Sommaire

Table des illustrations ***5***

Introduction ***7***

L'agent pathogène : Borrelia burgdorferi sensu lato ***9***

I. Taxonomie **9**

II. Morphologie **14**

III. Structure **14**

1. **La couche amorphe** **14**
2. **L'enveloppe externe** **15**
3. **L'appareil locomoteur** **15**
4. **Le cylindre protoplasmique** **15**

IV. Culture et métabolisme **16**

V. Génétique **18**

VI. Pathogénie **20**

1. **Structure antigénique** **20**
2. **Pouvoir pathogène expérimental** **22**
3. **Pouvoir pathogène naturel** **24**
   - *a. La colonisation du vecteur* *24*
   - *b. Le passage du vecteur à l'hôte* *25*
   - *c. La colonisation de l'hôte* *26*
   - *d. L'échappement à la réponse immunitaire* *27*
   - *e. Les mécanismes auto-immuns ?* *29*
   - *f. Le pouvoir toxique* *30*

Epidémiologie de la maladie de Lyme ***31***

I. Epidémiologie descriptive **31**

1. **Espèces affectées** **31**
2. **Répartition géographique** **31**
3. **Importance** **32**
   - *a. Chez l'homme* *32*
   - *b. Chez les bovins* *34*

4. Variation saisonnière **34**

II. Epidémiologie analytique **35**

1. Les modes de transmission **35**
a. Transmission vectorielle par les tiques dures *35*
b. Transmission vectorielle par les insectes *36*
c. Transmission directe *37*
2. Biologie d'Ixodes ricinus, principal vecteur d'Europe de l'Ouest **37**
a. Morphologie *37*
b. Habitat *37*
c. Cycle de développement *39*
d. Activité saisonnière *41*
e. Contamination de la tique par Borrelia burgdorferi *41*
3. Les réservoirs **42**
4. Les facteurs de risques **43**

Aspects cliniques de la borréliose de Lyme ***45***

I. Tableau clinique chez l'homme **45**

1. Observations sur cette symptomatologie très polymorphe **45**
2. Les manifestations cutanées **46**
a. Erythema chronicum migrans (ECM) *46*
b. Lymphome cutané bénin *46*
c. Acrodermatitis chronica atrophians (ACA ou syndrome de Pick-Herxheimer) *46*
3. Les signes généraux **47**
4. Les signes neurologiques **48**
5. Les complications articulaires **49**
6. Les complications cardiaques **49**
7. Les autres signes **50**
8. Le syndrome Post-Lyme (SPL) **50**

II. Tableau clinique chez les bovins **51**

1. Première observation **51**
2. Les symptômes généraux **51**
3. Les signes articulaires **51**
4. Les signes d'une maladie polysystémique **52**

III. Traitement **54**

1. Chez l'homme **54**
a. Antibiotiques utilisés *54*
b. Choix du traitement *55*
c. Thérapeutique adjuvante *56*
2. Chez les bovins **56**

IV. Prévention **57**

1. Prophylaxie sanitaire **57**
a. Informer *57*
b. Lutter contre les vecteurs *57*
c. L'inspection visuelle associée au retrait des tiques *58*
2. Prophylaxie médicale **58**

Diagnostic ***61***

I. Méthodes biologiques et histologiques non spécifiques **61**

1. Analyses sanguines **61**
2. Analyses du liquide céphalorachidien **61**
3. Analyses du liquide synovial **62**
4. Histologie **62**

II. Méthodes spécifiques **62**

1. Examen direct **62**
2. Culture **63**
3. Amplification génique **64**
4. Sérologie **64**

III. Diagnostic différentiel **68**

IV. Diagnostic chez les bovins **68**

Partie expérimentale ***71***

I. Matériel et méthode **71**

1. Origine des sérums **71**
2. La technique d'immunofluorescence indirecte **72**
a. Matériel et réactifs *72*
b. *Protocole* *72*
3. La technique de western blot **73**
a. Matériel et réactifs *73*
b. Protocole *74*

II. Résultats **75**

1. Les motifs de consultation **75**
2. Les résultats sérologiques **75**
a. L'IFI *75*
b. Le western blot *77*

III. Discussion **79**

1. Sur la méthodologie **79**

2. Sur les résultats **81**

Conclusion **85**

Bibliographie ***87***

Annexes ***97***

Table des illustrations

Figure 1 : Arbre phylogénique des Spirochétales 9
Figure 2 : Morphologie d'un Spirochète 14
Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe transversale de Spirochète 14
Figure 4 : Organisation structurelle de *Borrelia burgdorferi* 16
Figure 5 : Cartes physiques des chromosomes des principaux agents de la borréliose de Lyme 19
Figure 6 : Mécanismes de défense des de l'organisme mis en jeu lors d'infection par les spirochètes 23
Figure 7 : Expression des protéines de surface de *Borrelia burgdorferi* lors de l'infection de l'hôte 26
Figure 8 : Mécanisme de variation antigénique des protéines VlsE 28
Figure 9 : Répartition mondiale des zones où la borréliose de Lyme est endémique 32
Figure 10 : Incidence régionale annuelle de la maladie de Lyme (en cas pour 100.000 habitants par an) sur la période 1999-2000) 33
Figure 11 : Distribution mensuelle des cas de maladie de Lyme en Alsace entre mars 2001 et février 2003 35
Figure 12 : Tique (*Ixodes ricinus*) en microscopie à balayage 36
Figure 13 : De gauche à droite :femelle adulte, mâle adulte, nymphe et larve d'*Ixodes dammini* 39
Figure 14 : Cycle d'*Ixodes ricinus* 40
Figure 15 : Cycle de propagation des Spirochètes 42
Figure 16 : Erythème migrant 47
Figure 17 : Lymphome cutané bénin 47
Figure 18 : Acrodermatite chronique atrophiante 47
Figure 19 : Arthrite de Lyme chez un veau 53
Figure 20 : Arthrite avec hypertrophie du tarse 53
Figure 21 : Œdème du pâturon 53
Figure 22 : Lésions croûteuses à l'extrémité des trayons 53
Figure 23 : Le crochet Tire-tic® 58
Figure 24 : *Borrelia burgdorferi* observée en microscopie à fond noir (grossissement x800) 63
Figure 25 : *Borrelia burgdorferi* observée au microscope optique après imprégnation argentique (grossissement x600) 63
Figure 26 : *Borrelia burgdorferi* observée en immunofluorescence (grossissement x800) 63
Figure 27 : Les barrettes prêtes pour la lecture. 74

Tableau I : Taxonomie des Spirochètes 10
Tableau II : Caractéristiques des espèces du genre *Borrelia* 12
Tableau III : Le complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato* 13
Tableau IV : Les trois stades de la réponse humorale 65
Tableau V : Tests sérologiques utilisés pour le diagnostic de la maladie de Lyme 66
Tableau VI : Les résultats d'IFI 76
Tableau VII : Répartition des titres par symptôme 76
Tableau VIII : Comparaison du tableau clinique supposé des bovins avec celui de l'homme et du chien 82

Introduction

La maladie de Lyme est une zoonose due à un spirochète nommé *Borrelia burgdorferi*.
Son nom provient d'une ville du Connecticut (U.S.A.) : « Lyme », où en 1975, de nombreux cas d'arthrites juvéniles récidivantes précédées de lésions cutanées érythémateuses attirèrent l'attention. Ce syndrome clinique fut baptisé « arthrite de Lyme ».
Déjà en 1904, un médecin suédois, Afzelius, avait décrit cette lésion cutanée caractéristique, en anneau et extensive, qu'il avait nommé *erythema chronicum migrans*. Plus tard, il émit l'hypothèse d'un lien entre cette lésion et la morsure de tique.
Puis la découverte de cas de complications nerveuses, cutanées ou cardiaques poussa les chercheurs à rebaptiser ce syndrome : « maladie de Lyme ».
Dès 1955, une bactérie spirochète fut soupçonnée, car le sérum des malades réagissaient en présence de tréponèmes.
Ce fut seulement en 1980 que Willy Burgdorfer, un entomologiste étudiant les maladies vectorielles transmises par les tiques, découvrit des spirochètes peu colorés qu'il réussit à cultiver. Ces spirochètes portent son nom en son honneur.

En plus de l'homme, cette maladie touche de nombreuses espèces d'animaux domestiques, et est la première maladie à vecteur de l'hémisphère nord.
Sa prévalence élevée (et sans aucun doute sous estimée) ainsi que son tableau clinique très polymorphe (donc de diagnostic difficile) et la gravité des séquelles en font une affection qui suscite un intérêt grandissant dans les pays développés.

À l'heure actuelle, le statut des bovins vis-à-vis de cette maladie reste peu étudié. Il devient important de s'y intéresser de par son influence sur la productivité, le coût engendré ou encore les conséquences cliniques pouvant conduire à une non- valeur économique.

La lutte contre la borréliose de Lyme se heurte à différents problèmes, particulièrement chez les bovins :

- Celui de savoir si le portage entraîne des signes cliniques
- Celui de l'antibiothérapie, longue et coûteuse, qui peut difficilement être mise en place car elle n'est pas rentable économiquement
- Enfin, celui de la vaccination, qui semble porter ses fruits chez l'homme et le chien mais n'est pas encore applicable aux bovins.

Le diagnostic chez l'homme et le chien se fait en deux temps : tout d'abord un test de criblage (comme l'immunofluorescence indirect ou l'ELISA) suivi d'un test de confirmation : le western blot.
Ce deuxième type de test n'existe pas à l'heure actuelle pour les bovins.

Nous nous attacherons dans un premier temps à décrire l'agent causal de la maladie de Lyme : *Borrelia burgdorferi sensu lato*, puis nous nous intéresserons aux aspects épidémiologiques de la maladie. L'étude clinique nous permettra de définir la symptomatologie chez l'homme et les bovins et de nous intéresser aux modalités de

Rapport-Gratuit.com

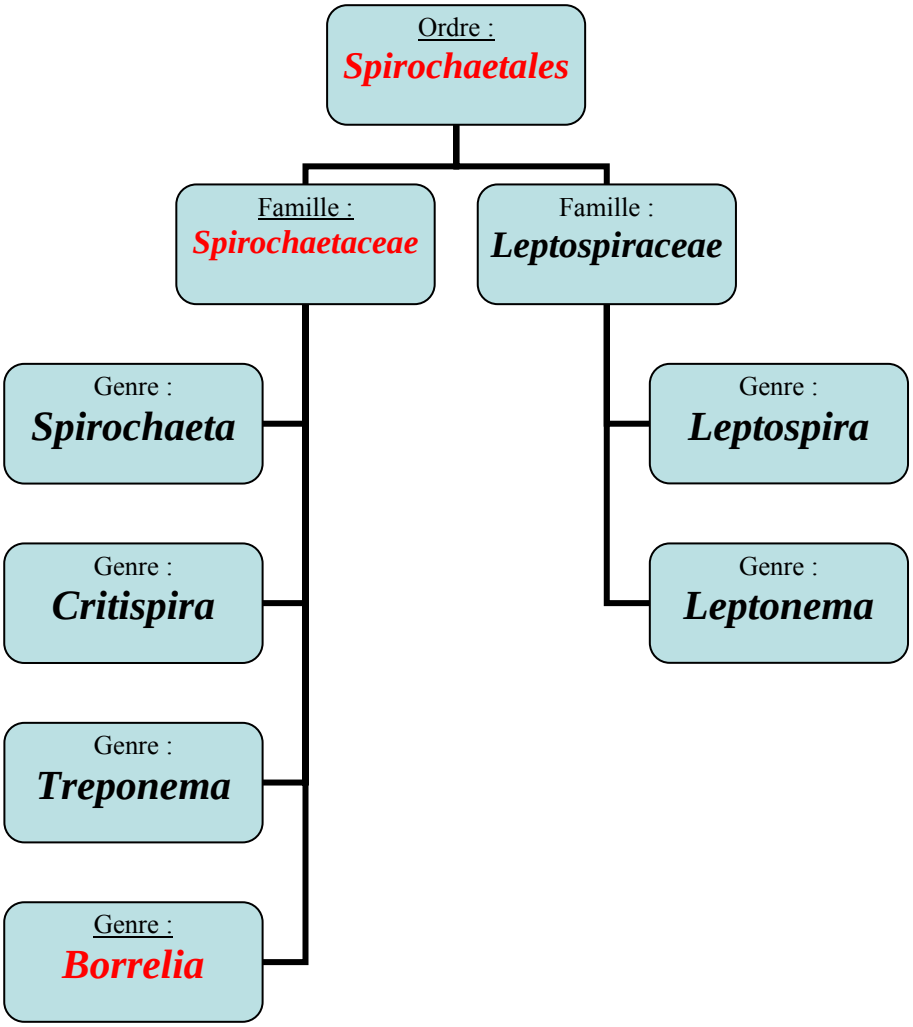
traitement et de prévention utilisables. Enfin, nous aborderons les méthodes diagnostiques disponibles.
La deuxième partie sera consacrée à l'étude sérologique de sérums bovins suspects de maladie de Lyme : on comparera l'immunofluorescence indirecte et le western blot dans le but de pouvoir développer un test de confirmation chez les bovins, si cela est possible.
On cherchera aussi à savoir s'il existe un rapport entre les symptômes et la séropositivité.

L'agent pathogène:
Borrelia Burgdorferi sensu lato

I. **Taxonomie** :

L'agent de la maladie de Lyme est une bactérie du genre *Borrelia*. Elle appartient donc à l'ordre des *Spirochaetales* caractérisé par leur morphologie hélicoïdale et leur organe locomoteur interne. [86]
Les Spirochètes sont divisés en deux familles : les *Spirochaetaceae* et les *Leptospiraceae* ; elles même divisées en 6 genres dont 4 appartiennent à la famille des *Spirochaetaceae* : les genres *Spirochaeta, Critispira, Treponema* et *Borrelia* et deux appartiennent à la famille des *Leptospiraceae* :les genres *Leptospira* et *Leptonema*. [40]

Figure 1 :Arbre phylogénique des *Spirochaetales.*



Seuls trois genres sont pathogènes pour l'homme :les Tréponèmes, les Borrelies et les Leptospires. [86]

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tableau I : Taxonomie des Spirochètes, d'après [10] [37.a.] [86] [87]

ORDRE DES SPIROCHAETALES

Protistes unicellulaires de morphologie hélicoïdale, mobiles, de 0,1-3 µm de diamètre et 5-500 µm de longueur.

La structure externe est constituée d'une enveloppe élastique souple, homologue de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, délimitant le cylindre protoplasmique constitué de l'extérieur vers l'intérieur du feuillet de peptidoglycane associé à la membrane cytoplasmique, du cytoplasme et du matériel nucléaire.

L'appareil locomoteur est constitué de 2 à plus de 100 flagelles périplasmiques compris entre l'enveloppe et le feuillet de peptidoglycane, inséré sur un corpuscule basal à chaque extrémité du cylindre protoplasmique, et cheminant librement en direction de l'autre extrémité. Cela confère aux Spirochètes une motilité dans des milieux liquides de viscosité élevée, ou au contraire sans aucun appui sur le milieu environnant. Les mouvements permis sont de 3 sortes : rotation, translation et flexion.

Enfin, ce sont des bactéries à Gram négatif, chimio-organotrophes et qui peuvent être anaérobies, aéro-anaérobies facultatives, micro-aérophiles ou aérobies.

Leur GC% est compris entre 25 et 65%

Famille des *Spirochætaceæ*

Bactéries de 0,1-3 µm de diamètre, aux extrémités non recourbées en crochets ; anaérobies, aéro-anaérobies facultatives, micro-aérophiles ; l'acide aminé présent dans le peptidoglycane est l'ornithine. Les principaux genres sont les suivants :

Genre *Spirochæta* : Spirochètes libres des boues, pouvant être très longs (500µm), dont l'organe locomoteur s'enroule dans un pas de vis de sens contraire à celui du cylindre protoplasmique.

Genre *Cristispira* : Spirochètes géants de la tige cristalline ou du fluide digestif des mollusques bivalves, possédant un volumineux organe locomoteur constitué de nombreux flagelles.

Genre *Treponema* : Spirochètes saprophytes ou parasites de la bouche, du tractus digestif ou génital de l'Homme et des animaux, d'un diamètre allant de 0,12 à 0,25 µm. L'appareil locomoteur est constitué de plus de deux flagelles enroulés autour du cylindre protoplasmique dans un pas de vis inversé, et se chevauchant d'une extrémité à l'autre, voire pouvant même dépasser l'extrémité de la cellule. *T.pallidum* est l'agent de la syphilis chez l'Homme.

Genre *Serpulina* : Spirochètes apparentés aux Tréponèmes, comprenant l'agent de la dysenterie hémorragique du porc.

Genre *Borrelia* : Spirochètes parasites transmises par des arthropodes vecteurs aux Mammifères et aux Oiseaux, 0,2-0,5 µm de diamètre et 3-20 µm de longueur, elles présentent de 7 à 30 flagelles. Elles comprennent, entre autre, les agents des fièvres récurrentes à tiques et de la maladie de Lyme.

Famille des *Leptospiraceæ*

Bactéries de 0,1 µm de diamètre, aux extrémités recourbées en crochets, aérobies, dont l'acide aminé present dans le peptidoglycane est l'acide diaminopimélique.

Genre *Leptospira* : ne comprend que deux espèces mais subdivisées en de nombreux sérotypes, *L. biflexa* saprophyte des sols humides ou des eaux et *L. interrogans* pathogène pour l'Homme et les animaux. Ce sont de petits Spirochètes difficilement visibles et colorables. Le pas de vis est serré, et l'organe locomoteur est constitué de deux fibrilles rigides rectilignes ou curvilignes dénommées axostyles. L'enveloppe et la paroi sont fragiles et se lysent très rapidement.

Genre *Leptonema* : pas d'agents pathogènes reconnus.

Par ailleurs il est impossible de différencier les plus gros Tréponèmes des plus petites Borrelies. Certains auteurs recommandent même l'assimilation du genre Borrelie au genre Tréponème.

De plus, il existe une relation étroite entre l'espèce d'arthropode vecteur et la souche de *Borrelia* transmise. Ceci a fait naître un concept « un vecteur-une espèce » qui a longtemps prévalu. Mais même si cette règle est souvent vérifiée, on ne peut reconnaître cette adaptation à une seule espèce vecteur comme un critère de différenciation d'espèce.
De même, le pouvoir pathogène pour l'animal et la répartition géographique ne peuvent être considérés comme des critères d'espèces. [86] [103]

Il existe 30 espèces de *Borrelia* actuellement connues. [103]
Parmi elles, une vingtaine sont responsables des fièvres récurrentes et sont transmises par des tiques molles (des genres *Ornithodoros* ou *Argas*) ou par des poux. Ces maladies sont connues depuis l'antiquité : en effet, Hyppocrate les décrivait déjà. (tableau III)
Parallèlement, les 12 autres *Borrelia* sont associées à l'espèce responsable de la maladie de Lyme. En 20 ans la taxonomie de ces dernières a profondément évolué. En effet, depuis la découverte de l'agent, supposé unique, de la maladie de Lyme par Burgdorfer, onze espèces ont pu être identifiées se rapprochant de ce spirochète.

La première souche découverte aux Etats-Unis a donc pris le nom de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* et les autres souches ont été incluses dans un complexe nommé *Borrelia burgdorferi sensu lato*. (tableau IV)

La proximité génomique entre les souche est estimée par le pourcentage d'hybridation des ADN et la stabilité thermique des hybrides (il s'agit de la même espèce si le pourcentage d'homologie est supérieur à 70% et si les ADN conservent leur stabilité à moins de 5°C d'écart). [87]
Les espèces peuvent être distinguées par différentes méthodes :

- La ribotypie
- L'amplification génique utilisant des amorces spécifiques d'espèces
- L'analyse des profils de macrorestriction après électrophorèse en champ pulsé
- L'analyse des gènes codant pour l'ARNr 16S (rrs)
- L'électrophorèse d'enzymes métaboliques
- Ou encore l'amplification génique utilisant des amorces choisies au hasard (AP-PCR). [87]

Seules 4 souches sont reconnues pathogènes pour l'homme : *Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii, Borrelia afzelii* et *Borrelia spielmanii*. En avril 2006, *Borrelia spielmani* a été reconnue comme une espèce appartenant au complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato* et présentant un pouvoir pathogène car elle a été isolée de plusieurs patients souffrants de symptômes cutanés. De plus, on suspecte actuellement *Borrelia valaisiana* et *Borrelia lusitaniae* d'avoir un rôle pathogène en Europe et en Asie. [37.b.]

Tableau II :Caractéristiques des espèces du genre *Borrelia*, d'après [10]

Espèces	Vecteur(s)	Hôtes	Répartition géographique	Maladie associée
B. anserina	*Argas (miniatus, persica, reflexus)*	Nombreux oiseaux	Ubiquiste	Borréliose aviaire
B. brasiliensis	*Ornithodoros brasiliensis*	Rongeurs	Brésil	Fièvre récurrente à tique
B. caucasica	*Ornithodoros verrucosus*	Rongeurs, Homme	Caucase	Fièvre récurrente à tique
B. coriaceae	*Ornithodoros coriaceus*	Bétail, Homme	Etats-Unis	Avortement epizootique bovin
B. crocidurae	*Ornithodoros erraticus*	Rongeurs, Homme	Afrique, Proche-Orient, Asie centrale	Fièvre récurrente à tique
B. dugesii	*Ornithodoros dugesi*	Probablement les rongeurs	Mexique	Fièvre récurrente à tique
B. duttonii	*Ornithodoros moubata*	Homme	Afrique	Fièvre récurrente à tique
B. graingeri	*Ornithodoros graingeri*	Rongeurs, Homme	Afrique de l'ouest	Fièvre récurrente à tique
B. harveyi	*Inconnu*	Singes	Afrique	Fièvre récurrente à tique
B. hermsii	*Ornithodoros hermsi*	Rongeurs, Homme	Ouest des Etats-Unis et Canada	Fièvre récurrente à tique
B. hispanica	*Ornithodoros erraticus*	Rongeurs, Homme	Espagne, Portugal, Maroc, Algérie, Tunisie	Fièvre récurrente à tique
B. latyschewii	*Ornithodoros tartakovskyi*	Rongeurs, reptiles , Homme	Iran, Asie centrale	Fièvre récurrente à tique
B. mazzottii	*Ornithodoros talaje*	Rongeurs, tatous, singes, Homme	Mexique, Guatemala	Fièvre récurrente à tique
B. parkeri	*Ornithodoros parkeri*	Rongeurs, Homme	Ouest des Etat-Unis	Fièvre récurrente à tique
B. persica	*Ornithodoros tholozani*	Rongeurs, chauve-souris, Homme	Moyen-orient, Asie centrale	Fièvre récurrente à tique
B. recurrentis	*Pedicilus humanus*	Homme	Amérique du sud, Europe, Afrique, Asie	Fièvre récurrente à poux
B. theileri	*Rhipicephalus decoloratus, R. evertsi, Boophilus micropus*	Ruminants, chevaux	Afrique du sud, Australie	Borrélioses du bétail et des chevaux
B. tillae	*Ornithodoros zumpti*	Rongeurs	Afrique du sud	
B. turicatae	*Ornithodoros turicatae*	Rongeurs, Homme	Etat-Unis, Mexique	Fièvre récurrente à tique
B. venezuelznsis	*Ornithodoros rudis*	Rongeurs, Homme	Amérique centrale et du sud	Fièvre récurrente à tique

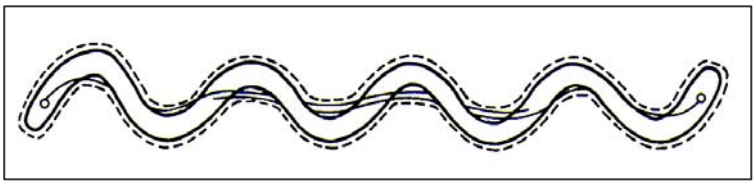
Tableau III : Le complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato*, d'après [29], [40], [77], [87], [103], [117]

	Répartition géographique	Principaux arthropodes vecteurs	Pouvoir pathogène
Borrelia afzelii	Europe, Asie.	*Ixodes persulcatus* (Asie), *Ixodes ricinus* (Europe).	Borreliose de Lyme. *Borrelia afzelii* est l'espèce quasi exclusivement responsable des lésions cutanées tardives de l'acrodermatite chronique atrophiante.
Borrelia andersonii	Amérique du Nord.	*Ixodes dentatus*.	Non pathogène.
Borrelia bissetti	Amérique du Nord.	*Ixodes pacificus*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes spinipalpis*,	Non pathogène.
Borrelia burgdorferi	Europe, U.S.A.	*Ixodes pacificus* (U.S.A.), *Ixodes ricinus* (Europe), *Ixodes scapularis* (U.S.A.), *Ixodes uriae* (Suède).	Borreliose de Lyme. *Borrelia burgdorferi* est principalement, mais non exclusivement, responsable d'arthrites.
Borrelia garinii	Europe, Asie.	*Ixodes persulcatus* (Asie), *Ixodes ricinus* (Europe).	Borreliose de Lyme. *Borrelia garinii* est préférentiellement retrouvée à l'origine des manifestations neurologiques. Cette espèce est la plus fréquente en Europe, où la borreliose de Lyme a surtout une traduction neurologique.
Borrelia japonica	Japon.	*Ixodes ovatus*.	Non pathogène.
Borrelia lusitaniae	Europe, Afrique du Nord.	*Ixodes ricinus*.	Pouvoir pathogène non prouvé (une souche a cependant été isolée d'un patient atteint d'une infection chronique de la peau).
Borrelia sinica	Chine.	*Ixodes ovatus*.	Non pathogène.
Borrelia spielmanii	Europe	*Ixodes ricinus*	Borreliose de Lyme (infections cutanées).
Borrelia tanukii	Japon.	*Ixodes tanuki*.	Non pathogène.
Borrelia turdi	Japon.	*Ixodes turdi*.	Non pathogène.
Borrelia valaisiana	Europe, Chine, Corée, Taiwan, Japon.	*Ixodes columnae* (Asie), *Ixodes nipponensis* (Asie), *Ixodes ricinus* (Europe).	Pouvoir pathogène non prouvé.

II. Morphologie :

Borrelia burgdorferi présente la structure caractéristique des spirochètes à savoir qu'elle est hélicoïdale. (Figure 2)
De plus, c'est une bactérie mince, elle mesure de 4 à 30 µm de longueur et 0,2 à 0, 4 µm de diamètre, et très mobile. [37.a.] [57] [77] [87]
Les spires sont peu serrées (de 4 à 8 tours d'amplitude variant de 1,5 à 4,6 µm) et semblent orientées vers la gauche.
Borrelia Burgdorferi est visible au microscope optique après coloration par l'aniline, par la coloration de Vago ou de Giemsa ou encore par coloration argentique. De plus, elle est visible sans coloration par examen au microscope à contraste de phase ou au microscope à fond noir. [37.a.]

Figure 2 : morphologie d'un Spirochète, d'après [10]



La ligne discontinue représente l'enveloppe externe, la ligne continue délimite le cylindre protoplasmique, les flagelles sont entourés autour du corps cellulaire, avec un corpuscule basal à chaque extrémité.

