule, initial and follow up samples have to be tested in parallel in order to avoid changes by inter-assay variation.

^cIn early cases intrathecally produced specific antibodies may still be absent.

2.3.2 Les différents cas recensés par le CNR ont été classés par type d'atteinte d'après les critères ci-dessous (développés à partir du tableau de définition de cas de l'ESGBOR) :

Erythème migrant (EM) :

- *EM certain* : EM ≥ 5 cm et constaté par un médecin
- *EM possible* : description d'une lésion cutanée atypique attribué par le médecin à une infection par *Borrelia*
- *EM improbable* : EM non constaté par un médecin avec une description clinique incertaine

Lymphocytome borrelien (LB) :

- *LB certain* : LB dans une ou plusieurs zone(s) froide(s) de la peau (lobe/hélix de l'oreille, mamelon, scrotum) accompagné d'une sérologie positive.

Acrodermatite chronique atrophique (ACA) :

- *ACA certaine* : ACA diagnostiquée par un médecin, accompagnée d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum
- *ACA possible* :
 - o ACA diagnostiquée par un médecin mais sérologie non réalisée

- Renseignement cliniques insuffisants accompagnés d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum et d'une PCR positive sur biopsie cutanée
- *ACA indéfinissable* : absence de données cliniques accompagné d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum

Neuroborréliose (NB) :

- *NB certaine* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR (liquide céphalorachidien) + SIT > 2 (synthèse intrathécale)
- *NB probable* :
 - Clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR + $1.7 \leq \text{SIT} \leq 2$
 - Clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR + SIT non réalisée
- *NB possible* :
 - Clinique inadéquate avec les critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR + SIT > 2
 - Clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR ± pléiocytose dans le LCR + sérologie dans le LCR très positive + SIT non réalisée
- *NB peu probable* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + SIT < 1.5
- *NB improbable* :
 - Clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR mais sérologie dans le LCR négative
 - LCR envoyé dans le cadre d'une suspicion de neuroborréliose (clinique inconnue ou en inéquation avec les critères de l'ESGBOR) mais sérologie dans le LCR négative
- *NB indéfinissable* : clinique en inéquation avec les critères de l'ESGBOR ± pléiocytose dans le LCR + sérologie dans le LCR et/ou SIT non réalisée(s)

Arthrite de Lyme (ART) :

- *ART certaine* : mono-arthrite d'une grosse articulation (principalement du genou) accompagnée d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum
- *ART possible* : clinique « douteuse » (renseignements cliniques insuffisantes ou inadéquats) accompagnée d'une sérologie positive en IgG
- *ART improbable* :
 - Mono-arthrite d'une grosse articulation accompagnée d'une sérologie (IgG) négative ou faiblement positive
 - Manifestation(s) articulaire(s) autre(s) que mono-arthrite d'une grosse articulation ± sérologie positive en IgG (NB : sont classés dans cette catégorie des manifestations articulaires autres que mono-arthrite (polyarthrite) avec des sérologies parfois très positives)
- *ART indéfinissable* :
 - Mono-arthrite d'une grosse articulation sans sérologie réalisée
 - Manifestation articulaire de type non renseigné accompagnée d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum

Atteinte cardiaque (CARD) :

- *CARD certaine* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR accompagnée d'une sérologie positive
- *CARD possible* : clinique douteuse accompagnée d'une sérologie positive
- *CARD improbable* : clinique en inéquation avec les critères de l'ESGBOR ± sérologie positive

Manifestations oculaires (OCC) :

- *OCC certaine* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR accompagnée d'une sérologie positive
- *OCC possible* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR accompagnée d'une sérologie faiblement positive
- *OCC improbable* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR accompagnée d'une sérologie négative

DONNEES DU CNR BORRELLIA