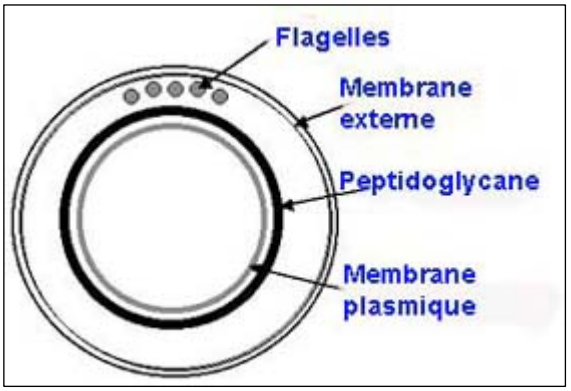
III. Structure :

De l'extérieur vers l'intérieur on trouve (cf. Figure 3) :

1. <u>la couche amorphe :</u>

Elle est constituée d'hydrates de carbone et peut-être éliminée par simple lavage au tampon PBS .
Son origine reste inconnue : elle proviendrait soit de la production bactérienne soit de l'accumulation de substances exogènes. [37.a.]

Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe transversale de Spirochète. [85]



2. l'enveloppe externe :

Sa structure est proche de celle des bactéries à GRAM négatif. Elle est formée de plusieurs couches et peut être isolée après traitement par le dodécyl sulfate de sodium, elle représente alors 16,5 % du poids sec de la bactérie.
Elle est composée de :

- 46 à 50% de protéines
- 33 à 51% de lipides
- 3 à 4% d'hydrates de carbone.

Des protéines majeures ayant un rôle antigénique et immunogène sont associées à l'enveloppe externe. On les appelle Osp (pour Outer Surface Protein), les principales étant OspA et OspB. Mais d'autres présentent un intérêt pour expliquer la pathogénie ou le diagnostic, comme par exemple OspC ou Osp 17. [37.a.]

Des recherches ont été menées pour trouver l'existence d'un lipopolysaccharide (LPS) comme il en existe sur les enveloppes externes des Bactéries Gram négatif et qui est à l'origine des chocs endotoxiniques. Ceci pour expliquer les réactions de Jarish-Herxheimer c'est-à-dire l'exacerbation des symptômes quelques heures après le début du traitement. L'enveloppe externe, si elle est proche de celle des bactérie Gram négatif, ne présente pas de LPS mais une substance proche qualifiée de « LPS like » douée de propriétés biologiques proches des endotoxines. [37.a.]

3. l'appareil locomoteur :

Il est constitué de flagelles, implantés à chaque extrémités du corps de la bactérie sur un corpuscule basal. Ces flagelles cheminent le long de l'axe cellulaire entre le cylindre protoplasmique et l'enveloppe externe en direction de l'extrémité opposée si bien qu'ils se chevauchent au centre de la cellule.

Leur nombre varie de 14 à 22 suivant les souches et les origines géographiques : par exemple les souches à 22 flagelles sont rencontrées aussi bien en Europe qu'en Afrique tandis que les souches à 14 flagelles semblent spécifiques du continent américain et celles à 16 spécifiques de l'Europe.

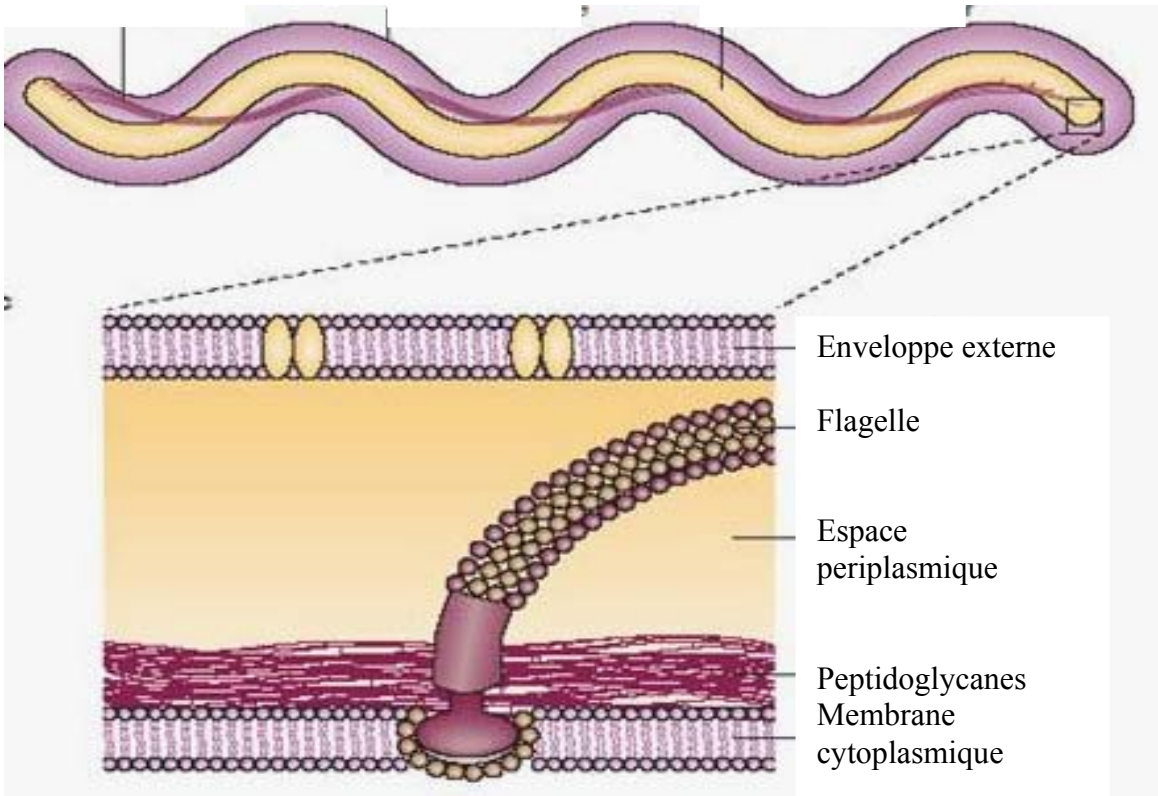
Leur constitution chimique est proche de ceux des autres bactéries mais diffèrent de ceux des tréponèmes par l'absence d'une enveloppe. [37.a.]
Ils résultent de l'assemblage d'un polypeptide de 336 acides aminés et d'un poids moléculaire de 41kD appelé la flagelline (noté p41). Cette protéine a une activité antigénique et immunogénique importante et est commune à toutes les espèces de *Borrelia burgdorferi*.
Ces flagelles réagissent avec l'anticorps monoclonal H6O4 et présentent de nombreuses réactions croisées avec d'autres antigènes ainsi qu'avec des cellules neuronales humaines. [98] [122]

4. le cylindre protoplasmique :

Il est limité par une membrane plasmique, elle-même associée à un peptidoglycane sur sa surface externe qui lui confère une certaine rigidité.

A l'intérieur il est composé du cytoplasme, de l'appareil nucléaire et des plasmides mais contrairement aux tréponèmes, il est dépourvu de microtubules. [37.a.]

Figure 4 : Organisation structurelle de *Borrelia burgdorferi*. [14]



IV. Culture et métabolisme : d'après [37.a.] [57] [77] [86] [87]

On peut rechercher *Borrelia burgdorferi sensu lato* dans la plupart des liquides et des organes cibles (sang, biopsie cutanée, LCR, liquide synovial…) mais du fait du faible taux de bactérie en circulation, les résultats de ces cultures sont souvent négatifs.

Les prélèvements doivent être réalisés de façon stérile et maintenus à 4°C pour être traités ultérieurement ou à -80°C pour le sang s'il y a eu ajout d'un cryoprotecteur .

Les borrelia sont des bactéries micro-aérophiles, elles sont dépourvues de catalase et de peroxydase mais possèdent un superoxyde-dismutase. Leur croissance est favorisée par l'ajout de glucose car elles tirent leur énergie de la fermentation des sucres et notamment par la voie d'EMDEN-MEYERHOFF. Ceci explique l'ajout d'acide pyruvique dans leur milieu de croissance car il active la glycolyse.

On ajoute aussi dans leurs milieux :

- de l'albumine (grâce à du blanc d'œuf coagulé ou à de l'albumine sérique)
- du sérum de lapin pour apporter des acides gras (saturés ou insaturés) à longues chaînes qui sont incorporés sans modification aux lipides cellulaires de la bactérie. En effet, comme tous les spirochètes les B*orrelia* sont riches en lipides qui sont donc des facteurs essentiels à leur culture.

De même le N-acétyl-glucosamine est indispensable aux cultures car il intervient dans la composition du peptidoglycane, par conséquent en son absence la croissance est ralentie de 90%.

Ainsi, les *Borrelia* ont des besoins nutritifs complexes qui rend leur croissance in vitro délicate.

Ce n'est qu'en 1971 que Kelly (cité par [63] et [117]) propose un milieu semi-synthétique permettant la croissance de *Borrelia hermisii*. En 1982, Stoenner (cité par [63] et [117]) y incorpore des extraits de levure et un milieu de culture cellulaire ce qui a permis les premiers isolements de *Borrelia burgdorferi*. Enfin Barbour a augmenté le pouvoir tampon du milieu et rendu la préparation plus facile.
Ceci a donné le BSK II (ou Barbour Stoenner Kelly modifié cf. annexe 1) : il permet la croissance à partir d'une seule bactérie, avec un temps de génération de l'ordre de 6 à 12heures (ce qui correspond à 2.10^7bactéries/ml en 5 à 7 jours).
On peut rendre le milieu plus sélectif en ajoutant des antibiotiques.
Les cultures sont ensuite incubées à 30-33°C, observées et repiquées tous les 5 à 7 jours pendant 2 mois.

L'observation se fait au microscope à fond noir où l'on distingue la forme et la mobilité caractéristiques des *Borrelia*.

Lors des repiquages successifs on observe :

- une perte de pouvoir pathogène
- une modification importante de l'antigénicité des protéines OspA et OspB
- une augmentation du poids moléculaire du complexe « LPS like »
- une perte de plasmides qui entraîne une diminution de la virulence.

Ces cultures, longues et délicates, sont rarement utilisées car inutiles pour le diagnostic.

Rapport-Gratuit.com

V. Génétique :

Le génome de *Borrelia burgdorferi* comporte : un chromosome linéaires et de nombreux plasmides.

C'est Fraser *et al.* [39] qui les premiers ont séquencé et identifié le génome de Borrelia burgdorferi (ce séquençage est accessible sur le site de l'Institut Pasteur). [101]

La particularité des *Borrelia* est de posséder un chromosome linéaire, se comportant comme un chromosome d'eucaryote, et de petite taille (il mesure environ 950kb) correspondant à celle des chromosomes des mycoplasmes (qui ont le plus petit génome des organismes libres connus). [9] [39]

Les plasmides peuvent être circulaires ou également linéaires ; cette structure linéaire simple brin avec les extrémités repliées en épingle à cheveux est une exception parmi les procaryotes mais se retrouve chez certains virus (notamment les poxvirus) ce qui laisse penser à une origine virale pour certains de ces plasmides. [57]

En moyenne, les plasmides sont au nombre de 5 (mais ce nombre varie au cours des repiquages). Certaines souches en portent jusqu'à 21 (soit 620kb dont 9 plasmides linéaires et 12 circulaires) ce qui constitue le plus grand nombre de plasmides connus à ce jour pour une bactérie.[81] Leur taille varie de 5 à 200kb pour les plus grands.

Les profils plasmidiques obtenus à partir de 13 souches révèlent une grande hétérogénéité.

La perte du pouvoir pathogène au cours des cultures parallèlement à celle de plasmides suggère la présence de gènes de virulence sur ces plasmides. [77]

Chez *Borrelia burgdorferi sensu stricto* en particulier, la présence du plasmide linéaire lp25 est obligatoire pour que la souche ait un pouvoir infectieux.

De plus, on peut classer les souches en 3 catégories : hautement infectieuse, peu infectieuse et de pouvoir infectieux intermédiaire. Dans ce cas, la présence du plasmide lp28-1 (qui contient le locus vmp like) semble nécessaire pour que la souche soit hautement infectieuse. En son absence (mais avec la présence du plasmide lp25) la souche aura un pouvoir pathogène intermédiaire. [88]

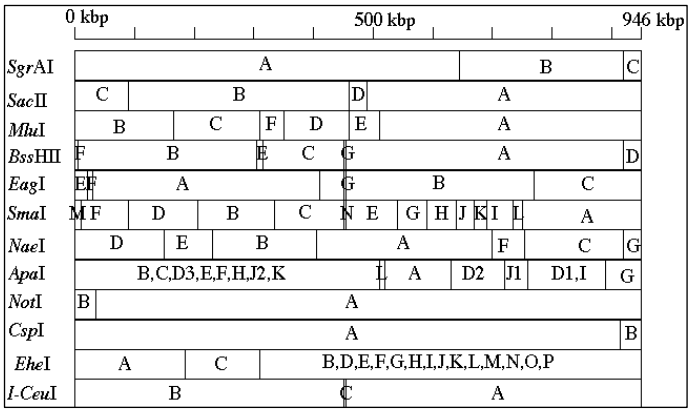
Les gènes codant de nombreuses protéines ont été déjà identifiés : à ce jour, on en dénombre 853 sur le chromosome et 535 codés par les plasmides. [37.a.] [77] [81] [87]

- Les protéines de la membrane externe OspA et OspB sont codées par deux gènes organisés en opéron avec un promoteur commun, localisés sur un plasmide linéaire de 49 à 56kb. La taille de ce plasmide linéaire varie en fonction des espèces génomiques décrite par Baranton *et al.* [7] puisqu'elle est, par exemple de 50kb pour *B. burgdorferi sensu stricto*, de 55kb pour *B. garinii* et de 56kb pour *B. afzelii*.
- Le gène codant la protéine OspC est situé sur un plasmide linéaire de 27kb. La longueur de ce gène varie également suivant l'espèce génomique : elle est respectivement de 630 ,636 ,621 nucléotides pour *B. burgdorferi* ,*B. afzelii* et *B. garinii.*
- Le gène OspD codant la protéine du même nom est situé sur un plasmide linéaire de 38kb ; il n'est présent que dans des souches ayant subi un faible nombre de repiquage.
- OspE et OspF sont codées par des gènes localisés sur un plasmide de 45kb .
- Le gène *fla* codant la flagelline est situé sur le chromosome bactérien.

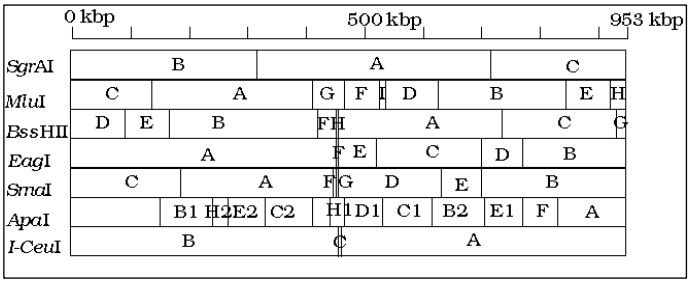
- Les gènes ribosomiaux de *Borrelia burgdorferi* ont une structure originale et particulière : il existe un seul gène rrs codant l'ARN 16S, mais deux copies de chacun des gènes rrl codant l'ARN 23S et rrf codant l'ARN5S. On peut identifier les souches en analysant le profil de restriction enzymatique du produit d'amplification de l'espace intergénique rrf-rrl.
- Des protéines de stress comme les HSP communes à de nombreux agents pathogènes bactériens sont des chaperonines impliquées dans les phénomènes de réparation cellulaire. Ce sont des assemblages de sous unités de 60kDa codées par des gènes situés sur le chromosome bactérien. Ces protéines sont hautement immunogènes mais peu spécifiques. [37.a.] [98] [122]

Les gènes codant pour les lipoprotéines représentent plus de 8% du génome soit 150 gènes ce qui est considérable ; cette variabilité est mise à profit dans les mécanismes d'échappement à la réponse immune et d'adaptation à l'hôte [81]. Par exemple, la variabilité de l'expression des protéines de surface Osp en fonction de la localisation géographique expliquerait le polymorphisme clinique de la maladie en fonction des pays et les difficultés liées au diagnostic et à le prophylaxie vaccinale. [1]
90% des gènes codés par les plasmides n'ont aucun lien avec les gènes portés par les autres *Borrelia*, ce qui laisse penser qu'ils sont impliqués dans les mécanismes d'adaptation spécialisés. [81]

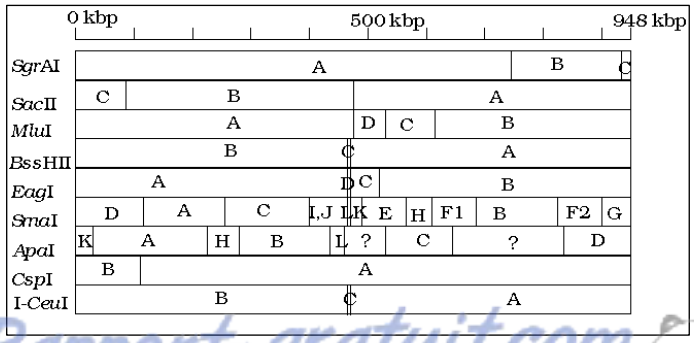
Figure 5 :Cartes physiques des chromosomes des principaux agents de la Borréliose de Lyme.[101]



Borrelia burgdorferi 212



Borrelia garinii 20047



Borrelia afzelii VS461

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

VI. Pathogénie :

1. Structure antigénique

Deux méthodes ont permis la mise en évidence des antigènes de *Borrelia burgdorferi* à savoir :

- l'utilisation d'anticorps monoclonaux fluorescents qui a permis de localiser les déterminants antigéniques
- l'électrophorèse suivie d'un western blot qui a permis de caractériser chaque protéine par son poids moléculaire.

Ainsi on peut observer 80 polypeptides [70] au minimum chez *Borrelia burgdorferi* parmi lesquels certains sont très importants sur le plan antigénique.

La protéine de l'enveloppe externe OspA :

Le poids moléculaire de la protéine OspA varie de 30,5 à 33kDa. Cette protéine, spécifique de *Borrelia burgdorferi*, est reconnue par les anticorps monoclonaux H3TS et H5332.

La variabilité de la réponse de 128 souches exprimant OspA vis-à-vis de 8 anticorps monoclonaux est la base de la classification de Wilske [120] en 7 sérotypes. Cette classification est corrélée avec la classification génomique : le sérotype 1 correspond à *B. burgdorferi*, le sérotype 2 à *B. afzelii* et les sérotypes 3 à 7 à *B. garinii*.

L'analyse des séquences d'OspA permet de montrer que le sérotype 5 provient d'une recombinaison génétique des sérotypes 4 et 6. Ceci est corroboré par les travaux de Barbour qui démontrent que les variations antigéniques sont la conséquences de réarrangements de l'ADN.

De plus ce sérotypage semble correspondre aussi à des découpages (encore plus nets) concernant le potentiel pathogénique et l'organotropisme des souches de *Borrelia burgdorferi*.

Ainsi sur 136 isolats d'Europe et des États-Unis provenant :

- ✓ de tiques
- ✓ de prélèvements de peau humaine
- ✓ de liquides céphalo-rachidiens

il a été montré que le sérotype 1 provient presque exclusivement de peau humaine européenne, le sérotype 6 est plus fréquemment isolé de tiques, les sérotypes 4 et 5 ne sont jamais retrouvés dans des isolats de tiques.

Ce phénomène de variabilité antigénique pourrait expliquer la persistance à long terme des bactéries chez certains patients. (d'après Baranton *et al.* cité par [63])

La protéine OspB :

La protéine OspB est une protéine majeure de surface dont le poids moléculaire est très variable selon l'espèce. Il est de l'ordre de 34kDa. Cette protéine est très spécifique de *Borrelia burgdorferi* mais n'existe pas chez l'espèce génomique *B. garinii*. [7]

Elle réagit selon les souches avec les deux anticorps monoclonaux H6831et H5TS, ou avec l'un des deux, ou encore avec aucun des deux.

Ces deux protéines, OspA et OspB, sont rarement détectées en western blot et seraient très spécifiques seulement au stade tardif de la maladie après 6 mois d'évolution. [7]

La protéine OspC :

C'est une protéine majeure de 20 à 22kDa, très immunogène et présente chez les souches européennes. Elle réagit avec l'anticorps monoclonal L221F8.

L'analyse des séquence du gène OspC ainsi que des séquence protéiques révèle une variabilité antigénique d'une espèce à une autre mais aussi au sein d'une même espèce, en particulier pour *Borrelia garinii*. [121]
L'étude de cette protéine est d'une grande utilité pour le diagnostic biologique car les anticorps anti-OspC apparaissent précocement dans la réponse sérologique contre *Borrelia burgdorferi*.

La protéine OspD :

C'est une protéine majeure de surface de 29kDa. La fonction de cette protéine reste actuellement inconnue. [80]

La protéine OspE :

Cette protéine de surface de 19kDa induit des anticorps qui font partie de la réponse sérologique précoce. [62]

La protéine OspF :

C'est une protéine de surface, de 26kDa, découverte en même temps que l'OspE. [62]

La flagelline :

Cette protéine de 41kDa est spécifique du genre *Borrelia* (contrairement à OspA et OspB qui sont spécifiques d'espèces).
La flagelline induit une réponse immunitaire précoce peu spécifique. Elle réagit avec l'anticorps monoclonal H9724. [7]
Son rôle en sérologie reste cependant limité car elle partage des épitopes avec des polypeptides appartenant à d'autres *Borrelia* et même à des Tréponèmes d'où l'existence de réactions croisées et de fausses sérologies positives. [75]

La protéine p39 :

Cette protéine est appelée ainsi en raison de son poids moléculaire de 39kDa, sa structure est proche de celle de la flagelline mais elles sont immunologiquement différentes.
Elle est très spécifique de *B. burgdorferi* (à la fois chez les souches américaines et européennes) et c'est un marqueur spécifique des stades secondaire et tertiaire de la maladie. [52]

La protéine de 60kDa :

C'est une protéine très immunogène. Elle semble très conservée chez de nombreuses souches de *Borrelia burgdorferi*. Cette protéine appartient à la famille des « Heat Schock Protein » et est commune aux spirochètes et à de nombreuses bactéries (mycobactéries, *Pseudomonas, E.coli*…). [75]

La protéine de 93 kDa :

Elle semble présente et identique chez toutes les souches et réagit avec l'anticorps monoclonal D7. Elle est localisée dans le cylindre protoplasmique et c'est l'un des meilleurs marqueurs de la borréliose de Lyme au stade tertiaire. [118]

Le LPS like :

La substance « LPS like » a été isolée de l'enveloppe externe de *B. burgdorferi* et elle favorise la prolifération monoclonale de lymphocytes B, la production d'immunoglobulines et la libération de l'interleukine 1 (ou IL1, médiateur du système immunitaire et synthétisée par les macrophages) rendu responsable des arthrites caractérisant le stade tertiaire chez l'homme. [44]
Il existe en somme 5 protéines majeures qui participe au pouvoir pathogène de Borrelia burgdorferi : OspA, OspB, OspC, la flagelline et la protéine 60.

La pathogénie a beaucoup été étudiée (essentiellement chez l'homme) mais il reste de nombreuses zones d'ombre, notamment ce qui concerne les formes nerveuses ou encore le passage à la chronicité. On avance que la pathogénie résulterait de mécanismes auto-immuns

(en l'absence d'infection active) ce qui expliquerait la résistance de certaines formes au traitements antibiotiques. Cette hypothèse (ainsi que d'autres telle que la persistance bactérienne ou encore un relargage endogène) reste très controversée. D'autres part, les co-infections peuvent aggraver les lésions et prolonger la maladie. [98]
Chez les animaux, et particulièrement chez les bovins, tout reste à découvrir et on se fonde généralement sur les mécanismes connus chez l'homme pour expliquer les lésions observées. Ainsi la pathogénie reste un grand domaine de recherche à l'heure actuelle.

2. Pouvoir pathogène expérimental :

De nombreuses espèces ont été utilisées car leur sensibilité est variable. Les plus fréquentes sont : le hamster syrien, la souris, le lapin et le singe rhésus mais parfois d'autres espèces ont pu être utilisées comme la gerbille, le cobaye, le chien ou le rat. [13] [37.a.] [86] [98]
Les infections expérimentales se font par inoculation :

- ✓ Intradermique
- ✓ Intraveineuse
- ✓ Intra péritonéale
- ✓ Sous cutanée

de sang ou de broyats d'organes contaminés ou encore par piqûre d'un arthropode infecté.

Le lapin développe, lors d'infection par voie intradermique, une papule érythémateuse entourée d'un bourrelet rouge foncé et contenant des spirochètes (révélés par biopsie).
Le hamster irradié soumis à une infection par des bactéries vivantes présente des arthrites et des signes nerveux, *Borrelia* pouvant être isolé de la synovie.
La souris inoculée exprime des lésions multiples : au cerveau, au cœur, aux poumons, aux reins, au foie, à la rate; rappelant certaines lésions de l'homme. [37.a.]

Les spirochétémies observées sont de très longue durée, avec des pics successifs. De même la longue persistance dans les organes suggère des variations antigéniques importantes de *Borrelia burgdorferi*. [37.a.]
Les travaux *in vitro* [96] ont apporté beaucoup de renseignements sur les tropismes, le chimiotactisme, les sensibilités aux agents chimiques (notamment les cytokines), ou la perte de pathogénie au cours des cultures.

Des études sur la souris ont montré que la susceptibilité à l'arthrite est fonction de l'âge et du génotype: B. burgdorferi inoculé à l'âge de trois jours par voie intrapéritonéale déclenche une arthrite chez les souches C3H/He, SWR, C57BL/6, SJL et BALB/c ; en revanche, si l'inoculation a lieu à 3 semaines, seules C3H et SWR développent une arthrite sévère; enfin à 12 semaines, l'arthrite touchant C3H est moins sévère. Le taux d'anticorps IgG est plus élevé pour les souches sensibles et la dissémination semble plus rapide. [98]
Ces sensibilités variables amènent les auteurs à penser que les lymphocytes T jouent un rôle critique dans la pathogénie des arthrites de Lyme [99], d'autant que les études sur le hamster irradié montrent que la déplétion en lymphocytes CD4+ diminue de manière significative la sévérité de l'arthrite. D'autre part il semble que la ratio Th1/Th2 influe sur le type d'infection et sa sévérité [97] [98]. Une réponse immune de type Th1est prédominante localement au niveau articulaire, le ratio Th1/Th2 étant proportionnel à la sévérité de l'arthrite. Ce sont les cytokines produites par les lymphocytes Th1 qui sont probablement responsable de la pathogénie de l'arthrite.

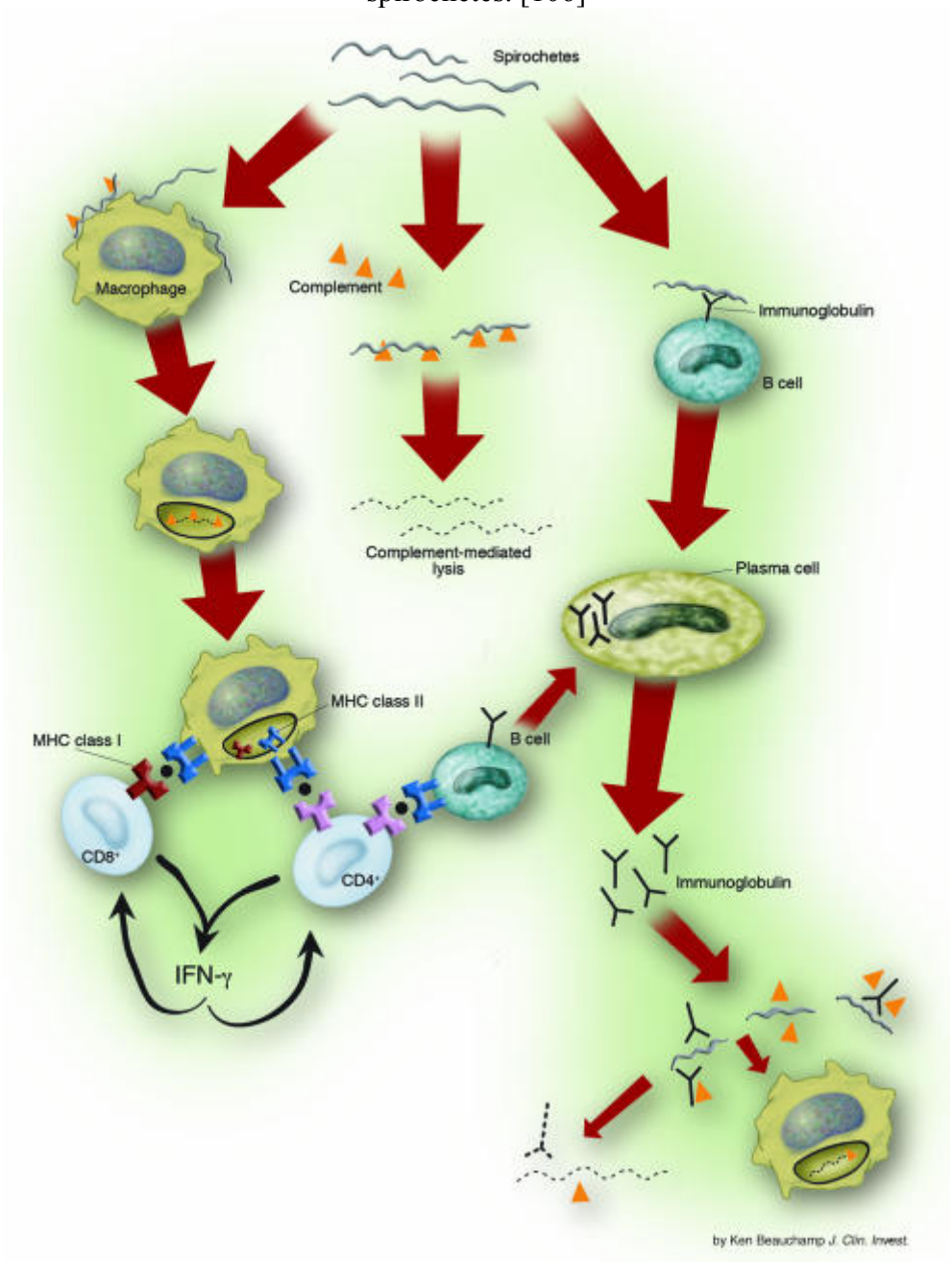
Ce profil Th1/Th2 est induit par différentes molécules, notamment les cytokines IL-12 et certains cofacteurs comme B7-1(CD80) ou B7-2(CD86). D'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, IL1, IL6 ou IL8 sont secrétées en présence de lipoprotéines de *Borrelia burgdorferi*.

Il s'agirait donc d'une réaction LT-proliférative.

Les macrophages jouent également un rôle important en recrutant et en activant les lymphocytes T (Figure6).

Les fibrocytes ont aussi un rôle de présentation des antigènes, de recrutement et d'activation des lymphocytes CD4+, de plus ils se fixent à des tissus cibles (par exemple aux cellules synoviales ou aux endothéliums).

Figure 6 :Mécanisme de défenses de l'organisme mis en jeu lors d'infection par les spirochètes. [106]



Cependant les Spirochètes se logeraient dans des invaginations de membranes, ce qui les protègeraient de la réponse immunitaire. [98] Un mécanisme similaire de mimétisme a été décrit par Dorward et Fischer [35] où les bactéries s'enroulaient avec des fragments de membranes de lymphocytes lysés, ce qui les protègerait des réponses à médiation humorale et cellulaire.

3. Pouvoir pathogène naturel :

Nous allons procéder à son étude de manière chronologique depuis les transformations dans l'intestin de la tique jusqu'à la réponse immunitaire déclenchée chez l'hôte.

a. La colonisation du vecteur :

Les Spirochètes pénètrent dans la tique au cours du repas sanguin, en général 24h après le début du repas sanguin chez les larves et les nymphes. Ce repas dure en moyenne 96h et le nombre de bactéries ne cesse d'augmenter pendant le reste du reste du repas, par entrée continue et par multiplication au sein de l'intestin de la tique. A la fin du repas, elles peuvent être plusieurs centaines. [81]

Borrelia burgdorferi doit à présent survivre dans ce milieu, sans être digérée au cours du repas sanguin, en résistant aux écarts de température au sein de la tique (qui est poïkilotherme) et également aux périodes où la tique ne se nourrit plus et entre en diapause. [81]

Le mécanisme de régulation génétique de l'expression des protéines de surface semble jouer un rôle essentiel dans la survie de la bactérie et sa capacité à infecter l'hôte.

En effet, de nombreuses études ont montré que l'expression d'OspA est très importante *in vitro* ainsi qu'au sein de la tique à jeun et pendant son repas sanguin. [41] Cette protéine est responsable de l'agrégation des bactéries *in vitro* et *in vivo* c'est-à-dire dans l'intestin de la tique. Elle agit comme un ligand avec les cellules digestives de l'intestin de la tique. On peut supposer que cet attachement permet à la bactérie d'échapper à l'endocytose, et donc à la digestion intracellulaire. [3]

D'autre part, OspA se lie au plasminogène ingéré au cours du repas sanguin suivant, ce qui lui permet de traverser la barrière digestive de la tique et de coloniser les glandes salivaires, car cela confère à la bactérie un pouvoir protéolytique extracellulaire. [60] [98]

C'est l'expression d'OspA des bactéries présentes dans l'intestin de la tique qui est exploitée par le vaccin humain contre la maladie de Lyme. En effet, la tique est contaminée au cours d'un premier repas sanguin sur un hôte infecté, puis au cours du second repas sur l'hôte vacciné, les anticorps anti-OspA pénètrent dans l'intestin de la tique et empêchent les *Borrelia* de traverser la paroi intestinale, et donc l'infection de l'hôte via la salive de la tique.

Au sein de l'intestin de la tique, intervient un mécanisme d'adaptation de *Borrelia burgdorferi* par le biais du complément de l'hôte. En effet, des études ont montré que certaines souches *de B. burgdorferi sensu lato* différaient dans leur résistance et leur sensibilité au sérum humain (BRADE et al, cité par [60]). Des études récentes ont montré que la résistance est permise par la liaison de protéines de surface de la bactérie (les protéines Erp dont OspE et OspF) et de 2 protéines de contrôle du complément de l'hôte (factor H-like protein-1/ reconectin et factor H). Cette liaison permet d'empêcher la formation du complexe d'attaque membranaire, et donc la lyse de la cellule. [60] *Borrelia burgdorferi* synthétise

plusieurs protéines Erp, ce qui permet d'avoir une affinité avec le complément d'un grand nombre d'hôtes.

Ce mécanisme est un des nombreux exemples d'échappement à la réponse immune développés par *Borrelia burgdorferi*. Nous en étudierons d'autres par la suite.

D'autre part, le plasmide portant le gène *OspE* est issu du génome d'un bactériophage, ce qui pourrait expliquer une diversification évolutive de *Borrelia burgdorferi* par ce biais.

Enfin, certaines bactéries, sensibles au complément d'une espèce particulière, sont tuées dans l'intestin de la tique ce qui explique une certaine spécificité d'espèce. Par exemple, seule *Borrelia burgdorferi sensu stricto* est résistante (partiellement) au complément issu du sérum bovin, ovin ou équin. De même *B. garinii, B. burgdorferi sensu stricto* et *B. valaisiana* sont les seules résistantes au complément issu de sérum aviaire. (d'après Kraiczy *et al.* cité par [117])

b. Le passage du vecteur à l'hôte :

La bactérie passe de la tique à l'hôte lors du repas sanguin suivant, après avoir colonisé les glandes salivaires.

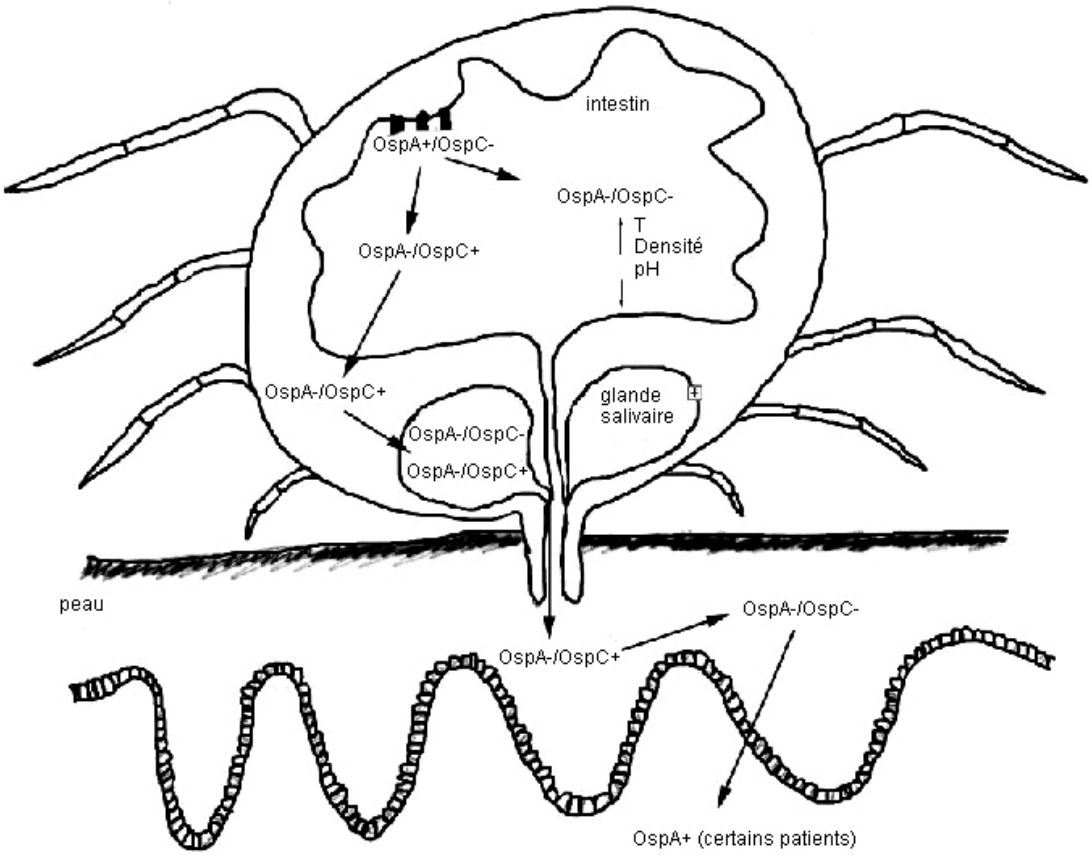
La migration est déclenchée par différents facteurs chimiques (contact du sang de l'hôte) et physique (augmentation de la température de 23 à 37°C due au sang, la baisse du pH au sein de la tique de 7,4 à 6,8, ou encore l'augmentation de densité cellulaire due à la multiplication active de la bactérie pendant le repas sanguin). [8] [41] [81] [87]

Ces facteurs entraînent une diminution de la synthèse d'OspA au profit de celle d'OspC par un mécanisme encore inconnu, ce qui permet aux bactéries de migrer à travers l'épithélium digestif puis via l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires.

Il a été avancé que la diminution de synthèse d'OspA serait lié à la place de l'opéron OspAB sur un plasmide circulaire en continuité des gènes GMP synthétase et l'IMP déshydrogénase, enzymes impliquées dans le métabolisme de la guanine; or l'intestin de la tique est un milieu riche en guanine alors que le milieu de l'hôte ne l'est pas. [98](Figure 7)

Les mécanisme de régulation de l'expression des gènes *in vivo* sont complexes et pour le moment peu connus. Le séquençage du génome a montré étonnamment peu de gènes de régulation déjà connus chez les eubactéries. Les études réalisées sur microréseaux (puces à ADN) n'ont pas montré de preuves significatives de changement dans l'expression des gènes de régulation. On pense que des variations minimes dans la transcription de ces gènes entraînent via une cascade d'activation, une large production de lipoprotéines (par exemple RpoN, une sous-unité sigma régulée par un mécanisme post-transcriptionnel, qui contrôle l'expression de RpoS, qui lui-même régule la transcription de lipoprotéines comme OspC, OspF, Mlp-8 et DbpA).

Figure 7 : Expression des protéines de surface de Borrelia burgdorferi lors de l'infestation de l'hôte d'après [3]



Chez une nymphe, la migration vers les glandes salivaires s'étale sur plusieurs jours avec une concentration maximum de Borrelia dans la salive 72h après le début du repas. On a récemment montré que les extraits de glandes salivaires déclenchaient la migration des Spirochètes par chimiotactisme. [96] Des facteurs chimiques sécrétés au cours de la digestion dans l'intestin de la tique jouent probablement un rôle dans la régulation de l'expression des gènes OspA et OspC.

C'est à partir de ce moment que les spirochètes deviennent infectieux. [87]
Il faut aussi remarquer que la réponse immunitaire de la tique peut influer sur le cycle de *Borrelia burgdorferi* en le favorisant ou en l'inhibant. Chez *Dermacentor variabilis*, on a retrouvé dans l'hémolymphe des peptides antimicrobiens et de fait, il ne peut transmettre la bactérie. [81]

c. Colonisation de l'hôte :

La tique permet l'inoculation des Spirochètes dans le derme de l'hôte et donc leur transmission. La salive de la tique est un milieu privilégié pour *Borrelia burgdorferi* car elle contient des molécules immunomodulatrices [81] [98] responsables de l'inactivation du complément de l'hôte, l'inhibition de la fonction phagocytaire, la diminution de la production locale de cytokines, ce qui supprime la résistance à l'infection et l'inhibition de la

coagulation. Une protéine isolée récemment de la salive d'Ixodes scapularis, nommée Salp-15, a permis de diminuer la réponse des LT CD4+.

A partir de l'inoculation, *Borrelia* reste plusieurs jours dans la peau avant de coloniser les autres organes. Elle se déplace en « nageant » au sein de la matrice extracellulaire, de manière centrifuge, ce qui explique l'apparition de l'érythème chronique migrant. Ces mouvements sont permis par une activité collagénase [117], et surtout par une liaison au plasminogène qui lui confère une activité protéolytique qui agit au niveau de la matrice et lui permet de disséminer au sein des tissus en empêchant l'immobilisation par la fibrine. OspA (ainsi qu'OspB selon certaines études [25]) est identifié comme ligand du plasminogène. [81] [98] Le potentiel d'attachement aux composants de la matrice extracellulaire est très vaste. On a montré *in vitro* que *B. burgdorferi* se lie aux protéoglycanes (héparine, héparane sulfate, dermatane sulfate) mais aussi au collagène (grâce aux décorines), aux glycosaminoglycanes et à la fibronectine. Ces capacités lui permettent également une dissémination par attachement aux cellules et déterminent son tropisme : l'héparane sulfate est présent sur les cellules endothéliales, le dermatane sulfate et l'héparane sulfate sur les cellules gliales, les integrines α II b et β3 la lient aux plaquettes et le dextrane aux globules rouges. [98]

L'adhésion aux cellules sanguines assure le rôle important de la dissémination au sein de l'hôte, qui est très large chez *B. burgdorferi* ; on remarque que les souches non –pathogènes ne se lient pas aux plaquettes.

Ces phénomènes de liaison ont également un rôle dans la persistance de l'infection. En effet, un petit nombre de bactéries (moins de 10) reste au niveau du site de morsure et se multiplie, ce qui entretient l'infection chronique. L'attachement aux molécules de la matrice extracellulaire permettrait de masquer la reconnaissance du Spirochète par le système immunitaire. [81]

d. Echappement à la réponse immunitaire :

Comme nous avons déjà pu le constater, *Borrelia burgdorferi* a développé de nombreux mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire .

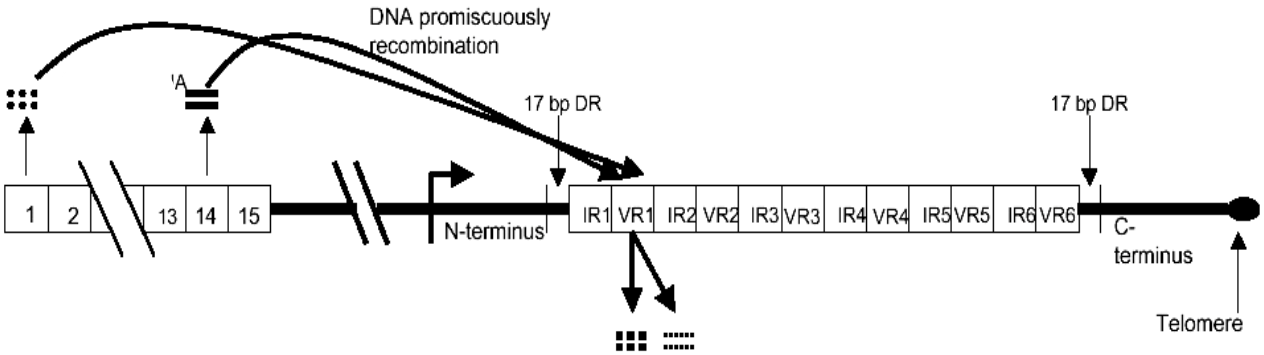
- **Variation antigénique** : [3] [81] [87]

Un des principaux mécanismes connus est la variation antigénique des protéines VlsE. Ce mécanisme, qui était déjà connu chez d'autres *Borrelia* impliquées dans les fièvres récurrentes ou chez *Neisseria gonorrhoae*, implique le gène Vls (pour VMP-like sequence), dont le locus se trouve sur le plasmide linéaire lp28-1, ainsi que 15 copies silencieuses en amont du site. La protéine VlsE est une protéine de surface de 34kDa, comprenant 2 régions invariables et un domaine interne variable composé de 6 régions variables et 6 régions invariables. L'étude de la structure cristalline de VlsE a montré que les régions variables correspondent aux domaines exposés à la surface et donc au système immunitaire. Les recombinaisons entre les diverses copies silencieuses Vls assurent la variabilité de la séquence d'où une variation antigénique.

Il a été montré que les cascades de cytokines provoquées par l'IFNγ influent sur la recombinaison génétique de Vls et donc génèrent une population diversifiée de spirochètes échappant ainsi à la réponse immune de l'hôte. Ces observations corroborent le fait que ce phénomène ne se produise qu'*in vivo* et à plus haute fréquence chez la souris dont le système immunitaire est intact.

Figure 8 : Mécanisme de variation antigénique des protéines VlsE.

Les régions invariables IR1 et IR2 sont recombinées avec les 15 copies silencieuses en amont, puis se recombinent de manière aléatoire avec les régions variables (VR). [3]



L'échappement au système du complément grâce aux protéines Erp ou OspE et OspF par liaison aux protéines H de contrôle a été vu précédemment. Il semblerait qu'un mécanisme de recombinaison intervienne au sein de la famille mais d'autres études le contredisent. [108] [109]

Ces recombinaisons génétiques sont sous l'influence de différents facteurs : physiques (température, pH, densité cellulaire), chimiques (facteurs environnementaux), mais également dépendants de la pression immunitaires de l'hôte.

- **Immunomodulation :**

La maladie de Lyme est caractérisée cliniquement et histologiquement par des réactions inflammatoires très développées compte tenu du nombre de Spirochètes impliqués. Borrelia burgdorferi semble contrôler la sécrétion d'un grand nombre de cytokines impliquées dans la réponse immune, notamment le TNFα, l'INFα et les interleukines (IL-1, IL-6, IL- 8, IL-12). Ces phénomènes orientent la réponse Th1/Th2 comme nous l'avons vu en étudiant le pouvoir pathogène expérimental.

Borrelia burgdorferi provoque l'agrégation des monocytes et la synthèse des cytokines, induite par la liaison de lipoprotéines de surfaces de *Borrelia* avec le récepteur TLR2 (pour Toll-like receptor2), ce qui déclenche une translocation nucléaire de NF-χB. Cette réponse inflammatoire est potentialisée par le CD-14 (corécepteur du LPS). [81] [97]

Ces cytokines permettent l'activation des cellules endothéliales, macrophages, neutrophiles et lymphocytes B. L'IL-8 attire et active les lymphocytes, ce qui contribue à l'inflammation et aux dégâts des tissus de l'hôte. Par contre, les cytokines n'ont pas d'effet toxique sur *Borrelia burgdorferi*, et ne modifient pas l'expression des protéines de surface. [98]

Un autre effet local est l'immunosuppression dans la peau par inhibition de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité des cellules de Langerhans, notamment dans le cadre des lésions d'acrodermatite chronique atrophiante ou lors d'érythème migrant. [46] [98]

Les co-infections par d'autres pathogènes (transmis ou non par les tiques) comme *Babesia* ou *Ehrlichia* peuvent expliquer certains cas de maladie de Lyme chronique résistante aux antibiotiques.

- **Mécanismes divers** :

Quelques études ont souligné des propriétés particulières de *Borrelia burgdorferi* comme sa capacité à se passer physiologiquement de fer pour sa croissance et sa survie. Or les enzymes contenant du fer sont des cibles bien connues pour les défenses oxydatives de l'hôte contre les pathogènes. [81]

Un autre moyen d'échappement est assuré par mimétisme moléculaire. On a vu précédemment que *Borrelia* se liait aux molécules de l'hôte pour assurer sa survie; certaines protéines de membranes empêchent l'accès des anticorps à leur site de reconnaissance. C'est le cas notamment de la protéine p66, qui est accessible en l'absence d'OspA, et détruite par les protéases ; mais si Ospa qui est protéase-résistante est exprimée, les anticorps anti-p66 sont sans effet. [81]

Enfin, les formes de survie de *Borrelia burgdorferi* comme les sphéroplastes, forme kystique ou « blebs » métaboliquement inactives, pourraient être à l'origine du maintien de l'infection dans les formes chroniques. [117]

e. Mécanismes auto-immuns ? [105]

La persistance de la maladie de Lyme de façon chronique dans les cas de neuroborréliose ou de synovite chronique, l'inefficacité des traitements antibiotiques et les sérologies négatives avec des signes cliniques évidents dans certains cas, ont souvent soulevé la question de mécanismes auto-immuns. Des analogies de structures entre OspA et hLFA-1 (présent à la surface des leucocytes humains), au niveau d'un motif de 9 acides aminés ont été montrées, et pourraient expliquer la formation d'auto-anticorps au niveau des synoviales, responsables d'une réaction lymphocytaire spécifique intra-articulaire.

Cependant cette théorie a des faiblesses :

- cette homologie n'est valable que pour *B.burgdorferi sensu stricto*, or des arthrites chroniques peuvent survenir avec d'autres espèces ;
- hLFA-1 étant distribuée dans l'ensemble de l'organisme, on ne peut expliquer la localisation uniquement articulaire ;
- ce phénomène de mimétisme moléculaire est assez banal et insuffisant pour expliquer une maladie auto-immune ;
- cette réaction auto-immune rétrocède après synovectomie ;
- elle s'interrompt en général au bout de 4 à 5 ans, ce qui n'est jamais le cas des maladies auto-immunes. [97]

D'autre part, on a trouvé chez des patients atteints de neuroborréliose des anticorps dirigés contre les axones. Ces IgM sont dirigés contre la flagelline de *Borrelia burgdorferi* et contre la protéine de choc thermique HSP60 présente au niveau des neurones. Ces réactions peuvent suggérer un mécanisme auto-immun comme une simple réaction auto-immune post-infectieuse. [98]

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Quelques études ont fait mention de chocs toxiques chez des patients atteints de Borréliose de Lyme, par une activité super-antigène. Un super-antigène est un produit viral ou bactérien dérivé directement des marqueurs CMH de classe II d'une famille de lymphocyte T, stimulant ainsi de nombreux lymphocytes T dans un contexte non –spécifique. On parle aussi de facteurs activateurs des lymphocytes B chez *Borrelia burgdorferi*. [98]

f. Pouvoir toxique :

Borrelia burgdorferi peut présenter une activité hémolytique.[77]
On lui connaît également un pouvoir neurotoxique concernant une souche : *Borrelia burgdorferi* Bbtox1, pouvant expliquer des cas d'encéphalopathie.
Enfin, on a mis récemment en évidence une protéase CtpA. [117]

Cette étude approfondie de la pathogénie montre le pouvoir adaptatif de *B. burgdorferi*, qui repose sur :

- une variabilité antigénique importante qui permet d'échapper aux défenses de l'hôte ;
- la synthèse de facteurs de la réponse immune lui assurant un contrôle de la réponse immunitaire
- la possibilité de se disséminer et de se cacher (par mimétisme ou par phagocytose) au sein de l'hôte…

De plus, la réaction immune est démesurée et provoque une partie du tableau lésionnel (avec des mécanismes auto-immuns suspectés).

Cette étude de l'agent étiologique de la maladie de Lyme, et plus particulièrement la pathogénie qui nous a déjà conduit à les citer, nous amène à présenter les autres protagonistes en abordant l'étude épidémiologique de cette maladie.

Épidémiologie
de la maladie de Lyme

L'étude épidémiologique de la maladie de Lyme va nous permettre d'envisager son importance et de déterminer tous les aspects du cycle de transmission. Nous aborderons également l'étude de son hôte principal en Europe : la tique *Ixodes ricinus.*

I. Epidémiologie descriptive :

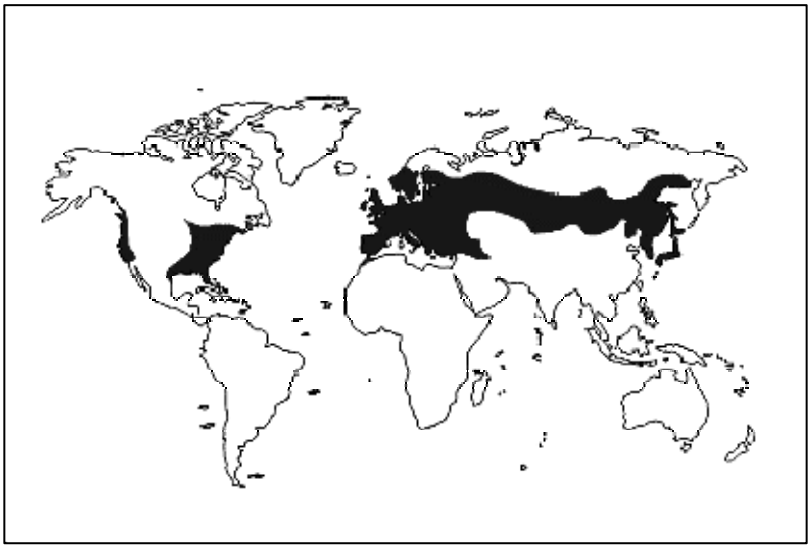
1. Espèces affectées :

La maladie a été décrite chez l'homme et les mammifères domestiques en particulier le chien, les équidés et les ruminants (ovins et bovins), rarement le chat. [37.a.] [77] [103]
De nombreuses autres espèces peuvent être porteuses mais sans développer de signes cliniques : des mammifères (petits rongeurs, ongulés, carnivores…), des oiseaux (grives, merles, fauvettes…) ou même des lézards. Nous développerons plus tard leur rôle épidémiologique de réservoir.

2. Répartition géographique :

La répartition de la borréliose de Lyme est mondiale mais non uniforme. En effet, elle est conditionnée par l'aire de distribution du vecteur ; on peut donc la limiter à une ceinture recouvrant la zone tempérée de l'hémisphère nord (Figure 9). Cette zone comprend la majeure partie de l'Eurasie et des États-Unis, ce qui correspond fidèlement à la zone où la maladie est endémique et de haut risque zoonotique.

Figure 9 : Répartition mondiale des zones où la borréliose de Lyme est endémique. [20]



Si on prend en compte le portage de *Borrelia burgdorferi* par l'homme, cette maladie s'étend sur 6 continents, plus de 30 pays et de nombreuses îles.
Cette répartition reste encore un peu sous-estimée de par le fait que les moyens mis en œuvre, dans certains pays, pour détecter la maladie sont déficients. [45]

L'origine géographique de la bactérie est difficile à déterminer, mais pourrait provenir d'une mutation trans-règnale du virus de la peste porcine africaine, qui aurait donnée naissance à Borrelia afzelii et Borrelia garinii. Celles-ci grâce au concours de leurs vecteurs et hôtes auraient traversé l'Europe et rejoint l'Asie (d'où leur prépondérance dans ces régions), puis l'Amérique via le bras de terre reliant la Sibérie à l'Alaska. Enfin à partir de 1492, les migrations des colons ont pu ramener Borrelia burgdorferi sensu stricto en Europe. [45]

L'Europe est touchée dans son ensemble, mais tout comme la répartition mondiale,la répartition européenne n'est pas uniforme. Il existe un gradient croissant d'Ouest en Est, et d'autres gradients plus localisés: un gradient croissant du Nord au Sud de la Scandinavie, et un autre du Sud au Nord en Italie, en Espagne et en Grèce. [103]

En France, aucune étude n'a porté sur l'ensemble du territoire, mais des foyers importants ont été signalés dans le Nord-Est et l'Ouest, et de manière moins importante en région Centre (Berry, Parc de Chambord), Ile de France (forêt de Rambouillet) ainsi que dans le Sud-Ouest (notamment les Landes et la région Midi-Pyrénées) et en Corse. [34] [37.a.] [57] [77] [90]
Finalement, toutes les zones rurales de moins de 1.200 mètres d'altitude sont exposées, à l'exception d'une bande de territoire en zone méditerranéenne. [100]

3. Importance :

C'est la première maladie à vecteur de l'hémisphère Nord. En France, elle a été reconnue comme maladie professionnelle à déclaration obligatoire depuis 1988. [77]

Actuellement elle fait l'objet de nombreuses études, car beaucoup de données, épidémiologiques ou non, restent inconnues (notamment sa prévalence exacte tant chez l'Homme que chez l' animal).

Les campagnes de sensibilisation auprès des médecins ont permis d'identifier un nombre croissant de cas mais il existe toujours un problème de sous diagnostic difficile à quantifier.
Depuis une dizaine d'années l'incidence est en forte augmentation mais ceci serait dû à l'amélioration des connaissances.
L'incidence est donc probablement sous-évaluée dans les zones endémiques et surévaluée dans les zones où la maladie est rare.
Enfin certains cas atypiques ne sont pas diagnostiqués, d'autant plus que les méthodes sérologiques présentent de nombreuses limites (que nous étudierons ultérieurement). [76]

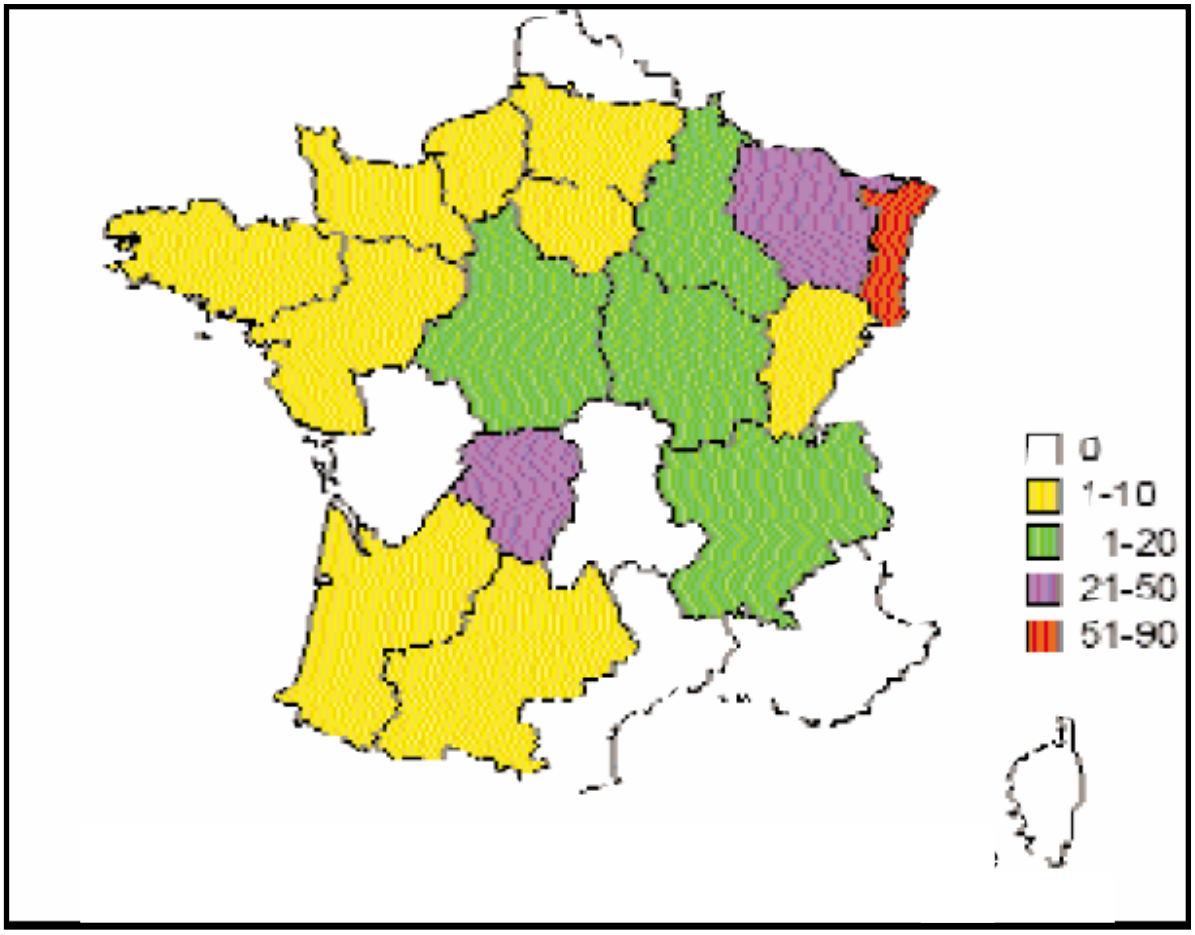
a. Chez l'Homme :

•Aux États-Unis, et ce dès 1982, le Center for Disease Control (Le CDC) met en place un système de surveillance. Ceci a permis une plus grande sensibilisation de la population et des médecins donc des résultats plus fiables qu'en Europe.
Harvey propose en 2003 une estimation selon les statistiques du CDC, en se basant sur une incidence annuelle de 5,1 cas pour 100.000 personnes, il trouve une prévalence de 1.070.000 cas sur la période 1925-2000 soit 2% de la population américaine.
Il estime que ce chiffre est applicable à l'ensemble du globe et serait sous-estimé. [45]

•En Europe, l'incidence varie beaucoup d'un pays à un autre (de 0,3 pour 100 000 personnes au Royaume Uni à 130 cas pour 100.000 personnes en Autriche). [103] On estime pour l'ensemble de l'Europe que l'incidence est supérieure à 50.000 cas annuels.

•En France, les valeurs sont aussi extrêmement variables selon les études.[23] [97]
L'incidence nationale est estimée à 16 cas pour 100 000 personnes, mais des zones endémiques présentent des valeurs nettement plus élevées (34 cas pour 100.000 personnes en Lorraine, 42 dans le Limousin et même 86 en Alsace). (Figure 10)
Selon l'institut Pasteur, l'incidence annuelle est mal connue.[100] Une étude du réseau sentinelle réalisée entre mai 1999 et avril 2000 obtiendrait une incidence de 5.500 nouveaux cas diagnostiqués par les généralistes. [91]

Figure 10 : Incidence régionale annuelle de la maladie de Lyme (en cas pour 100.000 habitants par an)sur la période 1999-2000 [91]



b. *Chez les bovins :*

•Une étude menée aux États-Unis sur 7660 bovins du Wisconsin [53] a montré une prévalence individuelle de 7%. Mais localement cette prévalence est montée à 17% dans une région particulièrement touchée par la borréliose de Lyme humaine.
Cette étude a dénombré 66% des troupeaux positifs, parmi lesquels 16% avaient plus de 15% de vaches positives.
Cette étude a surtout permis de montrer que la répartition des séropositifs était corrélée d'une part à la répartition géographique *d'Ixodes scapularis* [95] et d'autre part à la présence de cas humains de maladie de Lyme.
• Au Japon,les études ont surtout été réalisées sur l'île d'Hokkaïdo, et montrent un taux de séropositivité de l'ordre de 20%, variant suivant la saison mais absolument pas corrélé à des signes cliniques (sauf pour un unique cas d'arthrite sévère). [111]

• En Europe, très peu d'études ont été réalisées sur les bovins. Dans une étude menée en Slovaquie dans 7 régions distinctes, on observe une prévalence sérologique moyenne de 25% (de 0,6% à 34,3%) sur des IgG anti-Borrelia. [107]
En Allemagne, des analyses effectuées sur 66 troupeaux par immunofluorescence ont obtenu 33% de troupeaux positifs. [59]

• En France, une étude menée dans l'Est par immunofluorescence obtient une prévalence de 28,1%. [117]

4. <u>Variation saisonnière :</u>

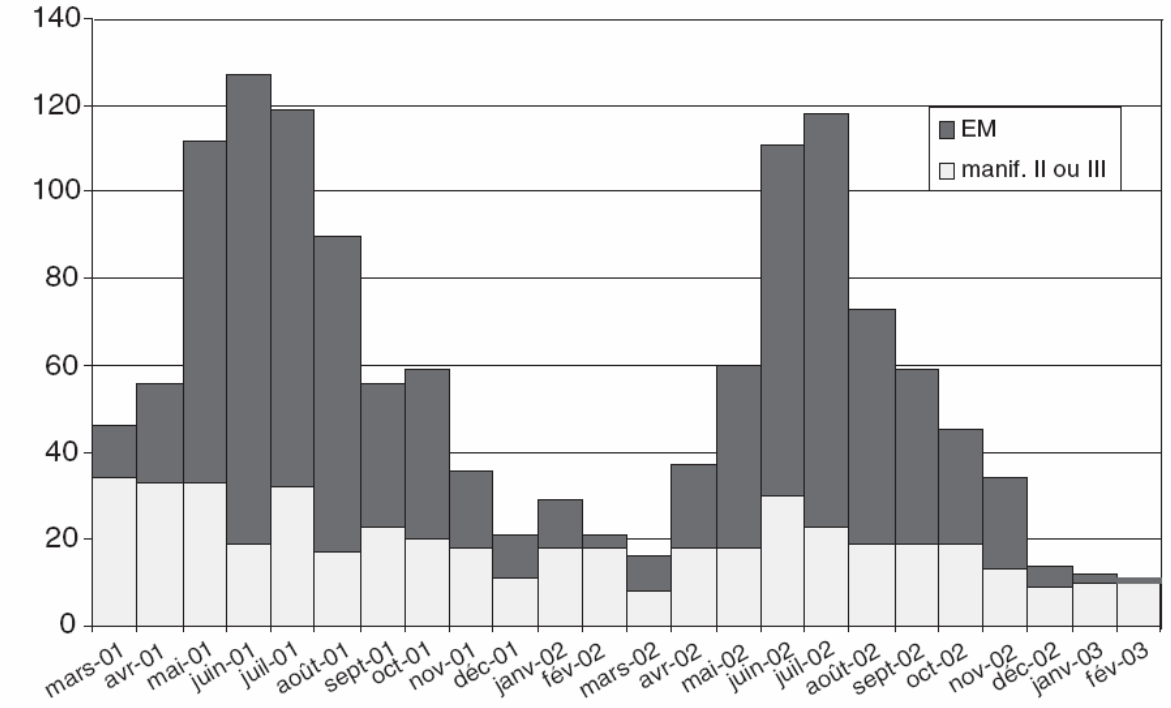
Cette variation apparaît de façon évidente dans toutes les études portant sur l'Europe et se manifeste par un pic annuel estival, s'étalant de mai à octobre.

Les signes cutanés sont très fréquents entre mai et août. Les formes secondaires et tertiaires sont réparties de manière plus régulière sur l'année, et elles prédominent sur l'érythème migrant à l'automne et en hiver (Figure 11). [32] Dans ces données il faut prendre en compte le délai d'apparition des symptômes et le délai du diagnostic, si le patient connaît la date de la morsure : l'étude menée par le réseau de surveillance en Alsace donne un délai d'une semaine pour 48% des cas et d'un mois pour 37% avant l'apparition de l'érythème chronique migrant et de moins d'un mois pour le diagnostic pour 63% des patients.

Cela signifie que le pic d'infestation par les tiques se situe environ 1mois avant celui de la maladie, soit de mars à juillet.

Bien que la période d'activité du vecteur *Ixodes ricinus* soit biphasique (printemps et automne), ceci ne se traduit pas au niveau de la maladie. L'explication peut résider dans le mode de vie des populations à risques qui sortent plus souvent et en tenues plus légères au printemps et en été, ce qui faciliterait l'infestation et donc la transmission de la maladie.

Figure 11 :Distribution mensuelle des cas de maladie humaine de Lyme en Alsace entre mars 2001 et février 2003. [61]



II. Epidémiologie analytique :

Il existe plusieurs mode de transmission de la maladie que nous allons examiner dans un premier temps. Mais le mode principal, en Europe de l'Ouest, est la transmission vectorielle par *Ixodes ricinus* ; nous étudierons donc dans un deuxième temps sa biologie. Enfin nous terminerons par l'analyse des réservoirs et des facteurs de risques.

1. Les modes de transmission :

a. Transmission vectorielle par les tiques dures :

Les bactéries du genre *Borrelia* se transmettent via des hôtes intermédiaires qui sont des arthropodes piqueurs. Pour *Borrelia burgdorferi*, il s'agit des tiques dures. Ces tiques appartiennent au sous-ordre des *Ixodoïdea* et à la famille des *Ixodidae*, elle-même divisée en 2 sous-familles les *Argasineae* et les *Ixodineae*. Seuls ces derniers sont responsables de la transmission des Spirochètes à l'homme et aux animaux (figure 12).
Il existe environ 650 espèces réparties en 13 genres. [37.a.] Parmi elles, beaucoup ont été montrées porteuses de *Borrelia burgdorferi* mais toutes ne sont pas capables d'entretenir un foyer de borréliose. [83]

Figure 12 :Tique (*Ixodes ricinus*) en microscopie électronique à balayage. [20]

Les vecteurs primaires sont du genre *Ixodes* spp (140 espèces ont été décrites) et varient suivant la localisation géographique [63]. Par exemple :

- en Europe, on trouve essentiellement *Ixodes ricinus*, la tique du mouton, qui est également vectrice de nombreuses maladies de l'Homme et du bétail. [103]
- en Asie et au Japon, c'est *Ixodes persulcatus* qui est principalement incriminée, et secondairement *Ixodes ovatus* uniquement au Japon. [29], [77]
- Aux Etats-Unis, on trouve *Ixodes dammini* au Nord-Est, *Ixodes scapularis* au Sud-Est et *Ixodes pacificus* au Nord-Ouest. [29], [77]

b. Transmission vectorielle par les insectes :

Elle est citée dans de nombreuses publications.[37.a.] [45] [57] [77] [114] Non seulement la présence de *Borrelia burgdorferi* chez de nombreux diptères (Culicidés et Tabanidés) et chez des Siphonaptères a été démontrée mais sa transmission aux hôtes également.

Des cas de borréliose de Lyme, hors de la zone d'extension *d'Ixodes ricinus*, ont été décrits en Suède et de même en Australie, dans des régions dépourvues d'*ixodidé*. [6]

De plus, les insectes hématophages sont porteurs de la bactérie uniquement en zone d'endémie. Expérimentalement, 59% des taons et 24% des moustiques sont porteurs de *Borrelia burgdorferi* dans l'intestin, après avoir été nourris avec du sang de bovin infecté. D'autre part, l'infection a été transmise expérimentalement des moustiques au hamster. [37.a.]

Ces vecteurs secondaires, bien que mineurs, peuvent avoir une influence non négligeable sur l'entretien de l'infection en zone d'endémie, de par la multitude de repas sanguins qu'ils peuvent réaliser sur de nombreux hôtes.

c. *Transmission directe :*

Plusieurs constatations ont mené à cette hypothèse :

- La transmission de Tréponèmes (spirochètes très proches de *Borrelia burgdorferi*) par voie directe, c'est à dire sans vecteur, est possible. Elle existe par voie sexuelle, foeto-maternelle ou encore par l'urine.
- *Borrelia burgdorferi* est retrouvée dans les urines (de rongeurs [114], de bovins [15] [82] et de chiens [37.a.]), dans le colostrum [52] [82]et dans la semence de l'Homme.
- La contamination par voie orale a été démontrée chez les Rongeurs et pourrait avoir lieu chez les Carnivores. [37.a.]

Des expériences ont démontré le développement d'un fort taux d'anticorps anti-*B. burgdorferi* chez des chiens sains ayant été en contact avec des chiens inoculés ou avec de l'urine de chiens inoculés. De même un chat peut être contaminé suite à l'ingestion de lait provenant d'une vache atteinte. [63]

La contamination par voie transplacentaire a été bien documentée chez l'homme par Gardner (citée par [45])qui a recensé les cas de maladie de Lyme chez les femmes enceintes et leursenfants. Il apparaît qu'un fort pourcentage des grossesses n'aboutissent pas, et que certains nouveaux-nés présentent des symptômes. Chez les bovins, la transmission transplacentaire est prouvée, se traduisant notamment par des avortements, de la mortinatalité et la naissance de veaux débiles. [82] [114]

Enfin il faut signaler la possibilité de la transmission du germe lors de transfusion sanguine, puisque *B. burgdorferi* survit environ 60 jours dans le sang humain conservé à basse température (4°C). Mais il faut aussi noter que ce phénomène est désormais rare, de par le traitement auquel sont soumis les produits sanguins dans le cadre des mesures antivirales.

Ces modes de contamination secondaires jouent aussi un rôle épidémiologique dans la dissémination de la maladie.

2. Biologie *d'Ixodes ricinus*, principal vecteur d'Europe de l'Ouest :

La biologie du vecteur a une influence primordiale sur l'exécution du cycle de *Borrelia burgdorferi* et donc sur l'épidémiologie de la maladie.

a. *Morphologie :*

Les tiques dures sont de véritables géantes parmi les acariens : en effet leur taille adulte varie de 3 à 20mm ; elles sont donc souvent visibles à l'œil nu.

Elles ont un corps globuleux, divisé en 3 régions non segmentées [47]:

- **Le gnathosome** correspond à l'extrémité céphalique ou capitulum, qui se prolonge par un rostre portant les pièces masticatrices.

Rapport-Gratuit.com

Sur les pièces buccales, il existe une paire de chélicères, en avant de la bouche, terminées chacune par une sorte de pince dilacératrice qui va entailler la peau et former un « lac » sanguin sous-cutanée.
Il y a également une pièce médiane et ventrale, appelée hypostome qui, armée de denticules et en communication directe avec le tube digestif va assurer la double fonction de succion et de digestion.
Enfin, une paire de palpes sensorielles encadrant les chélicères permettent au parasite de s'accrocher à la peau.

- **Le podosome** porte les appendices locomoteurs. Le nombre de pattes varie en fonction du stade de la tique : les adultes et les nymphes ont 4 paires de pattes tandis que les larves n'en ont que 3 paires.

- **L'opisthosome** est la seule partie du corps dépourvue d'appendice. C'est dans cette partie que débouchent l'anus et les orifices génitaux. Les sexes sont séparés.
Les nymphes n'ont pas d'orifice génital et les larves n'ont aucune des structures liées à la maturité sexuelle.

b. Habitat : d'après [37.a.] [50] [95] [103] [114]

Ixodes est une tique exophile dont le biotope de repos est le sol, elle y passe donc une grande partie de son cycle de développement. C'est là (dans la litière constituée par les feuilles en décomposition) que l'on retrouve les œufs et les larves.
Le milieu doit satisfaire deux conditions indispensables à la survie *d'Ixodes ricinus* :

- d'une part, le taux d'humidité doit être supérieur à 80% dans les périodes les plus sèches de l'année. Ceci pour maintenir leur balance hydrique mais il ne faut pas non plus que le milieu soit inondé à la saison pluvieuse.

En effet, les tiques sont sensibles à la dessiccation durant la période d'affût et pendant les phases de développement.

- d'autre part, le milieu doit être riche en hôtes potentiels pour les trois stades de développement.

C'est pourquoi on retrouve la tique principalement dans les forêts déciduales offrant une végétation couvrante, dans les fourrés, les arbustes, les sous-bois, les chemins creux, en bordure de pâturage ou encore dans les pâtures où elles se nourrissent sur le bétail.
On ne les trouve que rarement dans les jardins entretenus, à part dans les fourrés car ils abritent également les petits mammifères nécessaires au cycle.
La température optimale de développement de la tique est comprise entre –15° et 30°C.
Ainsi la répartition géographique *d'Ixodes ricinus* en Europe est large, excepté l'extrême Nord et l'extrême Sud. On la trouve rarement au dessus de 1200m et jamais au dessus de 1500m. D'autres part, les zones de marécages ou inondables ou les régions trop sèches en sont exemptes.
En France, elle est très abondante et répartie sur l'ensemble du territoire à l'exception du pourtour méditerranéen.

c. *Cycle de développement :* d'après [37.a.] [50] [77] [103]

Le cycle de développement de *B. burgdorferi* est un cycle évolutif, il peut durer de 2 à 6 ans suivant les conditions climatiques. C'est donc un cycle assez long, ce qui représente un avantage pour la survie et la dissémination de la bactérie.
C'est un cycle comportant quatre stades (œuf, larve, nymphe et adulte comme le montre la figure 13) et nécessitant trois hôtes successifs : c'est donc un cycle triphasique trixène.

Figure 13 : de gauche à droite : femelle adulte, mâle adulte, nymphe et larve *d'Ixodes dammini*. [20]

Au printemps, la femelle pond 500 à 3000 œufs (selon l'importance du repas sanguin) dans un endroit obscur et humide du sol, puis meurt peu de temps après la ponte.
Après une incubation de 8 jours à 3 semaines (selon la température ambiante), les œufs éclosent et donnent naissance à des larves (mesurant entre 0.5 et 1mm) qui, en quelques jours seront prêtes à parasiter un hôte. Elles se déplacent dans un rayon de 50cm maximum autour du lieu d'éclosion, puis se fixent à l'affût d'un hôte soit dans la litière soit à quelques centimètres du sol. Grâce à des organes sensoriels sensibles aux vibrations, à la chaleur, ou encore à la présence d'acides carbonique et butyrique la larve détecte la présence de l'hôte. Elle va monter sur lui jusqu'à une zone où la peau est plus souple et va se fixer pour effectuer son repas durant en moyenne 3 à 5 jours. C'est le volume de sang absorbé qui détermine la taille de la nymphe qui augmente de 10 à 20 fois son poids.

Une fois gorgée de sang, la larve se détache et trouve un endroit où effectuer sa mue. Cette phase libre au sol dure en moyenne 4 à 6 semaines pendant lesquelles la larve se métamorphose en nymphe mesurant 1 à 3 mm. La nymphe trouve ensuite un autre hôte pour effectuer son repas sanguin qui dure de 4 à 7 jours, et se laisse ensuite tomber au sol pour se

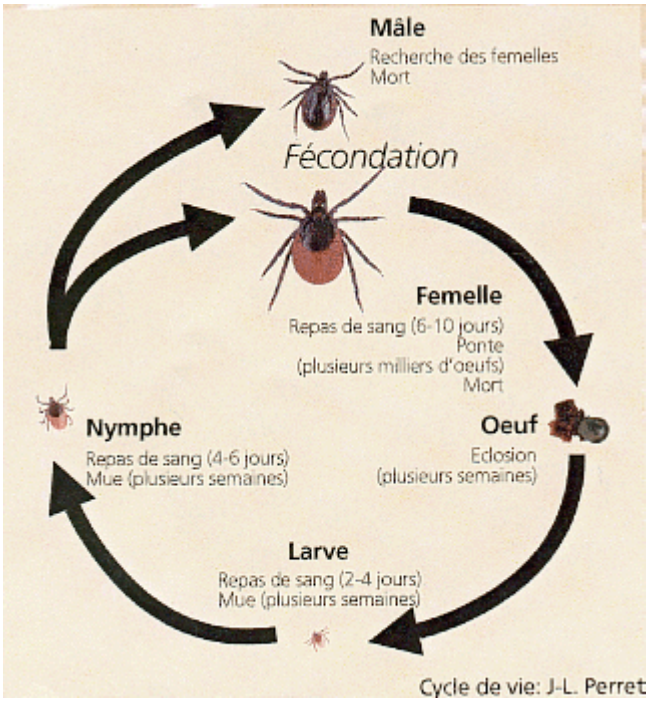
Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

transformer en adulte. Cette deuxième métamorphose peut durer de quelques semaines à quelques mois.

Le volume ingéré conditionne la taille du futur adulte, le mâle étant plus petit que la femelle et seulement occasionnellement hématophage.

Après un temps de maturation, la femelle se met à la recherche d'un troisième hôte. Son repas durera de 7 à 10 jours durant lequel elle peut absorber 5 mL de sang et atteindre 1cm.
L'accouplement a lieu durant ce repas, le mâle reste plus longtemps sur l'hôte pour féconder plusieurs femelles, il se nourrit peu et moura peu de temps après.
La femelle tombe ensuite au sol et commence la ponte après la digestion et l'ovogenèse.

Figure 14 : Cycle *d'Ixodes ricinus*. [102]



Les ixodes parasitent des hôtes très variés : mammifères, reptiles, oiseaux…Ce sont donc des tiques ubiquistes mais il existe une sélectivité selon l'espèce et le stade évolutif.
Les larves sont plutôt trouvées sur les petits mammifères comme les rongeurs (mulot, campagnol…) et les insectivores (hérisson, musaraigne….), les nymphes sont également retrouvées sur ces espèces mais également chez les lagomorphes, les petits carnivores (putois, hermine….) et les oiseaux (faisan, merle…) ; enfin les adultes sont retrouvés préférentiellement sur les grands mammifères comme les ongulés (cerf, chevreuil, daim, sanglier, ovins, bovins et caprins), les grands carnivores (renard, chien , marte….) et l'Homme.
Mais à tous les stades du développement l'Homme reste un hôte accidentel.

On peut aussi noter que les nymphes sont numériquement beaucoup plus nombreuses que les adultes et sont donc à l'origine de plus de cas. De plus les nymphes sont aussi moins visibles, ce qui les empêche d'être repérées.
La transmission de la bactérie, du vecteur à l'hôte, est efficace après seulement 17 à 29h de fixation d'une nymphe. Ainsi on compte en moyenne 1 à 3 jours pour une nymphe et 2 à 4 jours pour un adulte.

d. Activité saisonnière : d'après [37.a.] [50] [103]

La période d'activité des tiques varie dans le temps. En Europe, elle s'étale de mars à octobre, avec deux pics d'incidence au printemps et à l'automne, correspondant à deux sous-populations : les nymphes et les adultes.
En effet, les larves, en France, ont une activité maximale en juillet ; les nymphes ayant hiverné reprennent leur activité en mars, avec un maximum en mai, puis disparaissent l'été pour revenir en septembre ; les adultes sont particulièrement nombreux en mai, septembre et octobre.

Le déterminisme de l'activité d'affût est influencé par les conditions climatiques (température et humidité principalement) et par la photopériode, mais aussi par des facteurs comme la nature de l'habitat et la présence d'hôtes potentiels.

En dehors des périodes favorables, la tique entre en diapause. On distingue la diapause comportementale (sorte de quiescence à jeun) de la diapause développementale : arrêt des phases de mue ou d'embryogenèse pour les œufs. La longueur de la diapause est influencée également par des facteurs génétiques des populations locales.

Cette activité saisonnière retentit bien évidemment sur l'épidémiologie de la borréliose de Lyme, et des études ont montré que le taux d'infection chez les tiques varie également suivant la saison, de même que la présence d'hôtes potentiels.

e. Contamination de la tique par Borrelia burgdorferi :

d'après [37.a.] [50] [103] [117]

La contamination de la tique se fait à la faveur d'un repas sanguin sur un hôte réservoir. Une fois ingérée, la bactérie gagne l'intestin du vecteur où il s'agrège près des microvillosités des cellules épithéliales et dans les espaces intercellulaires. Seulement quelques tiques subissent une infection généralisée avec passage du spirochète dans l'hémolymphe.

Il existe aussi une transmission trans-stadiale, c'est-à-dire qu'une larve infectée lors de son premier repas sanguin donnera une nymphe puis un adulte infectés. Ainsi on observe un gradient croissant et chronologique du taux de contamination. Cependant les nymphes sont numériquement beaucoup plus nombreuses que les adultes et sont donc à l'origine de plus de cas.

La transmission transovarienne de *Borrelia burgdorferi* est également présente chez *Ixodes ricinus* mais semble assez faible, de l'ordre de 5% des larves au maximum.

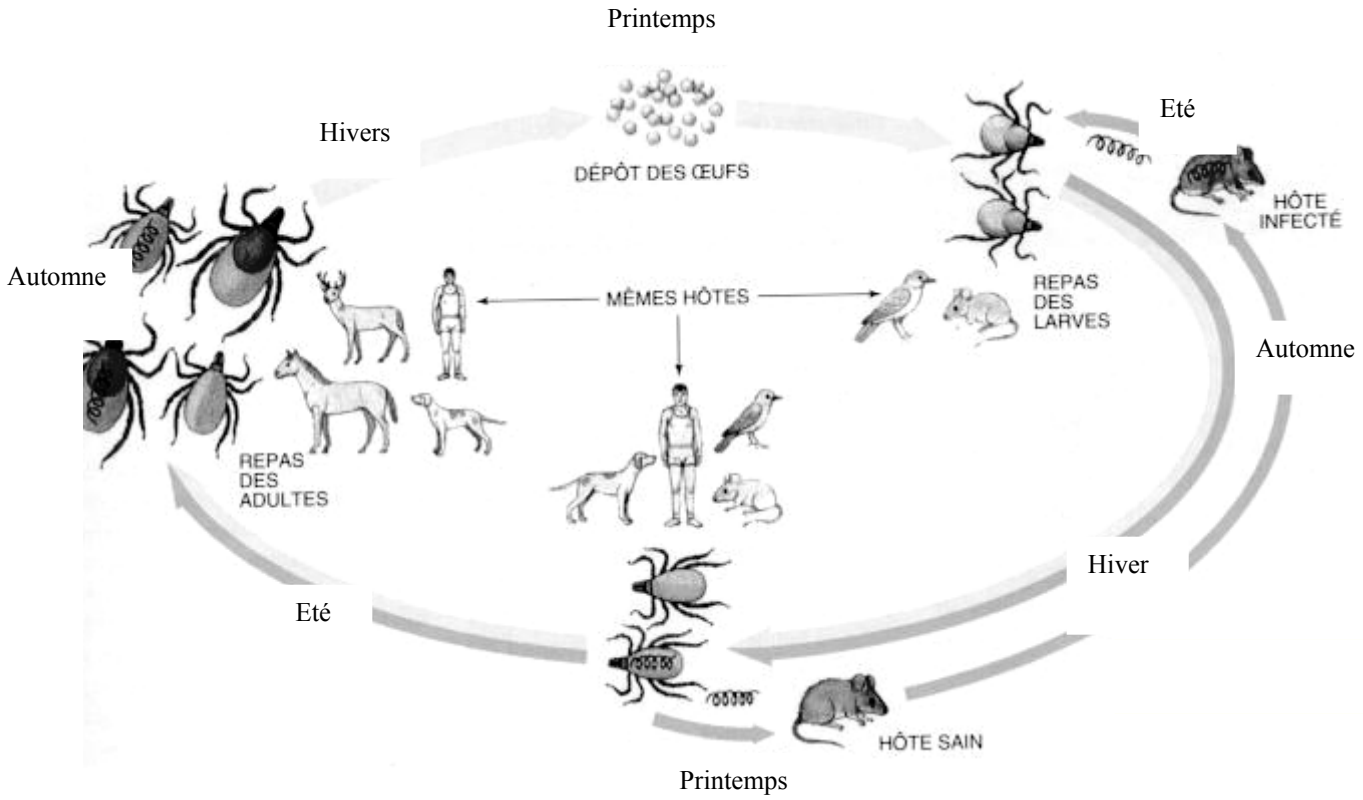
Il existe aussi une transmission entre tique lors de repas sanguin à proximité sur le même hôte ; c'est le cofeeding.

Dans la nature, la transmission de l'infection entre tiques et hôtes dépend de la fréquence des contacts entre les deux espèces, et également du taux d'infection du vecteur.
Or on observe une supériorité numérique des larves sur les nymphes ainsi que des nymphes sur les adultes (environ 10 fois plus de nymphes que de femelles). Par contre, les nymphes présentent un taux d'infection d'environ 30%, ce qui est bien supérieur à celui des larves (10 à 20 fois plus). En conclusion, la grande abondance de nymphes infectées leur fait jouer un

rôle très important dans la transmission de la bactérie, notamment chez les passereaux, les écureuils et les lièvres, chez qui l'infestation est fréquente.

Une étude menée dans le sud de l'Allemagne a montré que sur 3000 tiques prélevées, 20% des adultes, ainsi que 10% des nymphes et seulement 1% des larves étaient infectés. Les chiffres selon les études sont très variables car les protocoles de capture (et même la période de capture) influencent les résultats. En Europe, on obtient un taux d'infestation moyen de 10 à 20%.

Figure 15 : cycle de propagation des Spirochètes. [28]



Cette étude de la biologie *d'Ixodes ricinus* nous permet de mieux cerner le rôle éco-épidémiologique du vecteur dans la borréliose de Lyme. Parmi tous les hôtes hébergeant Ixodes ricinus, certains seulement jouent un rôle de réservoir de germes et permettent l'entretien des foyers d'infection.

3. Les réservoirs :

La notion de réservoir est précise et mérite d'être clairement définie car elle joue un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie.

Un réservoir-hôte est un vertébré qui abrite l'espèce pathogène et se comporte comme une source d'infection à long terme pour les autres espèces, qu'elles soient hôtes ou vecteurs.

Ainsi pour être réservoir il faut que l'animal soit non seulement réceptif et porteur mais il doit aussi permettre le passage du germe à l'arthropode vecteur. Ceci sous-entend une importante parasitémie périphérique et une durée d'infection assez longue pour couvrir la période de diapause hivernale.

Ainsi un animal séropositif ou à partir duquel on isole le germe n'est pas nécessairement réservoir, cela prouve uniquement qu'il a été en contact avec le pathogène. [50] [103]

On peut déterminer la capacité de réservoir par différentes méthodes : [103]

- en laboratoire, par infestation d'un animal infecté par des tiques non contaminées, suivie de la démonstration de la pathogénicité des tiques au cycle suivant
- ou en capturant des larves directement sur les animaux
- ou encore en capturant des nymphes à jeun dans le milieu, et en retrouvant l'hôte sur lequel elle se sont nourries par détection d'ADN.

Il est important de noter que ce statut dépend du lieu et de la période à laquelle ont été faits les prélèvements mais aussi de la souche de *Borrelia* considérée.
En effet on retrouve *B. afzelii* chez les petits rongeurs, *B. garinii* et *B. valaisiana* chez les oiseaux, *B. burgdorferi sensu stricto* et *B. afzelii* chez l'écureuil. Ces spécificités pourraient s'expliquer par un phénomène de résistance au complément de l'hôte . [60]

En Europe, les réservoirs sont constitués par les campagnols, les mulots et les musaraignes. Les grands mammifères sauvages forestiers comme les cerfs, les sangliers et les chevreuils, bien que présentant des taux de séropositivité élevée ne sont probablement pas responsables de l'entretien de la dissémination de *Borrelia burgdorferi* car ils n'infecteraient que difficilement les tiques dont ils sont porteurs. Leur rôle réside en fait dans l'entretien des populations de tiques ce qui permet le maintien des foyers de borréliose. [34]

Les oiseaux, par contre, sont de plus en plus considérés comme un réservoir très important de la bactérie. D'autre part, les oiseaux migrateurs pourraient être d'excellents moyens de transport de l'agents pathogène et des tiques. [103]

Les carnivores ont probablement un rôle limité à ce niveau : le renard transmet peu l'infection, le chien semble un bon réservoir mais pendant peu de temps et le chat est rarement parasité du fait de la toilette fréquente qu'il réalise.
L'Homme, constitue un hôte accidentel, et comme tous les animaux développant la maladie, il ne peut constituer un réservoir.

La compétence de réservoir est le fruit d'une longue évolution, dans laquelle les organismes s'habituent petit à petit l'un à l'autre. L'adaptation physiologique qui en résulte permet la coexistence de deux organismes et la persistance dans le milieu.
Par ailleurs, les tiques infectées peuvent par elles-mêmes constituer un réservoir de la maladie, leur durée de vie étant suffisamment longue pour permettre un maintien dans le temps de la bactérie.

4. Les facteurs de risque :

L'essentiel des facteurs de risques est représenté par le mode de vie et tout ce qui s'y rapporte. Les personnes les plus exposées sont celles qui sont les plus en contact avec les tiques, c'est-à-dire les personnes qui travaillent en forêt, les touristes, les promeneurs et les enfants qui jouent souvent en tenues dénudées et en contact avec le sol.
Les activités et sports en forêt sont également des facteurs de risque. [32] [91]

Une étude américaine [22] montre, du point de vue de l'âge, une distribution bimodale avec un pic à 5-9 ans et un autre à 60-64 ans.

La présence d'animaux d'élevage est un facteur favorisant, notamment le bétail et plus particulièrement les ovins. [18] [30]
Pour ces animaux, les pâtures en lisière de forêt, celles avec un passage fréquent d'animaux sauvages, ou celles possédant des arbustes pouvant abriter des petits rongeurs ou des oiseaux sont considérés comme zones à risques.

Enfin, *Ixodes ricinus* peut être vectrice d'autres maladies comme la babésiose, l'ehrlichiose, ou l'encéphalite à tique qui peuvent être transmises en co-infection avec *Borrelia burgdorferi* et rendre difficile le diagnostic de la maladie de Lyme. Ces cas sont de surcroît difficiles à traiter, d'autant que *Babesia* et *Ehrlichia* sont immunosuppressives.

La borréliose de Lyme apparaît donc comme une maladie à vecteur de première importance. On parle souvent de maladie émergente alors que cette affection est connue de longue date mais le tableau clinique très polymorphe est connu depuis peu.
Nous allons donc maintenant procéder à l'étude clinique de la maladie chez l'Homme et chez les Bovins.

Aspects cliniques de la borréliose de Lyme

La maladie de Lyme est très bien décrite chez l'homme, chez qui le tableau clinique est assez complexe. Chez les bovins, le symptomatologie est beaucoup plus fruste et moins caractéristique, et l'atteinte est plus souvent révélée par les séquelles sérologiques qu'elle induit que par les signes cliniques observés. [114]

Nous étudierons tout d'abord la symptomatologie humaine puis celle des bovins. Ensuite nous aborderons les traitements des différentes formes cliniques ainsi que les moyens de prévention de la maladie.

I. Tableau clinique chez l'Homme :

1. Observations sur cette symptomatologie très polymorphe :

La maladie fut d'abord décrite en trois phases évolutives se référant à celles de la syphilis, avec une évolution possible vers la chronicité. Cependant, des incertitudes quant à la classification de certaines manifestations cliniques dans l'une ou l'autre de ces phases, ont fait évoluer cette description du tableau clinique.
En effet, les manifestations bien distinctes de la maladie chez certains patients (cutanées, neurologiques ou articulaires) ainsi que la ségrégation géographique de certaines atteintes (articulaires aux Etats-Unis, neurologiques surtout en Europe et Acrodermatite chronique atrophiante essentiellement en Europe) ont poussé les scientifiques à chercher une association clinique avec les différentes espèces constituant *Borrelia burgdorferi sensu lato*. [5] [29] [87] [103] [117]

Il en ressort que :

- Les affections cutanées du type *erythema migrans* peuvent être dues aux trois principales espèces pathogènes du complexe à savoir *B. burgdorferi sensu stricto, B. afzelii ou B. garinii.*
- Par contre, le lymphome cutané bénin et l'acrodermatite chronique atrophiante sont quasi-exclusivement rencontrés lors d'infections par *B. afzelii*.
- Les problèmes neurologiques résultent principalement d'infections par *B. garinii*.
- Les arthrites sont plutôt le fait de *B. burgdorferi sensu stricto.* On peut cependant retrouver *B. afzelii*, par exemple, dans des prélèvements de synovie sur lors d'arthrites. [65]

Ces spécificités d'espèce ne sont pas expliquées à ce jour mais le tropisme pourrait résulter de l'attachement des *Borrelia* à certains glycosaminoglycanes caractéristiques de différents types de cellules. [97]

Ainsi, il semble qu'il s'agisse en fait de formes cliniques distinctes liées aux différentes souches pathogènes de *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Nous aborderons donc plutôt l'étude par appareil.

2. Les manifestations cutanées :

a. *Erythema chronicum migrans (ECM) :*

La lésion la plus précoce est une papule érythémateuse annulaire qui s'étend de manière centrifuge à partir du site de morsure [4]. Ce signe est considéré comme pathognomonique de la maladie de Lyme (Figure 16) . Il apparaît entre 2 et 30 jours après la morsure de la tique, et est la réaction directe de la migration des spirochètes à travers la peau [103]. Cette lésion peut être confondue avec la réaction locale de la morsure de tique qui est plus précoce. Certains patients ressentent une irritation ou une brûlure, et une lymphadénopathie peut-être liée à la dissémination locorégionale. [90]

Cette lésion apparaît chez 30 à 60% des malades selon les études et s'observe quelque soit l'espèce pathogène en cause.[87] La lésion guérit en général spontanément en quelques jours à quelques semaines mais peut parfois persister [51]. Les zones les plus touchées sont les membres (aine, aisselle…) et le dos. Mais l'érythème peut être également multifocal signant la dissémination de la maladie.

b. *Lymphocytome cutané bénin :* d'après [77] [103]

C'est une complication chronique assez rare de la maladie de Lyme, plutôt liée aux infections par *B. garinii* ou *B. afzelii*. Il intervient rapidement après la morsure de la tique et peut être le seul signe de borréliose de Lyme (Figure 17).

Il est localisé au niveau de la tête (lobe d'oreille chez les enfants), des tétons ou du scrotum et se caractérise par un ou plusieurs nodules (ou plaques inflammatoires) excavés, circulaires, violacés, entourés parfois de papules très fermes et non prurigineuses. En microscopie optique on observe une infiltration dense du derme par des macrophages et quelques éosinophiles [4]. Il disparaît spontanément en quelques mois sans séquelles.

c. *Acrodermatitis chronica atrophians (ACA ou syndrome de Pick-Herxheimer) :*

L'ACA est une atteinte tardive c'est-à-dire qu'elle apparaît entre 1 et 5 ans après la morsure de la tique. Elle concerne 10% des cas en Scandinavie, Allemagne, Hollande, ou en Alsace.

Cette lésion est presque exclusivement due à *B. afzelii* et est donc très rare aux Etats-Unis. Elle se caractérise par une inflammation sur de larges plaques généralement situées sur les membres, associée à une décoloration rougeâtre de la peau, voire une cyanose et un gonflement, liés à la stase veineuse. Ceci se traduit par une douleur au niveau du talon et des pieds caractéristique [4]. La lésion peut s'étendre jusqu'aux fesses ou aux épaules (Figure 18). Intervient ensuite une phase d'atrophie qui se traduit par un aspect luisant et lisse puis cartonné de la peau dû à l'hyperkératose. Des nodules fibreux peuvent se développer en regard des articulations. Ces dernières peuvent alors se déformer et être le siège de périostites, de luxations, ou d'ulcérations. [77]

Cette atteinte est plus fréquente chez les personnes de plus de 40 ans mais peut également toucher les jeunes. [117]

3. Les signes généraux :

Ils accompagnent les premiers signes cutanés, mais sont peu caractéristiques de la maladie, ils correspondent au syndrome grippal : fièvre, malaises, myalgie, maux de tête sévères, fatigue. [112]

Figure 16 :Erythème migrant.[104]

Figure 17 : Lymphome cutané bénin. [104]

Figure 18 : Acrodermatite chronique atrophiante. [104]

Rapport-gratuit.com

4. Les signes neurologiques :

Ce sont les manifestations les plus couramment observées en Europe (où elles interviennent pour 10 à 20% des cas) de par la prédominance de *Borrelia garinii*. [70] [77] [103]
On distingue une phase précoce et une phase tardive beaucoup plus rare (1% des cas) [77] qui se caractérisent par :

Phase précoce :

- Des défauts de conduction des nerfs (se manifestant par une parésie, une paralysie, une perte des réflexes ou encore des sensations de picotement aux extrémités) dus à une polyneuropathie axonale des nerfs sensoriels distaux le plus souvent asymétrique et migratoire [57] [77] [112]. Elle régresse en général en moins de 8 semaines mais peut laisser des séquelles motrices.[110]
- Des atteintes radiculaires à prédominance sensitive : la radiculite hyperalgique est la plus typique et la plus fréquente des manifestations neurologiques. Elle résiste aux antalgiques habituels et aux anti-inflammatoires non stéroïdiens. Des douleurs souvent très violentes peuvent s'associer à des paresthésies. On peut parfois douter de l'organicité de ces douleurs mais elles disparaissent très rapidement suite à un traitement antibiotique. [110]
- Des myalgies fulgurantes, raideur de la nuque, impossibilité de tourner la tête.
- Des lésions des nerfs crâniens : elles sont fréquentes dans les cas neurologiques. La paralysie de Bell (paralysie du nerf facial (VII) unilatérale) est la plus fréquente mais tous les nerfs crâniens peuvent être intéressés. On retrouve entre autre : des difficultés à mâcher, à parler, des névrites optiques (amaurose, vision double), des troubles de l'audition, des malaises ou encore des troubles de l'équilibre.
- Des troubles ophtalmologiques divers, on retrouve notamment la photophobie, des uvéites, des panophtalmies, des infiltrats cornées parenchymateux, des hémorragies de la chambre postérieure, des conjonctivites, des nystagmus…
- Des méningites lymphocytaires d'évolution prolongée.

Phase tardive :

Elle se caractérise par 3 atteintes : encéphalopathie, polyneuropathie et fatigue profonde.[117]
On peut également observer des troubles du sommeil, de la mémoire, mais aussi de l'irritabilité ou une dépression…Des changements de personnalité ont été rapportés dont la violence, les comportements suicidaires ou obsessionnels, la paranoïa, la schizophrénie voire la démence [112]. Ainsi ces encéphalomyélites montrent des signes proches de ceux de la sclérose en plaque.[57]
Cette forme de neuroborréliose chronique, plutôt rare, est donc très invalidante pour le patient et pose des problème de diagnostic pour les médecins et les psychiatres car elle est très polymorphe et peu caractéristique. Elle régresse par contre assez bien aux antibiotiques intraveineux.

5. Les complications articulaires :

C'est la forme la mieux connue de la maladie de Lyme, malgré le fait qu'elle soit peu fréquente en Europe. En effet, c'est une épidémie d'arthrite juvénile qui permit d'attirer l'attention sur la maladie mais c'est aussi la forme la plus courante aux Etats-Unis (en rapport avec la distribution de *Borrelia burgdorferi sensu stricto*), où la prévalence de cette maladie est très importante (17.730 cas en 2000 dont 10 à 20% évoluent en arthrite de Lyme sans traitement). [76]

Ces atteintes existent à tout âge mais semblent plus fréquentes chez l'enfant ou le jeune adulte et sont souvent associées à des troubles neurologiques.
Tout d'abord apparaît (en moyenne 24 jours après la contamination) des signes d'arthralgie et de myalgie fugaces, parfois migratrices ou touchant plusieurs articulations.[57]
Les arthrites débutent un peu plus tard (quelques mois après la morsure), et se manifestent par une mono ou oligo-arthrite asymétrique intermittente, touchant les grosses articulations avec une prédilection pour le genou, l'épaule et le coude, puis secondairement, la cheville, le poignet, l'articulation temporo-mandibulaire, la main et la hanche. [57] [110]
Les crises évoluent par poussées successives, avec un allongement de la durée jusqu'à devenir continues [77]. Elles sont cliniquement plus ou moins douloureuses, et lorsqu'il existe un épanchement articulaire il est de type inflammatoire.

A la radio, on observe un pincement articulaire, avec des images de raréfaction osseuse, en faveur d'une atteinte dégénérative avec des lésions érosives du cartilage et une ostéoporose juxta-articulaire. [57] [103] [112]
L'étude lésionnelle montre une hypertrophie des villosités synoviales et un épanchement [110]. La culture sur prélèvement de synovie ou biopsie permet parfois l'isolement de *Borrelia burgdorferi*. De plus Nocton *et al*. [cité par [63]], ont pu mettre en évidence par PCR la présence d'ADN de *B. burgdorferi* dans le liquide synoviale de patients atteints d'arthrites de Lyme.
Mais on soupçonne un mécanisme auto-immun chez certains patients, en particulier chez ceux avec un phénotype HLA DR4 ou DR2. [57] [103]

Ces arthrites se révèlent handicapantes et difficiles à traiter : en effet, parfois, il faut jusqu'à un an de traitement antibiotique.

6. Les complications cardiaques :

Ces complications sont rares (5% des malades aux USA, seulement anecdotiques en Europe) et souvent bénignes. Les troubles de la conduction comme les blocs auriculo-ventriculaires, sino-ventriculaires ou intra-ventriculaires, représentent l'essentiel des atteintes cardiaques. Ceci se traduit par des palpitations, une dyspnée, une douleur sternale ou une irrégularité du pouls. Elles surviennent environ un mois après la morsure et régresse en moins de 15 jours.
Sauf en cas de complications, elles ne sont souvent que des découvertes fortuites à l'électrocardiogramme. [57]

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

7. Autres signes :

Ils sont anecdotiques et ne constituent pas un signe d'appel. Ont été observés :

- Des troubles digestifs : diarrhée, constipation, anomalies hépatiques, vomissements, anorexie ;
- Des symptômes circulatoires : artérite, accidents vasculaires cérébraux ;
- Des symptômes respiratoires : toux improductive, pneumonie ;
- Des troubles de la reproduction : douleurs testiculaires, douleur à la poitrine, lactation et menstruations irrégulières, perte de libido, avortement, mortinatalité ;
- Des troubles de la miction…

8. Le syndrome post-lyme (SPL) :

Certains patients ayant soufferts d'une maladie de Lyme se plaignent de multiples symptômes apparus malgré un traitement précoce. Parmi ces symptômes, les plus fréquents sont : des céphalées, des arthralgies ou myalgies, une labilité émotionnelle, des troubles du sommeil et une rigidité du cou.

Des études ont montré que certains facteurs de risque augmentent la possibilité de voir apparaître de telles séquelles comme par exemple : une maladie durant plus d'un an avant le début du traitement, un titre élevé en IgG spécifiques, de multiples bandes au western blot corrélées à des troubles de la mémoires.

Mais le SPL peut aussi survenir à l'occasion d'une infection persistante, d'une réinfection ou encore d'un processus inflammatoire ou immunologique déclenché par B. burgdorferi dans le cerveau.

Le SPL comprend les troubles chroniques ou intermittents qui débutent lors de la maladie et persistent des mois, voire des années, malgré une antibiothérapie adaptée.
Ce syndrome appelé aussi maladie de Lyme chronique pose un problème de diagnostic différentiel avec d'autre syndromes comportant la même symptomatologie, et notamment le syndrome de fatigue chronique ou la fibromyalgie .

La borréliose de Lyme s'avère donc difficile à diagnostiquer chez l'Homme de par cette multiplicité de symptômes mais aussi par le fait que les lésions pathognomoniques sont rarement observées.

II. Tableau clinique chez les Bovins :

Il existe peu de cas bien documentés de la maladie de Lyme chez les bovins. En effet, la maladie est souvent sub-clinique (donc le diagnostic se fait à posteriori par sérologie), mais surtout, les symptômes sont peu évocateurs et on peut facilement imaginer qu'ils échappent à beaucoup de praticiens. Enfin, l'évolution assez longue de la maladie fait que les vaches sont souvent réformées avant l'arrivée des symptômes chroniques.

1. Première observation :

C'est Burgess [15] qui, le premier, a fait le lien entre une boiterie chez un bovin et une infection par *Borrelia burgdorferi*.
Ce bovin présentait de graves lésions du carpe et du tarse. L'infection a été mise en évidence par des titres en anticorps élevés dans le sérum, le lait et le liquide synovial mais aussi par immunofluorescence sur des coupe de foie et de poumon.

2. Symptômes généraux :

L'infection entraîne chez les bovins de l'hyperthermie [70] [82] [93] [114] [116], de l'asthénie et de l'anorexie associée à une perte de poids chronique. [82] [93] [114]
Chez certains animaux, la maladie semble évoluer dans le temps, de la même façon que chez l'homme, c'est-à-dire qu'un premier pic d'hyperthermie signalerait la dissémination des spirochètes dans l'organisme. Ce pic serait associé à une baisse de production brutale.

Ces premiers signes peuvent faire l'objet d'une visite du vétérinaire mais sont peu révélateurs de l'infection.
Viennent alors les signes articulaires qui marquent l'atteinte chronique des bovins et qui s'accompagnent alors de fatigue et d'anorexie. Il n'existe pas de données concernant le délai entre la contamination et les premiers signes articulaires.

Une tentative d'infection expérimentale de bovins par injection de *Borrelia* (par voie sous-cutanée ou intraveineuse) n'a pas permis de mettre en évidence de signes cliniques. [115]

3. Signes articulaires :

Les signes articulaires semblent être un signe d'appel important de la maladie de Lyme chez les bovins. Comme chez l'Homme, les grosses articulations sont plus souvent touchées, à savoir : le carpe, le grasset, le tarse et la hanche.(Figure 19 et 20) [93] [114]

L'articulation est alors chaude, gonflée et douloureuse, ceci pouvant durer plusieurs semaines en l'absence de traitement. Plusieurs articulations peuvent être touchées en même temps ou successivement. Les nœuds lymphatiques concernés sont eux aussi gonflés et oedématiés. [57] [93]

Les lésions décrites sont celles d'arthrites avec un liquide synovial abondant, épais, et de couleur rouge à ambré.[15] [93] La membrane synoviale est épaissie avec une prolifération villeuse et de nombreux débris nécrotiques et de fibrine sont présents.

L'histologie montre une infiltration par des lymphocytes, des neutrophiles et des éosinophiles de la membrane synoviale. On retrouve ces cellules dans le liquide synovial. [114] Une vasculite fibrineuse et un léger œdème peuvent être observés.[93] Les gaines tendineuses adjacentes sont également inflammées. Les lésions du cartilage (en particulier du collagène) entraînent des arthrites récurrentes et invalidantes pour les animaux [114], qui peuvent même conduire à l'euthanasie de l'animal à la suite de la dégradation de l'état général. [15] [93] Des cas de fourbures ont été décrits. [82]

4. <u>Les signes d'une maladie polysystémique</u> :

On peut également observer des oedèmes de la mamelle ou des parties distales des membres (particulièrement dans les espaces interdigités).(Figure 22)

Une diarrhée d'intensité variable est signalée. [93]

Des foyers de myocardite et de pneumonie interstitielle ont été décrits. [114]

Une glomérulonéphrite membrano-proliférative et une dégénérescence de l'épithélium tubulaire sont observées (ceci constitue chez le chien un des signes majeurs). [114]

Les signes cutanés semblent occuper une place bien moindre à celle prise chez l'Homme. On signale tout de même, sur un bovin du Wisconsin, un cas d'atrophie du tissus sous-cutané qui rappelle l'ACA.[15] Une étude en Suisse [65] a montré la présence d'une manifestation proche de l'ECM chez une vache et se traduisant par un érythème, de la chaleur, un gonflement et une hypersensitivité en partie ventrale de la mamelle. Ces signes ont disparu en 2 à 3 semaines laissant des croûtes noires cicatricielles (Figure 21). Un autre cas d'érythème de la mamelle, avec des lésions croûteuses à l'extrémité des trayons a été observé en Mayenne. [56]

Des troubles de la reproduction sont mentionnés tels que des avortements, de la mortinatalité, et des naissance de veaux débiles. [82] [114] La transmission transplacentaire et colostrale a été prouvée. [114]

Aucun signe nerveux n'a été décrit chez les bovins alors qu'ils existent chez les équins. [82] De même, les affections oculaires fréquentes chez les chevaux sont absentes chez les bovins.

Il manque encore trop de données pour pouvoir faire un tableau clinique précis d'autant que certains signes déjà subtils chez l'Homme sont d'un diagnostic difficile chez les bovins. D'autre part, les différences entre les infections à *Borrelia burgdorferi sensu stricto* et les autres espèces impliquées notamment en Europe, ont été largement étudiées chez l'Homme mais pour l'instant aucune étude ne les met en valeur chez les bovins.

Les formes cliniques étant, comme nous venons de le voir, très variées, on peut se demander ce qu'il en est des traitements. Effectivement, il faut adapter chaque traitement à la forme de maladie de Lyme mais aussi à l'individu. C'est ce que nous allons développer maintenant.

Figure 19 : Arthrite de Lyme chez un veau, photo NAVETAT H. [42]

Figure 20 : Arthrite avec hypertrophie du tarse, photo NAVETAT H. [42]

Figure 21 : Œdème du pâturon, photo KAUFMANN P. [56]

Figure 22 :Lésions croûteuses à l'extrémité des trayons, photo KAUFMANN P. [56]

III. Traitement :

Les modalités de traitement ont bien évolué au cours des années. Le traitement repose essentiellement sur l'antibiothérapie. Selon le Dr Bigaignon de l'université catholique de Louvain : « Le traitement antibiotique constitue à l'heure actuelle la seule forme thérapeutique de la maladie de Lyme. Il doit donc être appliqué de façon précoce, rationnelle et optimale. »

1. Chez l'Homme :

Alors que de nombreux antibiotiques sont efficaces *in vitro*, le choix est plus restreint *in vivo*.[2] C'est pourquoi on teste les antibiotiques sur des prélèvement de peau, où des mécanismes d'échappement à certaines molécules sont observés (cf. pathogénie). Ces mécanismes expliquent l'inefficacité de certains traitements initialement préconisés après des études *in vitro.*

Un traitement précoce permet en général une guérison rapide et complète. Cette précocité est particulièrement importante dans le cas de la maladie de Lyme de par les conséquences du passage à la chronicité. [79]

a. Antibiotiques utilisés :

Les antibiotiques les plus utilisés sont : les pénicillines, l'amoxicilline, les céphalosporines (plutôt de 3ème génération : cefuroxime, ceftriaxone, cefixime), les macrolides et les tétracyclines (en particulier la doxycycline).

- La doxycycline n'est pas administrée aux femmes enceintes ni aux enfants de moins de 9 ans à cause de ses effets secondaires sur le développement. De plus elle possède aussi un effet photosensibilisant (donc est à éviter l'été) et de nombreuses interactions médicamenteuses.
- Les bêta-lactamases présentent une demi-vie relativement courte, et ont donc le désavantage de nécessiter des administrations fréquentes. Par ailleurs, il existe de nombreux cas d'allergie à la pénicilline, qui sont traités à l'aide d'érythromycine.
- Les macrolides ont une très bonne pénétration (notamment intracellulaire pour les formes résistantes) et une demi-vie assez longue. Par contre, ils provoquent des intolérances digestives et des interactions médicamenteuses. [11]

Afin d'éviter les administrations répétées, notamment par voie intraveineuse, on peut pratiquer un antibiothérapie pulsée c'est-à-dire en doublant les doses mais avec des administrations 2 à 3 fois par semaines seulement, ce qui est souvent efficace, moins traumatisant, et moins cher pour le patient. [17]

b. *Choix du traitement :*

Le choix du traitement se fait en fonction du stade auquel on intervient.

- **Immédiatement après la morsure de tique** : il est inutile de procéder à un traitement antibiotique préventif comme il a pu être suggéré auparavant. Sauf dans les cas particuliers de personnes sensibles ou situées dans des zones d'endémie. [37.a.] [77] [87] [97] [103] Une étude comparative avec placebo a montré que l'utilisation d'antibiotiques n'a aucun intérêt en prophylaxie suite à une morsure. [71]
- **Dès l'apparition des symptômes cutanés** : on recommande l'administration biquotidienne par voie orale de doxycycline à raison de 100mg par prise pendant 15 jours. [11] Une étude récente a montré que la durée pourrait être abaissée à 10 jours. [123] Chez l'enfant ou la femme enceinte on privilégie l'amoxicilline par voie orale à raison de 50 mg/kg/j en 3 prises quotidiennes et ce pendant 15 à 21 jours. On peut également utiliser le céfuroxime axetil (500 mg *per os* deux fois par jours) pendant seulement 10 jours s'il n'y a qu'un érythème migrant. [11] Enfin, les macrolides peuvent être administrés de manière biquotidienne à raison de 500mg/j pendant 15 à 21 jours. La disparition des symptômes doit avoir lieu dans les 20 à 30 jours suivant le début du traitement. [123]
- **Au second stade** : (qui correspond à la dissémination des spirochètes, c'est-à-dire entre autre aux signes articulaires et neurologiques précoces) on peut envisager un traitement identique mais prolongé pendant 30 jours. En cas de non-rémission ou aggravation des symptômes, on utilise par voie IV de la pénicilline ou une céphalosporine de 3ème génération. [77] [97] [123] Ces molécules présentent une bonne diffusion au niveau articulaire et dans le système nerveux central. On utilise le même traitement dans les formes cardiaques ou oculaires. [123]
- **Dans les formes chroniques** : on utilise les céphalosporines principalement, par voie IV et pendant un temps assez long. Cependant, alors que certains proposent un traitement s'étalant sur 6 mois à 1 an [17], une étude menée par le NIAIDS [58] a montré que l'administration d'antibiotiques sur de longues durées pour les cas chroniques n'apportait aucune amélioration aux patients.
- **Des cas réfractaires au traitement** : ou encore avec rémission puis rechutes périodiques existent. Dans ces cas, il est souvent utile d'évaluer les compétences immunitaires du patient ou les co-infections possibles [17]. Pour les manifestations du syndrome post-Lyme il n'y a pas de thérapeutique connue. [51] [58] [79] [97] [105]

Des mécanismes de résistance ou d'échappement aux antibiotiques ont été découverts chez *Borrelia burgdorferi*. [17] Elle produit par exemple une bêta-lacatamase qui explique certains échecs thérapeutiques par la pénicilline ou les céphalosporines. Cependant, ce système enzymatique semble être dépassé par des doses élevées d'antibiotiques, par des perfusions continues ou encore par des formes dépôts. L'enveloppement intracellulaire de la bactérie (que nous avons évoqué à propos de la pathogénie), la protège également de l'action des antibiotiques. Une couche S de glycoprotéines a été mise en évidence et empêcherait le passage des antibiotiques. Enfin, certaines souches s'avèrent insensibles à l'action de certaines famille d'antibiotiques ; *Borrelia burgdorferi* peut passer de manière réversible sous une forme kystique ou forme L, dépourvue de paroi, et donc insensible à l'action de certains antibiotiques. [63] [117]

c. *Thérapeutique adjuvante :*

Immédiatement après le début du traitement, dans les heures suivant l'injection, on observe une phase d'aggravation transitoire des symptômes, connue sous le nom de réaction de Jarisch-Herxheimer, que l'on explique comme une réaction inflammatoire suivant la lyse des spirochètes.[37.a.] [38] Une injection de corticostéroïdes en complément de la première injection permet d'éviter cette réaction qui régresse spontanément en 1 à 2 jours. [82]

Hormis dans ce cas, l'efficacité des anti-inflammatoires stéroïdiens (par voie parentérale ou intra-articulaire) n'est pas prouvée. [77]

Dans le cas d'arthrites de Lyme, une synoviectomie sous arthroscopie peut être envisagée. Les traitements antibiotiques prolongés peuvent provoquer des infections par les levures qui seront gérées par des traitements locaux (nystatine, antiseptiques, yaourt…).

D'autres part, la gestion de la récupération ne doit pas être négligée pour les formes chroniques avec notamment la possibilité de prescrire des antidépresseurs, de la kinésithérapie, des compléments alimentaires… [17]

2. Chez les bovins :

Le manque de données nous amène à calquer les traitements sur ceux destinés à l'Homme. Chez les bovins on utilise principalement les tétracyclines et la pénicilline car leur coût est moins élevé. [56] [77] [82]

On utilise plutôt l'oxytétracycline par voie intraveineuse à la posologie de 10 mg/kg/j. La durée du traitement est fonction de l'amélioration de l'état de l'animal et varie de 3 jours à 3 semaines. [56] [82] [89] Quant à la pénicilline, elle est utilisée sous forme procaïne à raison de 30.000 à 45.000 UI/kg/j en IM pendant 10jours, suivie d'injections de benzathine pénicilline en IM pendant 10 jours.[89]

Les tétracyclines sont à éviter sur les jeunes animaux et les vaches gestantes ou en lactation, mais sont tout de même utilisés.[82] Aucune réaction de type Jarisch-Herxheimer n'a été décrite chez les bovins. Par comparaison avec la symptomatologie humaine, elle se traduirait par une hyperthermie, une augmentation du gonflement articulaire et de la douleur pendant les 24 premières heures du traitement. De ce fait, cette réaction a peut-être lieu chez les bovins mais ne peut être mise en évidence du fait de symptômes frustes.

La prescription d'anti-inflammatoires peut améliorer le confort de l'animal. [65] [89]

Le traitement de la borréliose de Lyme peut donc s'alourdir très rapidement et la durée des protocoles engendre un coût non négligeable, que se soit chez l'Homme ou chez l'animal. Ainsi la prophylaxie s'impose d'elle-même, pour intervenir en amont de la maladie.

IV. Prévention :

La prévention passe par des mesures indirectes de lutte contre le vecteur appelées prophylaxie sanitaire et des mesures directes de lutte contre l'infection ou prophylaxie médicale.

1. Prophylaxie sanitaire :

a. Informer :

La sensibilisation des population qui passe par l'information sur la maladie est la première étape.
C'est l'étape la plus importante et elle s'est beaucoup développée tant aux Etats-Unis qu'en Europe. [20] [64] [67] [68] [79] [101] [103] [112]

En France, l'Institut Pasteur a créé un CNR (Centre National de Référence) *Borrelia* et l'Institut de Veille Sanitaire (IVS) a mis en place un réseau d'épidémiosurveillance en mars 2001 destiné à décrire précisément les caractéristiques et l'incidence de la maladie en Alsace. [24] [32] Enfin, l'INSERM a mis en place une étude via le réseau sentinelle pour évaluer l'incidence française et sensibiliser les praticiens. [91]

L'information porte non seulement sur la maladie elle-même mais aussi, et surtout, sur les mesures de protection afin d'éviter les morsures de tiques. On recommande donc : d'éviter les zones d'endémie en période à risque et d'éviter de marcher hors des chemins ou de s'asseoir dans l'herbe, et de porter des vêtements couvrants éventuellement imprégnés de répulsifs [70] ou d'insecticides [77] [87] [97], de porter des chaussures fermées , le tout de couleur claire pour repérer les tiques plus facilement [79] .

b. Lutter contre les vecteurs :

Dans le milieu, la lutte pose des problèmes écologiques, de par l'abondance et la répartition large des tiques dans des milieux d'accès difficiles. [37.a.] [103] L'épandage d'acaricides dans les pâturages donne de bons résultats mais on s'expose à des risques de résistance. A proximité des jardins et des pâtures, on peut débroussailler, tondre régulièrement la pelouse et ramasser les feuilles mais l'effet reste limité.
La lutte contre les tiques peut aussi s'effectuer au niveau des réservoirs ou des animaux domestiques. L'utilisation de colliers ou d'insecticides en spot-on (pyréthrinoïdes, organophosphorés) permet de limiter l'infestation chez le chien. Chez les bovins également, on peut utiliser les antiparasitaires externes comme les organochlorés, la fluméthrine ou les avermectines.

La dispersion d'appâts pour les rongeurs dans des boites dont les parois sont imprégnées d'acaricides ou encore de coton imbibés qui serviront a réaliser leur nid ont été essayées. Cependant, ces techniques restent limitées car elles sont onéreuses, ont une faible rémanence et des conséquences non négligeables sur l'environnement. [37.a.] [87] [103] Chez les

cervidés, l'utilisation de topiques comme les pyréthrinoïdes ou de traitement systémique par les avermectines est en cours d'étude.[103]

c. L'inspection visuelle associée au retrait des tiques :

Il est important de contrôler son propre corps et celui des enfants après chaque sortie. En effet, les tiques ne sautent pas mais rampent jusqu'à la pointe des herbes puis s'accrochent au passage de l'hôte et enfin migrent sur les vêtements. Les sites de prédilection sont la tête, le cou, l'arrière du genou et des chevilles, mais également les orteils, les oreilles et au niveau des aisselles et de l'aine. [103]
De même il faut contrôler le corps des animaux domestiques. [37.a.] [77]

Pour retirer une tique il suffit de la saisir (avec les doigts ou à l'aide des crochets prévus à cet effet :Tire-Tic®, Crochet O'Tom® comme le montre la figure 23) à la base du corps, c'est-à-dire là où elle est attachée, et tourner doucement dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (« en dévissant ») sans tirer dessus. Ceci va permettre de décrocher les pièces buccales et donc de ne pas laisser la tête en place. Ensuite il faut désinfecter le site de la morsure et mettre la tique dans de l'alcool pour la tuer.

Figure 23 : Crochet Tire-Tic®

Une morsure est infectante à partir de 24 à 48h, ceci laisse donc le temps de la retirer. [20] [103]
Les autres techniques de retrait telles que : l'allumette brûlante, l'alcool, l'éther, le pétrole gélifié ou l'essence de térébenthine sont à proscrire car elles entraînent une régurgitation des spirochètes par l'intestin de la tique et facilitent donc la transmission des pathogènes. [20] [37.a.] [97] [103]

2. <u>Prophylaxie médicale</u> :

C'est l'utilisation de l'immunité active : elle passe donc par la vaccination.

Chez l'Homme, seul le vaccin LYMErix de Smithkline Beecham a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 1998. Mais il a été retiré du commerce en février 2002. [117] [113]
C'était un vaccin recombinant monovalent, utilisant la lipoprotéine OspA. Il induisait la synthèse d'anticorps qui, s'ils étaient en quantité suffisante, tuaient les borrélies dans l'intestin de la tique avant leur migration vers les glandes salivaires. [46] [94] Ce vaccin n'était par contre pas efficace une fois le patient infecté car OspA n'est plus exprimée une fois dans l'hôte. [60] [77] [113]

L'utilisation de ce vaccin était de toute façon limitée par plusieurs inconvénients majeurs :

- L'immunité n'était acquise qu'à partir de 3 injections (donc au minimum après 3 mois) [46]
- Il était inutilisable chez les enfants de moins de 15 ans. [20]
- Il n'était que partiellement efficace en Europe du fait que les protéines OspA sont antigéniquement différentes en fonction des espèces. Ainsi les infections à *B. garinii* et *B. afzelii* n'étaient pas couvertes par le vaccin.
- La suspicion d'un processus auto-immun impliqué dans les arthrites de Lyme et lié à la protéine OspA a limité son utilisation. Cependant, l'étude comparative vaccination/placebo n'a pas montré de différence significative quand au développement des arthrites. [46]

Un nouveau vaccin est actuellement à l'étude, utilisant la protéine OspC qui est exprimée directement chez l'hôte et qui déclencherait une réponse protectrice chez les animaux vis-à-vis de toutes les souches de *Borrelia burgdorferi sensu lato*. [94]

Les personnes ayant été touchées par l'arthrite de Lyme gardent un taux d'anticorps suffisamment élevé pour ne pas nécessiter de vaccination. Par contre, les patients ayant eu seulement un érythème migrant, les personnes en zone d'endémie ou encore les personnes exposées ou à risques (les forestiers par exemple) sont des candidats potentiels à la vaccination. [46]

Chez les animaux, il existe un vaccin chez le chien, appelé MERILYM®, contenant une souche française de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* inactivée et adjuvée par de l'hydroxyde d'aluminium, dont l'efficacité et l'innocuité ont été prouvés. [33] [77]
Chez le cheval, des essais concluants ont été réalisés aux Etats-Unis avec vaccin recombinant de la protéine OspA. [21] Mais aucun vaccin n'est commercialisé à ce jour.
Chez les bovins, aucune publication à ce jour n'est disponible sur ce sujet.

Jefferson a noté que le vaccin n'est pas une prévention de première intention pour la maladie de Lyme. La prévention des morsure de tiques est beaucoup plus importante. Malheureusement, malgré la présentation de la prévention personnelle comme étant la pierre angulaire de la prévention de la maladie de Lyme, l'incidence de la maladie continue de croître.

Comme nous l'avons vu précédemment, *Borrelia burgdorferi* est très résistante, que ce soit aux défenses immunitaires de l'hôte (cf. partie pathogénie) ou au traitements mis en place (comme vu ci-dessus). Cette propriété rend son diagnostic particulièrement difficile.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Diagnostic

La borréliose de Lyme est une maladie difficile à diagnostiquer. En effet, les signes cliniques en plus d'être multiples et variés sont inconstants. Ainsi, la présence de lésions pathognomoniques comme l'érythème migrant n'est pas toujours observé. De plus, il existe aussi des manifestations sub-cliniques ainsi que des manifestations tardives sans qu'aucune manifestation précoce n'ait été observée.

C'est pourquoi toute notion de morsure de tique doit faire suspecter la maladie de Lyme.
Ainsi, le diagnostic doit être fondé sur l'ensemble des données : cliniques, épidémiologiques, de laboratoire et même parfois thérapeutiques.

Nous aborderons dans un premier temps les techniques diagnostiques de laboratoires puis dans un second temps le diagnostic différentiel et enfin les particularités du diagnostic chez les bovins.

I. Méthodes biologiques et histologiques non spécifiques :

D'après [63] [103] [122]

1. Analyses sanguines :

Les tests hématologiques et biochimiques ne révèlent généralement aucune anomalie que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire.

Les paramètres du processus inflammatoire peuvent être augmentés mais ne constituent en aucun cas un élément spécifique du diagnostic.
De même on peut observer une augmentation des globulines sériques, du fibrinogène, des globules blancs ou du taux de sédimentation.
Enfin souvent lors d'arthrites, des cryoglobulines sont présentes mais les tests des facteurs rhumatoïdes ou des anticorps antinucléaires sont souvent négatifs.

Toutes ces modifications ne sont pas systématiques ni spécifiques.

2. Analyses du liquide céphalorachidien :

Chez l'Homme, dans les cas de neuroborréliose aiguë, on observe une pléiocytose (c'est-à-dire un comptage de lymphocytes entre 30 et 3000/ 3µL) suivie d'une hyperleucocytose.
Le LCR garde un aspect clair mais on constate une élévation du taux protéique.
La production intrathécale d'IgM ou d'IgG peut aider au diagnostic.

Pour les neuroborréliose chronique, on observe très fréquemment la production d'anticorps intrathécale. C'est un des meilleurs critères de différenciation avec la sclérose en plaques.
Par contre, les cas de polyneuropathie chronique présentent des analyses de LCR normales.

3. Analyses du liquide synovial :

L'analyse montre une augmentation de la lignée blanche (comprise entre 500 et 110.000 cellules par mm^3) et une concentration protéique augmentée se situant entre 30 et 80 g/L (N= 15 à 30 g/L).

4. Histologie :

L'érythème migrant, qui correspond à une infiltration périvasculaire par des lymphocytes et des plasmocytes, est en général non spécifique mais on peut l'utiliser pour différentier d'autres affections dont l'histologie est plus caractéristique.

Le lymphocytome borrélien se caractérise par une infiltration majoritairement lymphocytaire du derme mais avec parfois des plasmocytes, des macrophages et des éosinophiles. Il est parfois difficile à différentier d'une lésion de maladie de Hodgkin.

L'acrodermatite chronique atrophiante est caractérisée par une infiltration lymphocytaire du derme et du tissu sous-cutané ainsi que par une télangiectasie. Son histologie n'est pas caractéristique mais peut aider au diagnostic.

II. Méthodes spécifiques :

1. Examen direct :

L'observation directe peut se faire :

- en microscopie sur fond noir : on observe les *Borrelia* irrégulièrement enroulées et aux extrémités droites. Les spires sont nettement visibles à l'objectif x25 et on voit de lents mouvements de rotation.(Figure 24)
- Après coloration de Giemsa : les *Borrelia* apparaissent en violet sur fond noir.
- L'imprégnation argentique : on l'utilise principalement dans les prélèvements biopsiques pour mettre en évidence des spirochètes.(Figure 25)
- L'immunofluorescence directe : historiquement en 1986-87, Burgess *et al.* effectuent les premiers diagnostics de la maladie de Lyme en mettant en évidence par immunofluorescence *Borrelia burgdorferi* sur un prélèvement de chambre antérieure.

Mais il faut retenir que l'observation directe n'est pas utilisée pour le diagnostic car trop dépendante de l'intervenant. De plus, les artéfacts nombreux sont difficiles à différencier de *Borrelia burgdorferi* qui sont en petit nombre dans les tissus. Par contre on l'utilise pour contrôler les cultures ou détecter des spirochètes dans les tiques. [86] [122]

Figure 24 : *Borrelia burgdorferi* observée
en microscopie à fond noir
(grossissement x800)
[72]

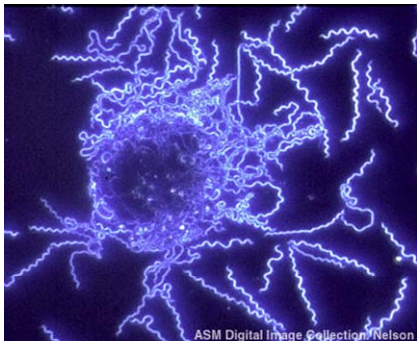


Figure 25 : *Borrelia burgdorferi* observée au microscope
optique, après imprégnation
argentique
(grossissement x600) [73]

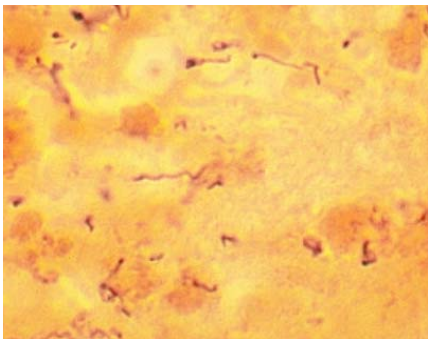
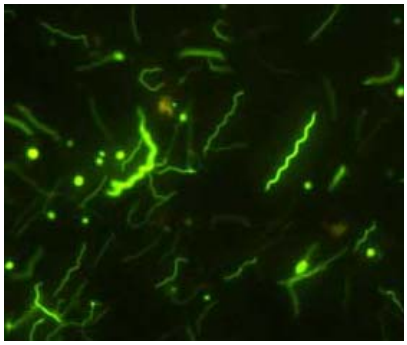


Figure 26 : *Borrelia burgdorferi* observée en immunofluorescence
(grossissement x800) [74]



2. Culture :

Borrelia burgdorferi est très difficile à cultiver et ce sont des laboratoires spécialisés qui s'en chargent. Mais la culture est de moins en moins utilisée, en effet elle est fastidieuse et de résultat plutôt aléatoire.

On l'utilise dans les cas atypiques, ou quand la suspicion est forte mais la sérologie négative comme cela peut être le cas chez les patients immunodéficients.

La culture à partir d'ECM ou d'ACA permet la mise en évidence de *Borrelia* pour respectivement 80% et 60% des cas. [103]

Les résultats à partir de LCR sont moins probants (17%) et les prélèvements de sang, de liquide synovial ou de tissu cardiaque ne sont pas utilisés.

Enfin, la biopsie de membrane synoviale semble donner des résultats mais ,dans ce cas, on procède plutôt par PCR. [122]

3. Amplification génique :

L'amplification génique *in vitro* par Polymérase Chain Reaction (PCR) est un outil très puissant (sensibilité et spécificité élevées) qui permet la détection de quantité extrêmement faible d'ADN de *B. burgdorferi.*

Différents prélèvements humains ont été testés comme : le sang, l'urine, la biopsie cutanée, le liquide articulaire, la biopsie synoviale ou encore le liquide céphalo-rachidien. [55]

Les cibles utilisées sont : les gènes OspA ,OspB, p60, fla, des séquences chromosomiques clonées au hasard, une séquence située sur un plasmide conservé de 30kb, les gènes ribosomiaux ou encore l'espace intergénique entre rrf et rrl (les gènes ribosomiaux). [87]

Les différentes études réalisées sur biopsie d'ECM montrent une sensibilité équivalente ou supérieure à celle de la culture tout en permettant de s'affranchir des contaminations dues à la flore cutanée. De plus elle permet de fournir une réponse rapide.
Mais le manque de standardisation de cette méthode en limite l'usage. On n'utilise la PCR que dans les cas de sérologie équivoque ou négative avec un tableau clinique en faveur ou encore pour confirmer une sérologie positive.
Il est important de noter qu'une PCR négative ne permet en aucun cas d'affirmer que le patient est exempt de maladie de Lyme. [122]

Pour améliorer la sensibilité et la spécificité de la méthode on peut combiner 2 séquences cibles (par exemple les gènes p60 et OspA). Cette méthode a, de plus, l'avantage de réaliser une double amplification dans un unique tube et donc d'empêcher les risques de contamination. On peut également associer à la PCR une hybridation avec une sonde interne et/ou analyse du polymorphisme de restriction de l'amplicon. Un autre système de détection consistant en une hybridation sandwich d'une molécule d'ADN cible, entre une sonde de capture fixée sur un support, et une sonde de révélation marquée de manière non radioactive a été mis au point et présente l'avantage de la double spécificité de l'hybridation ADN-ADN. [87]

Il existe néanmoins des cas de faux positifs, par exemple par contamination entre échantillons ; et de faux négatifs dus, par exemple, à une quantité d'ADN cible inférieure au seuil de détection de la méthode.

4. Sérologie :

C'est la technique la plus utilisée actuellement car c'est la seule aide de laboratoire disponible de façon courante.

Elle est utilisée autant pour les études épidémiologiques à large échelle (en criblage) qu'individuellement pour les patients.
Les tests sérologiques font partie du diagnostic indirect, c'est-à-dire qu'ils exploitent la réponse immunitaire de l'hôte mais ne donnent pas la preuve de la présence du germe dans l'organisme. Ainsi une sérologie positive montre qu'il y a effectivement eu une exposition au germe à un moment donné, mais n'est pas synonyme de maladie. [48] De même, l'absence d'anticorps ne signe pas l'absence de maladie mais peut également être le fait d'une immunodéficience de l'hôte. [77] [122]

La réponse immune : [122]
Elle dépend beaucoup de l'individu et chez un même patient, varie au cours de l'infection.
La production d'IgM intervient en général 3 semaines après le début de l'infection. Mais celle-ci peut demeurer absente et ceci dans les stades précoces comme tardifs.
Habituellement la synthèse d'IgM est maximale après 6 à 8 semaines puis diminue après 3 mois mais peut mettre plus d'un an à disparaître après traitement.
La synthèse d'IgG est détectable au bout d'1 à 3 mois et peut persister des années, même après guérison.

On peut résumer la réponse humorale en trois phases :

Tableau IV : Les 3 stades de la réponse humorale. [122]

Stades	Réponse immune
I stade précoce infection locale	Production d'IgM (environ 3 semaines après l'infection) puis IgG (à partir de la 6ème semaine). Souvent séronégatif. IgM souvent indétectables surtout dans le cas d'infections de courte durée.
II stade précoce infection disséminée	La production d'IgG est prédominante et détectable, c'est à ce moment que les sérologies peuvent être réalisées. La production d'anticorps intrathécale intervient pour les cas de neuroborréliose.
III stade tardif infection chronique	Le titre en IgG reste élevé dans les cas d'ACA ou d'arthrite. Les IgM ne sont plus détectables. La production intrathécale d'anticorps persiste lors de neuroborréliose chronique.

Borrelia burgdorferi présente de nombreux antigènes (cf. pathogénie) qui interviennent dans la réponse humorale, plus l'infection évolue et plus les antigènes mis en cause sont nombreux.

Cependant, de nombreux antigènes parmi ceux-ci montrent des réactions croisées avec d'autres espèces de *Borrelia*, d'autres Spirochètes (par exemple des Tréponèmes) ou d'autres familles bactériennes (*E. coli* par exemple). Ceci s'explique par le fait que les protéines du choc thermique HSP60 et HSP70 sont assez répandues, ainsi que la protéine flagellaire p41.

De plus la réponse immune varie en fonction de la souche utilisée. Cette donnée est importante pour le diagnostic, notamment en Europe, car les trois souches majeures y sont présentes.
La production d'anticorps semble moins importante chez les patients européens qu'aux Etats-Unis. De plus on trouve plus d'infections subcliniques en Europe. [48]

Ainsi les tests sérodiagnostiques ont des sensibilité et spécificité moins bonnes en Europe qu'aux Etats-Unis. En fait on ne trouve pas de différences de réactivité entre les souches

testées avec l'ELISA. Par contre l'immunoblot présente des bandes spécifiques en fonction de la souche choisie.
Par exemple, les patients atteints de méningo-polynévrite reconnaissent plus d'antigènes de *B.garinii* et ceux atteints d'arthrite ou d'acrodermatite ceux de *B. afzelii*. [36] [122]

Principaux tests utilisés en diagnostic : d'après [77] [87] [97] [103] [122]
On les classe en 3 catégories, suivant la nature des antigènes utilisés :

Tableau V : tests sérologiques utilisés pour le diagnostic de la maladie de Lyme. [122]

Tests	Spécificité
1ère génération ELISA sur antigènes ultra-centrifugés Immunofluorescence (sans absorption avec des Tréponèmes de Reiter) Hémagglutination indirecte (antigènes ultra-centrifugés)	80-90%
2ème génération Immunofluorescence (avec absorption) ELISA sur antigènes purifiés (avec absorption) ELISA avec antigène flagellaire Immunoblot utilisant des lysats de cellules entières	90-95%
3ème génération ELISA sur protéines recombinantes Immunoblot sur protéines recombinantes	90-95%

L'immunofluorescence indirecte (IFI) :
Ce fut une des premières méthodes disponibles sur le marché.
Le test repose sur la reconnaissance du complexe antigène-anticorps par un conjugué anti-immunoglobuline, dirigé contre les anticorps du sérum, et marqué par un fluorochrome. On teste des dilutions croissantes jusqu'à disparition de la fluorescence.
On peut augmenter la spécificité par une étape préalable d'absorption par un antigène voisin de Tréponème appelé l'antigène de Reiter.
Ce test est encore souvent utilisé malgré la difficulté de lecture des préparations (faible reproductibilité et critères de positivité variables) qui est subjective.
De plus c'est une technique peu coûteuse et très bien adaptée pour les petites séries, donc utilisable en routine.
Nous développerons l'utilisation de cette méthode dans la partie expérimentale.

L'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) :
C'est la méthode la plus utilisée actuellement. Elle est très reproductible et objective, elle est plus spécifique et plus sensible que l'IFI et de plus, est adaptée à la réalisation de très grande série. [54]
Cette technique utilise soit un antigène soluble (*Borrelia* traitée par ultrason ou antigène recombinant) soit un antigène figuré (*Borrelia* inactivée par de la pénicilline et de la streptomycine).
Par contre, le seuil de positivité est à déterminer pour un niveau de sensibilité requis (qui dépend de la population étudiée, de l'utilisation du test) : en général on obtient une dilution seuil au 1/200ème.

Le western blot (ou immuno blot):

Cette méthode est très souvent utilisée comme méthode de confirmation, dans les cas où l'IFI ou l'ELISA ne sont pas concluants.

Cette technique permet une analyse qualitative de la réponse humorale vis-à-vis des différentes protéine de *B. burgdorferi*. En effet elle consiste en une séparation des protéines spécifiques de *Borrelia burgdorferi*, par électrophorèse selon leur poids moléculaires. Ensuite elles sont transférées sur feuilles de nitrocellulose, puis mises en contact avec le sérum à analyser ainsi qu'avec des anticorps anti-globulines pour marquer les complexes. On identifie ensuite les bandes obtenues qui sont spécifiques d'espèces, et on peut même tenir compte de l'intensité des bandes pour évaluer l'intensité de la réponse immunitaire.

Les critères d'interprétation sont en cours d'harmonisation en Europe, car jusque là ils étaient très variables selon les laboratoires.

Certaines bandes sont communes à différentes espèces bactériennes et sont responsables des réactions croisées observées dans les méthodes quantitatives de dépistage. D'autres sont plus spécifiques à *B. burgdorferi* et permettent l'interprétation.

Par exemple, dans l'étude de Magnarelli *et al.* [69] portant sur les bovins, les antigènes utilisés pour l'interprétation sont : OspA (31 kDa), OspB (34 kDa), p35 (35 kDa), la flagelline (41 kDa) et une protéine de poids moléculaire 83/93 kDa. (Ces antigènes sont décrits dans la partie pathogénie) Le principe étant qu'un sérum est positif s'il possède au moins trois de ces bandes.

Dans le kit humain utilisé dans notre étude (cf. partie expérimentale), les antigènes utilisés sont :

- **VlsE :** antigène de 35 kDa, considéré comme spécifique et présent à tous les stades de la borréliose de Lyme dans les sérologie IgG.
- **BmpA ou p39** (cf. pertie pathogénie) considéré comme hautement spécifique des infections avancées.
- **p83** : antigène de 83 kDa associé au cylindre protoplasmique. Il est considéré comme hautement spécifique des stades avancés.
- **BBA36** : antigène de 22 kDa conservé chez toutes les génospécies. C'est un marqueur hautement spécifique des stades avancés.
- **BBO323** : antigène de 42 kDa conservé chez toutes les génospécies. C'est un marqueur spécifique notamment dans les cas de neuroborréliose.
- **Crasp3** : antigène de 21 kDa appartenant à la famille des ERP. C'est un marqueur hautement spécifique des infections avancées.
- **pG** : antigène de 22kDa appartenant à la famille des ERP. C'est un marqueur hautement spécifique des infections avancées.

Dans ce test, la positivité du sérum correspond à l'apparition de deux bandes distinctes.

Les antigènes des barrettes du test Borrelia Ecoline® sont ordonnés de façon à ce que les antigènes réagissant de préférence avec les anticorps de patients atteints d'une borréliose de Lyme en stade précoce, se situe dans la partie proximale. Les antigènes réagissant avec les anticorps des stades avancés sont placés dans la partie distale de la barrette. Ainsi l'aspect optique de la répartition des bandes donne une indication sur le stade de l'infection.

Nous développerons tout cela dans la partie expérimentale.

Rapport-Gratuit.com

D'autres tests peuvent être utilisés, comme **l'hémagglutination indirecte**, la **fixation du complément** ou encore la **mesure de l'activité bactéricide**, mais ces méthodes sont peu usitées en pratique pour le diagnostic de la borréliose de Lyme.

III. Diagnostic différentiel :

Le diagnostic clinique est, le plus souvent, insuffisant pour établir le diagnostic de certitude de la maladie de Lyme, et le diagnostic différentiel est très vaste, puisqu'il recouvre un tableau clinique très polymorphe et touchant de nombreux organes.

Parmi les plus fréquents, on retrouve l'encéphalite à tiques, l'ehrlichiose, les chlamydioses, la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer pour les neuroborrélioses. [110] [117]
Mais le lupus érythémateux, le syndrome de Reiters, la myocardite ou la méningite virale font aussi partie du diagnostic différentiel.
Toute cause d'arthrite est à considérer dans les suspicions d'arthrite de Lyme. [97]
Enfin, seul le diagnostic de laboratoire permet de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de maladie de Lyme en s'intégrant dans une démarche diagnostique organisée.

En effet, le principal outil diagnostique dans la maladie de Lyme est la clinique. Les commémoratifs, symptômes et découvertes cliniques sont à l'origine de la décision du diagnostic microbiologique et servent donc à son interprétation.
Ainsi une clinique favorable augmente la valeur prédictive du test utilisé. Pour les cas pathognomoniques (EM par exemple) il n'est pas recommandé de faire un test sérologique.

Dans le cadre du diagnostic sérologique on peut procéder à un test ELISA seul (avec une spécificité minimum de 95%) mais il est plutôt recommandé de réaliser un test à dépistage sensible (c'est-à-dire ELISA ou IFI) suivi d'un western blot de confirmation (dont la spécificité doit atteindre 95%). [43] [54] [103] [122] [124]
Si la clinique et les tests discordent, il faut renouveler les tests 3 à 6 semaines plus tard.

IV. Diagnostic chez les bovins :

Chez les bovins, le diagnostic est principalement thérapeutique, c'est-à-dire qu'on utilise la réponse au traitement et ceci occulte une majorité de cas. [82] [111]

Des critères épidémiologiques sont évidemment pris en compte comme par exemple : l'exposition aux tiques, la saison, la localisation de l'animal en zone d'endémie ou non…

Les critères cliniques principalement utilisés sont : [15] [37.a.] [56] [65] [82] [114]

- Des signes généraux : hyperthermie, abattement, anorexie, chute de production, ….

Ceux si sont peu spécifiques mais ils peuvent devenir de valeur diagnostique si l'épisode est suivi :

- De signes articulaires :boiterie, arthrite des grosses articulation,
- D'autres signes mineurs : avortement, lésions cutanées, œdème mammaire….

Le diagnostic de laboratoire, par la mise en évidence du germe, existe depuis 1984 chez le chien [66], depuis 1986 chez le cheval [16] et chez la vache depuis 1987 [15]. Dès 1986, une étude sérologique montrait la présence d'anticorps dirigés contre *Borrelia burgdorferi* corrélée avec des arthrites sur les agneaux [49].
Ainsi le diagnostic de laboratoire peut être direct, par mise en évidence du germe dans les prélèvements, par culture, ou plus fréquemment de nos jours, par PCR. [65]
Mais la sérologie reste la plus utilisée, avec mise en évidence indirecte de l'infection par les anticorps dirigés par exemple contre p41 (la protéine flagellaire) par IFI ou par ELISA. [119]
Cependant cette méthode ne doit en aucun cas être dissociée de la clinique, car chez les animaux le nombre d'infections subcliniques est beaucoup plus important que chez l'Homme. [82]
D'autre part, le temps de persistance des anticorps dans l'organisme après une infection est inconnue chez les bovins, et beaucoup de cas ne seraient que des séquelles sérologiques. [69]

Des réactions croisées existent, notamment avec les Tréponèmes impliqués dans la dermatite digitée, qui provoque également chez les bovins une boiterie chronique. [12] [19] [26] [31] [79] Ces réactions croisées sont dues à l'utilisation de la protéine p41 dans les tests ELISA, cette protéine étant très peu spécifique chez les Spirochètes. [69]
On teste aussi souvent les anticorps contre *Leptospira interrogans* pour évaluer de possibles réactions croisées.[69] [119]Enfin, on note une réaction croisée avec *Borrelia theileri* [54] et *Borrelia coriaceae.* [92]

Beaucoup de progrès restent à faire pour faciliter le diagnostic de cette maladie chez les animaux et particulièrement chez les bovins.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Partie expérimentale

Comme nous venons de le présenter dans la première partie, la borréliose de Lyme est une maladie polysystémique qui est très répandue dans l'hémisphère nord.
Cette maladie à vecteur due à *Borrelia burgdorferi sensu lato* affecte non seulement les humains mais aussi les mammifères domestiques. Dans ce cas elle se manifeste par des arthrites et des symptômes généraux.

Le diagnostic chez les animaux est d'autant plus compliqué que les symptômes ne sont pas spécifiques. Chez le chien et chez l'homme, on utilise tout d'abord un test de criblage (IFI ou ELISA) puis un immunoblot (ou western blot) de confirmation.
Chez les bovins, la technique de western blot n'a pas encore été développée et il n'existe pas de kit commercialisé.

Cette étude a pour principal but de tester une technique de western blot (à l'aide d'un kit commercialisé) comme test de diagnostic chez les bovins.
La démarche suivie a donc été identique à celle appliquée pour l'homme ou le chien : un test d'immunofluorescence indirecte (de criblage) suivi d'un test d'immunoblot de confirmation.

Par ailleurs, chaque sérum est accompagné de la liste des symptômes que présentaient l'animal, on pourra donc mettre en rapport les symptômes et les résultats sérologiques.

I. Matériel et méthode :

1. <u>Origine des sérums</u> :

Les 85 sérums analysés proviennent d'animaux présentant un ou plusieurs symptômes suffisamment évocateurs de la maladie de Lyme pour conduire à une demande de sérologie.
Ils nous ont été fournis par des vétérinaires praticiens volontaires en provenance des lieux suivants :

- Laboratoire de développement d'analyse de Ploufragan (22) 48 sérums
- Callac (22) 12 sérums
- Dogneville (88) 7 sérums
- Ernée (53) 5 sérums
- Cressanges (03) 4 sérums
- Luneville (54) 3 sérums
- Meslay-du-Maine (53) 2 sérums
- Quintin (22) 1 sérum
- Lusignan (86) 1 sérum
- Lassay les châteaux (53) 1 sérum
- Pont de Salars (12) 1 sérum

Les symptômes pris en compte par ces vétérinaires pour une suspicion clinique ont été :

- La monoarthrite,
- La polyarthrite,
- L'amaigrissement,
- L'hyperthermie,
- L'engorgement des membres postérieurs,
- Le poils piqué,
- La myocardite,
- L'agalaxie,
- L'avortement,
- Le biotope (où vit l'animal) à tique,
- Les cas humains environnant,
- Les problèmes respiratoires,
- L'animal couché,
- L'œdème mammaire,
- L'ictère,
- Le retard de croissance
- L'hématurie.

Ces sérums ont été prélevés entre le 20 octobre 2003 et le 05 juillet 2005.
Ils ont été conservés congelés jusqu'à la réalisation des sérologies.

Pour les besoins des tests nous avons rajoutés un sérum provenant d'un élevage ne présentant pas de symptômes se rapportant à la maladie de Lyme, et étant situé en forêt de Rambouillet.
Ce sérum provenant d'un jeune bovin n'ayant jamais pâturé a donc été considéré comme négatif.

2. La technique d'immunofluorescence indirecte :

a. *Matériel et réactifs* :

Les lames pour IFI (Lymespot IF, Biomérieux) sont constituées de 10 puits dont le fond est recouvert d'antigènes (Borrelia burgdorferi sensu stricto B31. Ceux-ci sont constitués de lames présentant 10 puits, dont le fond est recouvert d'antigènes (Borrelia burgdorferi sensu stricto B31).
Le tampon utilisé a été un tampon phosphate (PBS : Phosphate Buffer Saline Biomérieux).
L'anticorps marqué est un anticorps de lapin anti-IgG bovine (H+L) fluorescent. (BETHYL lab.)

b. *Protocole :*

Nous avons effectué les tests en deux temps, tout d'abord un criblage de tous les sérums dilués au 1/100 ; puis pour chaque sérum positif une série de tests aux dilutions 1/100, 1/200, 1/400 et 1/800.

La réaction sérologique s'est déroulée de la manière suivante :

- Constitution du tampon PBS (2 litres)
- Dilution de chaque sérum en tampon PBS
- Les sérums dilués sont ensuite répartis dans les puits identifiés au préalable sur chaque lame, à raison de 10µL par puits ; toute contamination entre sérum est à éviter à ce stade de la manipulation
- Les lames sont ensuite placées dans une étuve maintenue humide à 37°C pendant 30 minutes
- Deux lavages sont alors réalisés dans du PBS sous agitation, puis les lames sont soigneusement séchées
- L'anticorps de chèvre anti-IgG de bovin fluorescent est alors dilué au 1/50ème dans une solution de Bleu d'Evans au 1/100ème (Biomérieux)
- Dix microlitres d'anticorps marqué sont ajoutés dans chaque puits ;
- Incubation en étuve 30 minutes à 37°C
- Deux lavages de 10 minutes dans du PBS et séchage
- Montage des lamelles sur les lames avec du Fluoprep (Biomérieux).

Les lames sont ensuite lues au microscope UV (Olympus) au grossissement x1000 en immersion dans l'huile.

Sur chaque lame ont été déposés 8 sérums à tester et deux sérums témoins : un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif.

La lecture a été réalisée en double aveugle, avec comparaison des résultats en présence des lecteurs et reconsidération des sérums pour lesquels les avis divergeaient.
On prend en compte l'intensité de la fluorescence ainsi que le nombre de *Borrelia* fluorescentes par champ pour déterminer la positivité du sérum.
Ces deux paramètres font l'objet d'une évaluation par un système de croix variant de négatif (0) à très positif (++++). Le titre d'un sérum est choisi sur la base d'une intensité de deux croix (++).
Les niveaux de fluorescence de chaque sérum ont été comparés aux témoins positif et négatif de la lame, ce qui permet d'éviter un biais au cours de la lecture, ou en passant d'une lame à l'autre.

3. <u>La technique de western blot :</u>

a. Matériel et réactif :

Nous avons utilisé un kit humain produit par Virotech : Borrelia EcoLine (Line immunoblot IgG/IgM).
Nous avons changé le conjugué fourni (un sérum de chèvre anti-IgG humaine marqué à la phosphatase alcaline) par un sérum de chèvre anti-IgG bovine (H+L) marqué avec la même enzyme (KIRKEGAARD and PERRY lab.).
De plus nous avons parfois remplacé le tampon de dilution sérique (composé de protéines de lait dégraissée) par de l'albumine purifiée de bovin.

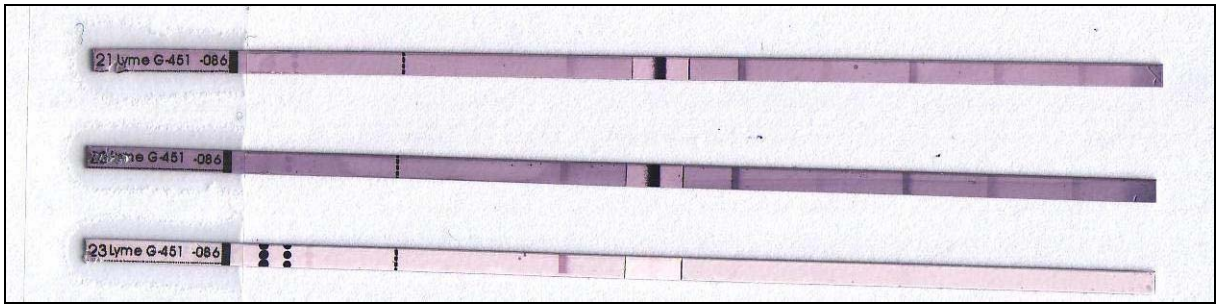
b. *Protocole :*

La réalisation du test s'est déroulé à température ambiante, comme suit :

- Pour chaque sérum à tester, déposer une barrette dans la rainure d'un bac d'incubation propre.
- Pour chaque barrette, déposer 1,5mL de tampon de dilution sérique prêt à l'emploi puis placer le bac sur l'agitateur pendant une minute.
- Ajouter alors 15µL de sérum (à la dilution choisie) ou 100 µL de contrôle par barrette
- Incubation de 30 minutes
- Aspirer ensuite la totalité du liquide des rainures
- Effectuer alors 3 lavages successifs à l'aide de 1,5 mL de tampon de dilution et de lavage chacun durant 5 minutes sous agitation.
- Pendant les lavages, préparer la quantité nécessaire de dilution de conjugué
- Aspirer la totalité du liquide des rainures
- Dans chaque rainure déposer alors 1,5 mL de conjugué dilué
- Incubation de 30 minutes
- Aspirer ensuite la totalité du liquide des rainures
- Puis, réaliser le lavage des barrettes par une incubation de 3 fois 5 minutes avec 1,5 mL de tampon de dilution. Entre chaque lavage aspirer la totalité du liquide des rainures
- Rinçage des barrettes avec 1,5 mL d'eau déminéralisée/désionisée
- Aspirer la totalité du liquide des rainures
- Déposer alors 1,5 mL de substrat en solution prêt à l'emploi et le laisser se développer sur l'agitateur pendant 10 minutes (plus ou moins 3 minutes)
- Arrêter le développement de la couleur en égouttant le substrat.
- Laver les barrettes 3 fois, sans incubation intermédiaire, avec 1,5 mL d'eau distillée/désionisée
- Égoutter l'eau et faire sécher les barrettes sur un papier absorbant propre.

La lecture a été réalisée après séchage complet des barrettes (Figure 27). Les résultats on ensuite été reportés sur les feuilles fournies dans le kit. (Annexe 4)

Figure 27 :Les barrettes prêtes pour la lecture (deuxième série de tests).



II. Résultats :

1. Les motifs de consultation :

Les résultats sont présentés en annexe 5, on y trouve :

- Le numéro ou le nom de l'animal s'il est fourni
- Le numéro de l'analyse (d'après le système de numérotation du laboratoire de microbiologie de l'ENVA)
- La description de l'animal (si elle est fournie)
- Les symptômes observés s'ils ont été transmis ; dans le cas contraire, ils sont considérés comme « inconnus » et sont classés dans cette catégorie
- Les résultats de l'IFI.

Parmi les 85 sérums envoyés une grande partie n'étaient pas accompagnés de commémoratif.
Ainsi 32 sérums, soit 37,6%, sont suspects de Lyme mais les symptômes qui les rendent suspects restent inconnus.
Il y a donc 53 sérums (62,4%) avec des données cliniques exploitables.

La présence d'un symptôme n'est pas exclusive, un animal peut présenter jusqu'à 4 symptômes en même temps.
Les 3 symptômes principaux sont (cf tableau VII) :

L'hyperthermie avec 27 sérums soit :	**31,7%** des sérums totaux	ou **50,9%** des sérums cliniquement exploitables
La monoarthrite avec 14 sérums soit :	**16,5%** des sérums totaux	ou **26,4%** des sérums cliniquement exploitables
Le biotope à tique avec 10 sérums soit :	**11,8%** des sérums totaux	ou **18,9%** des sérums cliniquement exploitables

2. Les résultats sérologiques :

a. L'IFI :

Nous avons analysés 85 sérums en immunofluorescence indirecte(cf. annexe 5). Ces sérums ont été prélevés entre le 20 octobre 2003 et le 05 juillet 2005.
On obtient :

- 11 sérums négatifs (c'est-à-dire négatif au 1/100ème)
- 28 sérums positifs au 1/100ème
- 28 sérums positifs au 1/200ème
- 14 sérums positifs au 1/400ème
- 4 sérums positifs au 1/800ème

Les résultats sont retranscrits dans le tableau VI.

Tableau VI : Les résultats d'IFI.

Dilution	Nb de sérums	Pourcentage	Résultats
Négatif	11	12,90%	**Négatifs** (45,85%)
1/100	28	32,95%	
1/200	28	32,95%	**Positifs** (54,25%)
1/400	14	16,50%	
1/800	4	4,70%	
Total	85	100%	

Nous avons choisi la dilution 1/200ème comme seuil de positivité, ceci en accord avec différentes publications sur le sujet.

Le tableau VII montre la répartition des titres par symptômes.

Tableau VII : Répartition des titres par symptôme.

	inconnu	monoarthrite	polyarthrite	biotope tique	amaigrissement	hyperthermie	engorgement postérieurs
POSITIF	**21**	**10**	**2**	**4**	**4**	**13**	**4**
dont 1/200	12	4	2	3	0	11	3
dont 1/400	7	4	0	1	3	1	1
dont1/800	2	2	0	0	1	1	0
NEGATIF	**11**	**4**	**4**	**6**	**4**	**14**	**0**
dont1/100	8	2	4	1	3	13	0
dont neg	3	2	0	5	1	1	0
TOTAL	**32**	**14**	**6**	**10**	**8**	**27**	**4**

	poils piqués	myocardite	agalaxie	avortement	cas humain	problème respiratoire
POSITIF	**1**	**3**	**1**	**0**	**1**	**1**
dont 1/200	0	2	0	0	1	1
dont 1/400	1	1	1	0	0	0
dont1/800	0	0	0	0	0	0
NEGATIF	**1**	**1**	**0**	**7**	**0**	**2**
dont1/100	1	1	0	7	0	2
dont neg	0	0	0	0	0	0
TOTAL	**2**	**4**	**1**	**7**	**1**	**3**

	animal couché	oedème mammaire	ictère	retard de croissance	hématurie
POSITIF	**0**	**0**	**0**	**1**	**0**
dont 1/200	0	0	0	1	0
dont 1/400	0	0	0	0	0
dont1/800	0	0	0	0	0
NEGATIF	**1**	**1**	**1**	**0**	**2**
dont1/100	1	0	0	0	0
dont neg	0	1	1	0	2
TOTAL	**1**	**1**	**1**	**1**	**2**

b. Le western blot :

La mise en place des différents paramètres, dont les dilutions, s'est faite en plusieurs étapes. Tous les résultats sont présentés en annexe 4.

Première série de tests : barrettes 30 à 24

Nous avions fixé la dilution des sérums au **1/100ème**.
Pour la dilution du conjugué nous avons tenu compte d'une part de celle prévue initialement par le mode d'emploi, soit une dilution comprise entre 1/2500ème et 1/10 000ème , et d'autre part de celle d'une étude parue en 2004, soit 1/1000ème. Nous avons ainsi décidé d'effectuer 2 dilutions au **1/1000ème** et au **1/2500ème** pour couvrir une bande plus large de la zone possible. Ces 2 dilutions ont été effectuées dans le tampon de dilution sérique.

Les 7 barrettes ont été utilisées comme suit :

- Un témoin positif : constitué du cut-off ainsi que du conjugué et du substrat fournis.
- Deux témoins négatifs : constitués de tampon, du conjugué anti-bovin dilué au 1/1000ème dans le premier et au 1/2500ème dans le second et du substrat fourni.
- Deux sérums positifs : constitués d'un sérum positif au 1/800ème en IFI (le sérum A05-18), du conjugué anti-bovin aux 2 dilutions pré-établies et du substrat fourni.
- Deux sérums négatifs : constitués d'un sérum négatif en IFI (le sérum A05-64.1), du conjugué anti-bovin aux 2 dilutions pré-établies et substrat fourni.

A l'exception de la bande cut-off du témoin positif, nous n'avons obtenu aucune bande (cf. annexe 4-a).

Deuxième série de tests : barrettes 23 à 21

Pour cette deuxième série de tests, nous avons décidé de baisser la dilution des réactifs pour augmenter les chances de réaction ainsi, nous avons fixé la dilution des sérums au **1/50ème** , et celles du conjugué au **1/250ème** et au **1/500ème**. Il est important de noter qu'à partir de ce moment la dilution du conjugué s'est effectuée dans le tampon de dilution et de lavage et non plus dans le tampon de dilution sérique.
Parmi les 3 barrettes il y avait :

- Un témoin positif.
- Un sérum positif au 1/800ème en IFI (le sérum A05-18) avec le conjugué au 1/250ème.
- Le même sérum positif avec le conjugué au 1/500ème .

Nous avons obtenu la bande cut-off sur le témoin positif et toutes les bandes avec des intensités variables sur les 2 sérums ainsi qu'un important bruit de fond (cf. figure 27 et annexe 4-b).
La bande p39 était d'une très forte intensité (bien supérieure à celle « standard » de la bande cut-off).

Troisième série de tests : barrettes 20 à 16

Lors de cette série nous avons fixé la dilution des sérum au **1/100ème** (dans l'objectif de diminuer le bruits de fond) et remonté celles du conjugué au **1/500ème** et au **1/1000ème** .

Rapport-Gratuit.com

Nous avons utilisé 5 barrettes :

- Deux sérums positifs : le sérum A05-117 associé au conjugué anti-bovin aux deux dilutions fixées.
- Deux sérums positifs : le sérum A05-64.1 associé au conjugué aux deux dilutions fixées.
- Un témoin négatif avec le conjugué dilué uniquement au 1/100ème.

Les résultats étaient encourageant : le bruit de fond avait pratiquement disparu, les bandes différaient et avaient des intensités différentes suivant les sérums (cf. annexe 4-c). Il y avait également des bandes sur le témoin négatif. La bande p39 était de très forte intensité sur toutes les barrettes.

Quatrième série de tests : barrettes 15 à 13

Lors de cette série, nous avons fixé la dilution des sérums au **1/50ème** et celle du conjugué au **1/1000ème** . En effet, c'est la dilution qui a eu le meilleur rendu précédemment, c'est-à-dire des bandes d'intensité ni trop faible ni trop forte et un bruit de fond pas trop développé.

Nous avons effectué 3 tests :

- Un sérum positif au 1/800ème en IFI (le sérum A05-18)
- Un sérum négatif (le sérum A05-64.1)
- Un témoin négatif.

Il est important de noter, qu'au vu des précédents résultats nous avons pensé que le tampon de dilution sérique (constitué de poudre de lait de vache) interagissait avec les antigènes et faussait les résultats.
C'est pourquoi nous l'avons remplacé, à partir de ce test, par de l'albumine bovine purifiée : tampon BSA à 5%.
Nous avons obtenu certaines bandes uniquement et à des intensités variables (cf. annexe 4-d) mais des bandes étaient visibles sur les 2 sérums et sur le témoin négatif.
La bande p39 reste très intense sur tous les tests.

Cinquième série de tests : barrettes 12 à 10

Lors de cette série, nous avons dilué les sérums au **1/50ème** et le conjugué au **1/2000ème** .
Nous avons remplacé le sérum bovin négatif en IFI par le sérum d'un jeune bovin n'ayant jamais pâturé et se situant dans un élevage sans symptômes. Ce sérum est donc considéré comme potentiellement négatif et provenant d'un animal n'ayant sans doute jamais rencontré le germe .
Nous avons effectué 3 barrettes :

- Un sérum positif (le serumA05-18)
- Le sérum négatif de Bissy (n°653)
- Un témoin négatif.

Nous avons obtenu un certain nombre de bandes différentes suivant la barrette et d'intensité variable. La bande p39 reste très intense et est présente sur tous les tests, même sur le témoin négatif (cf. annexe 6-e)

Sixième série de tests : barrettes 9 à 2

Pour cette série nous avons utilisé 8 barrettes dont 4 sérums positifs à l'IFI :

- A04-129 positif au 1/800ème ,
- A04-134 positif au 1/400ème et provenant d'un animal jeune,
- A04-91 positif au 1/400ème et provenant d'un taureau,
- A04-93 positif au 1/400ème ,

et 4 sérums négatifs (au 1/100ème)

- A06-31.1,
- A06-31.5,
- A06-31.6,
- A05-77,

tous dilués au **1/50ème** dans du BSA à 5%.
Le conjugué a été dilué au **1/2000ème** .

Plusieurs bandes ont été obtenues de faible à très faible intensité (excepté la bande p39) pour tous les sérums sans exception (cf. annexe 4-f).

III. Discussion :

1. Sur la méthodologie :

- Le recrutement des sérums a été fait à partir de suspicion clinique. Ainsi cette étude ne correspond pas à une enquête sérologique : il n'y a pas de population à proprement parlé, ni d'échantillon.

Ce n'est pas une enquête prospective : le recrutement introduisant un biais. De même, la localisation des animaux est plus ou moins centrée sur deux régions : l'ouest (et particulièrement la Bretagne) et l'est du pays (dans une moindre mesure), on ne peut donc parler d'une localisation précise, tant à l'échelle nationale que régionale.

Ce n'est pas une étude rétrospective, en effet nous avions demandé le sérum d'animaux présentant des symptômes.

Ainsi, nous sommes en présence de sérums associés à un tableau clinique correspondant à celui de la maladie de Lyme, mais très polymorphe :17 symptômes recensés et chaque sérum est associé à un résultat d'IFI .

- L'immunofluorescence est, pour le cas de la maladie de Lyme, une méthode de criblage sérologique plus qu'une méthode de diagnostic. Or ici, nous nous en sommes servi comme tel. Pour contourner ce problème, nous avons procédé en 2 étapes : tout d'abord pour diminuer le nombre des faux-négatifs, on fixe un seuil de dilution des sérums bas pour le criblage (ici 1/100ème) ce qui augmente la sensibilité du test et permet de déceler l'ensemble des sérums positifs.

Mais pour éviter les faux-positifs on pratique alors à une deuxième série de tests d'IFI, par dilutions successives et croissantes des sérums (aux 1/100ème ,1/200ème, 1/400ème et 1/800ème).

Les études réalisées par immunofluorescence sur des sérums humains annoncent des valeurs de sensibilité élevées (de l'ordre de 90-95%), mais une spécificité variable (40 à 90%), ces variations étant dépendantes du seuil de positivité fixé et des règles de lecture propres au laboratoire.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Le laboratoire Biomérieux annonce une sensibilité de 93,8% (intervalle de confiance à 95% [89,8-96,3]) et une spécificité de 99,6% (intervalle de confiance à 95% [97,6-100]) pour son test Lyme spot IF, valeurs mesurées au cours d'une étude multicentrique portant sur 504 échantillons humains, testés sur 3 sites différents.

Les seuils communément utilisés sont entre 1/64 et 1/128 chez les bovins. Ils sont souvent plus élevés chez l'Homme et chez le chien, entre 1/128 et 1/256. [37]

Notre choix de dilution au 1/100ème est dicté par le criblage et permet une sensibilité importante, mais parallèlement les dilutions successives permettent d'augmenter la spécificité et d'écarter les faux-positifs.

Le seuil de positivité de l'IFI a finalement été fixé au 1/200ème ceci en accord avec différentes études récentes.

- La lecture des plaques a été effectuée en double aveugle ce qui permet de limiter les biais de lecture, qui sont fréquents lorsque la lecture dépasse 5 lames.

Les témoins sur chaque lame permettent également d'avoir un référentiel stable et de déceler les problèmes liés à la préparation des lames (mauvais rinçages, faible intensité de fluorescence…). Les codes permettant l'interprétation de la lecture (avec des croix) ont été fixés le premier jour et tiennent compte de 2 paramètres : d'une part, le nombre de *Borrelia* visibles dans l'ensemble du puits, celles-ci étant parfois réparties de manière non-uniforme ; d'autre part, l'intensité de la fluorescence observée, tout en prenant garde de ne pas être influencé par la fluorescence non-spécifique dans le reste du puits, qui forme un fond lumineux diminuant le contraste des *Borrelia*. La lecture en double aveugle permet l'accord sur la conjonction entre intensité de fluorescence et quantité de germes.

- L'antigène utilisé pour la réalisation des lames d'IFI est la bactérie entière *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (souche B31). Or en France, on peut trouver les trois agents étiologiques de la maladie de Lyme sévissant en Europe : on trouve essentiellement *Borrelia garinii* et dans une moindre mesure *Borrelia afzelii* et *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. [5] [50] [87] [103]

On peut donc s'interroger sur l'antigénicité croisée au sein du groupe *Borrelia burgdorferi sensu lato*, c'est-à-dire la spécificité de la réaction antigène-anticorps. Plusieurs études (Hauser *et al.* et Magnarelli et al. cités par [122]) portant sur des tests ELISA et des immunoblots faisant intervenir les différentes espèces de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, ou encore des antigènes soniqués, ont montré des résultats très proches quelquesoit l'antigène utilisé. La souche qui garantit la plus grande sensibilité en Europe serait *Borrelia afzelii* (souche PKo). Concernant l'immunofluorescence, aucune étude n'a montré l'influence de l'utilisation des différentes souches sur la sensibilité du test.

- Le western blot peut se réaliser en testant soit les IgM soit les IgG. Les kits sont différents et l'utilisation de l'ensemble des tests permet de dater le stade de la maladie de Lyme : les IgM apparaissants au stade précoce, à partir de 3 semaines puis disparaissants peu à peu, et les IgG apparaissants à partir de la 6ème semaine et caractérisants une atteinte disséminée voire avancée.

Or chez les bovins (contrairement à l'homme), les signes cutanés sont rarement observés et sans doute souvent imperceptibles. Les symptômes décelables sont souvent ceux du stade avancé. Par conséquent la venue du vétérinaire, et donc la possibilité de sérologie, se fait principalement lorsque les IgG sont les seules immunoglobulines détectables.

C'est pour cette raison que nous avons effectué le test uniquement en IgG.

Par ailleurs, la réaction immune chez les bovins est encore mal connue. De ce fait, on connaît les délai d'apparition des immunoglobulines chez l'homme avec précision, mais pas encore chez les bovins et on ne fait que calquer ces durées.
Il serait intéressant de déterminer les concentrations en IgM et IgG pour des bovins après plusieurs semaines ou plusieurs mois, sur des sujets subcliniques ou non.
Enfin, il serait intéressant de savoir combien de temps après l'infection les anticorps demeurent dans l'organisme des bovins, afin de savoir s'ils résultent d'une seule ou de multiple infections.

- Le kit utilisé était un kit humain, ainsi le conjugué fourni était un conjugué anti-anticorps humain. Nous avons donc dû changer le conjugué par un anti-anticorps bovin. Mais pour conserver le substrat fourni nous avons choisi un conjugué marqué par une phosphatase. Or dans la plupart des publication concernant les bovins (et les animaux en général), c'est un conjugué marqué par une peroxydase qui est utilisé. Sur 8 parutions citées ici ([21] [31] [36] [43] [48] [54] [69] [107]) 6 ont utilisées une peroxydase.

Nous avons fait le choix de ne changer que le conjugué, et non pas le couple substrat/conjugué, dans la mesure où le test avait été réglé (barrette, antigène, intensité…) pour cette enzyme. Mais ce conjugué a pu interférer avec les résultats (cf. partie suivante).

2. Sur les résultats :

- Les symptômes à la lumière de l'IFI :

Tout d'abord, il faut noter que l'effectif de sérums pour chaque symptôme est trop faible pour en tirer des conclusions.
On peut aussi regretter d'avoir autant de sérums aux symptômes inconnus car ils réduisent significativement l'effectif analysable.
Mais on peut tout de même remarquer :

- que sur 14 sérums avec monoarthrite 10 sont positifs soit 71,4% , avec deux sérums au 1/800ème ce qui est très élevé.
- que sur les 4 engorgements des membres postérieurs tous sont positifs
- que sur 4 myocardites 3 sont positifs

ceci indique qu'il existe sûrement des symptômes plus significatifs que d'autres.

Par ailleurs, lors d'hématurie et d'ictère les sérums sont négatifs au 1/100ème ce qui est intéressant car cela veut dire : soit qu'il n'y a jamais eu de contact avec des Borrelia (ni même avec aucun pathogène ayant des antigènes communs) soit que l'animal a une trop faible réponse immunitaire pour être détecter ou encore que le délai entre l'infection et l'apparition des symptômes a été trop court et qu'ainsi la réponse immunitaire n'a pas eu le temps d'apparaître.

Ceci peut nous laisser supposer que certains symptômes sont rattachés à la maladie de Lyme par analogie avec la symptomatologie humaine ou avec d'autres maladies (comme la leptospirose ou l'erlichiose) mais qu'ils sont peut-être sans fondement chez les bovins.

Le tableau VIII met en rapport les symptômes associés à la maladie de Lyme par les vétérinaires praticiens avec ceux classiquement décrits pour l'Homme ou le chien.

Tableau VIII : Comparaison du tableau clinique supposé des bovins avec celui de l'homme et du chien.

Symptômes « associés » à la maladie chez les bovins dans notre étude	**Présence de ce symptôme dans le tableau clinique du CHIEN**	**Présence de ce symptôme dans le tableau clinique de l'HOMME**
Problèmes respiratoires	+	+/-
Hématurie	+/-	0
Monoarthrite	++	++
Polyarthrite	++	++
Ictère	+/-	+/-
Amaigrissement	+/-	0
Retard de croissance	0	0
Hyperthermie	++	++
Engorgement des postérieurs	0	0
Poils piqués	+	0
Œdème mammaire	0	+
Myocardite	+/-	+ /-
Agalaxie	0	+/-
Avortement	+/-	+/-
Animal couché	+/-	0

Légende : ++ = symptôme classique du tableau clinique
+ = symptôme rapporté mais peu fréquent
+/- = symptôme anecdotique
0 = symptôme non rapporté

Ce tableau souligne qu'il n'y a pas forcément de rapport entre la symptomatologie de deux animaux pour la même maladie mais il indique aussi que nombre des symptômes rencontrés dans cette étude n'entre pas ou très rarement en compte dans les deux autres tableaux cliniques.
Il est à noter que ces deux tableaux cliniques sont beaucoup mieux documentés et qu'il existe un consensus sur les symptômes classiques, ce qui n'existe pas chez les bovins.

Pour avoir une réelle connaissance des signes cliniques, et de le répartition des souches, il faudrait mener une étude de culture ou de PCR en temps réel sur des animaux suspects cliniques.

- Les sérologies croisées :

En effet, il existe des faux-positifs lors de réactions croisées avec d'autres Spirochètes. Ceci peut arriver avec des Tréponèmes [31] [82]. C 'est le cas par exemple lors de dermatite digitée chez les bovins (maladie de Mortellaro) où les sérologies *Borrelia burgdorferi* réagissent positivement, alors que les bactéries impliquées sont des Tréponèmes. [12] [19] [26] [31] [78]
Les études moléculaires de CHOI *et al* cité par [78] ont montré que les spirochètes isolés des lésions de dermatite digitée étaient phylogéniquement proches de *T. denticola, T. vincentii* et *T. phagedenis* (bactéries impliquées dans les périodontites chez l'Homme). Ainsi, les

similarités antigéniques entre Tréponèmes et Borrélies (par exemple la protéine du flagelle p41) impliquent de fréquentes réactions croisées [31] [78]. Ces réactions croisées s'ajoutent à un critère clinique commun : la boiterie chronique. Il s'agit donc de bien faire attention à ne pas tirer de conclusions hâtives quant à une corrélation entre boiterie et sérologie *Borrelia burgdorferi* positive.

On décrit aussi des réactions croisées, mais mineures, avec *Leptospira spp.*, *Brucella spp.* et *Anaplasma marginale*. [19] [69] [37]

Enfin il existe de nombreuses *Borrelia*, et parmi celles n'appartenant pas au complexe *B.burgdorferi sensulato*, certaines sont pathogènes pour les bovins, comme par exemple *Borrelia theileri* et *Borrelia coriaceae*. Celle-ci peuvent donner une réaction positive en IFI lorsqu'on recherche *Borrelia burgdorferi*. Cependant ces deux spirochètes ne sont pas présents en France. [37] [54] [92]

Ainsi on peut aussi se demander si les *Borrelia* non pathogènes présentes dans l'environnement n'engendrent pas , elles aussi des réactions croisées.
Ainsi ceci expliquerait que des sérums négatifs en immunofluorescence ou faiblement positifs entraînent des bandes positives en western blot.
De même ceci expliquerait pourquoi un sérum considéré comme n'ayant eu aucun contact avec le pathogène puisse réagir.

- Le western blot : la bande p39 :

Le cas de cette bande est particulière, car, même en absence de sérum (témoin négatif) elle réagit très fortement.
L'hypothèse la plus probable est que l'antigène réagit avec le conjugué. En effet le conjugué est le seul réactif à ne pas être d'origine.
De plus ce sont des antigènes recombinants, on peut donc penser à une contamination durant le processus de fabrication ou encore dû au vecteur utilisé (ici le virus herpes bovin par exemple).
Ceci implique donc que cette bande n'est pas utilisable dans les résultats.
Pour contrer cela, nous aurions pu changer le couple conjugué/substrat, c'est-à-dire tester d'autres conjugués. Ceci n'a pas été fait faute de moyen et de temps, mais pourra être réalisé dans le futur.

- Les résultats globaux du western blot :

A l'issu de ces tests, nous ne pouvons faire aucune conclusion.
Effectivement, les bandes une fois la technique mise au point (soit dans notre système : sérum dilué au 1/50ème et conjugué dilué au 1/2000ème), semblent identiques que le sérum soit positif ou négatif.
De plus, il apparaît que même lors de témoin négatif (c'est-à-dire en absence de sérum), on peut deviner certaines bandes (différente de p39 déjà cité ci-dessus).
L'hypothèse d'une réaction entre le conjugué et les antigènes est probable.

Ainsi dans nos conditions expérimentales (précédemment décrites) ce test n'est pas utilisable chez les bovins.
Une étude américaine de 2004 [69] indique que le western blot peut servir de test diagnostic chez les bovins.

Dans leur étude, les auteurs démontre des réactivités distinctes à des protéines multiples. Même si les protéines ne sont pas identifiées précisément, ils considèrent que le western blot peut servir de test de confirmation de l'infection.
Bien sur, leur protocole diffère du nôtre en plusieurs points : tout d'abord il utilise un conjugué associé à une peroxydase (et non une phosphatase), mais les dilutions diffèrent aussi : les sérums sont dilués au 1/100ème et le conjugué au 1/1000ème (c'est-à-dire des sérums plus dilués que les nôtres et un conjugué moins dilué).

Cette étude indique donc que cette technique, au même titre que chez l'homme ou le chien, est utilisable chez les bovins. Cependant dans nos conditions expérimentales et avec le kit à destination humaine que nous avons employés, nous n'avons pu obtenir de résultats définitifs. L'emploi d'un kit différent (utilisant des antigènes différents ou les mêmes antigènes, préparés différemment) pourrait permettre de progresser dans ce domaine.

Conclusion

Au terme de ce travail, la complexité de la maladie de Lyme nous apparaît comme évidente. Tout d'abord par la multiplicité des espèces de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, mais aussi par le polymorphisme du tableau clinique, par la complexité de la pathogénie ou encore par les différentes méthodes de diagnostic.
De même, le traitement qui est facile dans les premiers stades, devient complexe dans les formes chroniques à cause des résistances aux antibiotiques.

On comprend alors l'intérêt porté aux outils diagnostiques, et à la démarche à suivre dans les suspicions de borréliose de Lyme. Le diagnostic de laboratoire a fait des progrès considérables, avec des outils de dépistage comme l'ELISA, ou de confirmation comme le Western Blot ou la PCR.
L'uniformisation des critères de diagnostic en matière d'immunoblot permettront de rendre comparables les différentes études menées par les laboratoires dans le monde entier.

Chez les bovins, les connaissances sont encore très limitées et les études, particulièrement en France, commencent juste à se mettre en place.
De plus, le tableau clinique est peu caractéristique et les infections subcliniques sont fréquentes.

Dans le travail présenté ici, la technique d'IFI a porté sur 85 sérums dont 54.25% (46/85) présentait un titre supérieur à 1/200ème considéré comme le seuil de positivité. Parmi les animaux définis ainsi comme séropositifs, 28,26% (13/46) 21,74% (10/46) et 8.69% (4/46) d'entre eux présentaient respectivement une hyperthermie, une monoarthrite et provenait d'un biotope à tique.
La commercialisation de kit de western blot humain nous a poussé à en tester un dans le but d'avoir un test pour la confirmation de l'infection chez les bovins.
Malheureusement dans nos conditions expérimentales ce kit ne marche pas, mais dans l'avenir d'autres études pourront se pencher de nouveau sur la mise en place du protocole.

L'intérêt porté à cette maladie chez les animaux ne fait que commencer, et les études à venir seront très importantes pour une meilleure compréhension.

Bibliographie

1. ALCALAY M., DEBIAIS F. : La maladie de Lyme, *Rev. Prat.*, 1995, **44,** 1611-1619

2. ANDRE –FONTAINE G., RUVOEN-CLOUET N., GANIERE JP. : La borréliose de Lyme, *Point Vét.*, 1995, **27**, 319-323

3. ANGUITA J., HEDRICK MN., FIKRIG E. : Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, **27**, 493-504

4. ABSTRINK E. : Cutaneous manifestations of Lyme borreliosis.Clinical definitions and differential diagnoses, *Scand. J. Dis. Suppl.*, 1991, **77**, 44-50

5. BALMELLI T., PIFFARELLI JC.: Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Res. Microbiol.*,1995, **146,** 329-340

6. BARANTON G., EDLINGER C., MAZONNELLI J., DUFRESNE Y. : La borréliose dite de Lyme, maladie « nouvelle » identifiée depuis près de 80 ans, *Méd. Mal. Infect.*, 1986, **16**, 747-755

7. BARANTON G., POSTIC D., SAINT-GIRONS I., BOERLIN P., PIFFARETTI JC, ASSOUS M., GRIMONT PAD: Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, Borrelia garinii sp nov., and group VS 461 associated with Lyme borreliosis, *Intern. J. Systematic Bacteriol.*,1992, **42,** 378-383

8. BARANTON G., SEINOST G., THEODORE G., POSTIC D., DYKHUIZEN D. : Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity, *Res. Microbiol.*, 2001, **152**, 149-156

9. BARIL C., RICHAUD C., BARANTON G., SAINT GIRONS I. :Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*, *Res. Microbiol.*, 1989, **140**, 507-516

10. BERGEY, CANALE-PAROLA E., KELLY RT : The spirochetes, *In : Bergey's manual of systematic bacteriology*, Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, 38-70

11. BIGAIGNON G., VAN BAMBEKE F., NINANE J.: La maladie de Lyme : pour une approche diagnostique et thérapeutique rationnelle, In : Séminaire de pathologie infectieuse de l'UCL,[en ligne], 1996 (28 nov.)
[http://www.md.ucl.ac.be/infect/lyme/lyme_texte.htm], (consulté en juin 2006)

12. BLOWEY RW., CARTER SD., WHITE AG., BARNES A.: *Borrelia burgdorferi* infections in UK cattle : a possible association with digital dermatitis, *Vet. Rec.*, 1994, **135**, 577-578

13. BOULOUIS HJ., MAILLARD R. : Maladie de Lyme chez le chien, *In : Rickettsioses-Zoonoses et autres Arbo-Bactérioses-Zoonoses*, Colloque européen francophone, Ploufragan, 2003, 7-8

RapportGratuit.com

14. BROWN UNIVERSITY, BI 160 Developpement of Vaccine to Infection Disease, Lyme Disease, [en ligne], (2005), [http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2005/lyme_disease/organism.htm], (consulté en juin 2006)

15. BURGESS EC., GENDRON-FITZPATRICK A., WRIGHT WO.: Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1987, **191,** 1468-1470

16. BURGESS EC., GILETTE D., PICKETT JP.: Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin poney, *J. Am. Vet. Med. Assoc.,*1986, **186,** 1340-1342

17. BURRASCANO jr JJ.: The new Lyme disease : diagnostic hints and treatment guidelines for tick-borne illnesses [en ligne], 1998, [http://www.lymenet.org/], (consulté en juin 2006)

18. CABANNES A., HERNANDEZ JC., LUCCHESE F., APPRIOU M., TRIBOULEY-DURET J. : Borréliose de Lyme dans le cheptel bovin et ovin du département de la Gironde, *Méd. Mal. Inf.*, 1997, **27,** 878-883

19. CARTER SD., BLOWEY RW., MURRAY RD., DEMIRKAN I.: Serological testing for borreliosis in cattle, *Vet. Rec.*, 1996, **138,** 600

20. CDC division of vector-borne diseases, CDC Lyme disease home page, [en ligne],(mis à jour le 29 sept. 2005) [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/index.htm],(consulté en juin 2006)

21. CHANG Y., NOVOSOL V., MCDONOUGH SP., CHANG CF., JACOBSON RH., DIVERS T., QUIMBY FW., SHIN S., LEIN DH.: Vaccination against lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses, *Vaccine*, 1999, **18**, 540-548

22. CHOW CC., EVANS jr AS., NOONAN-TOLY CM., WHITE D., JOHNSON GS., MARKS SJ., CALDWELL MC., HAYES EB : Lyme disease trends – Dutches county, New York, 1992-2000, *Mount Sinai J. Med*., 2003, **70**, 207-213

23. CHRISTIANN F., RAYET P., PATEY O., LAFAIX C. : Epidemiology of Lyme disease in France – Lyme borreliosis in the region of Berry sud- A six years retrospective, *Europ. J. Epidemiol*.,1996,**12**,479-483

24. CHRISTMANN D. : Réseau de surveillance de la maladie de Lyme en Alsace, *Bull Info IVS, 2002* (nov), n°4

25. COLEMAN JL., SELLATI TJ., TESTA JE., KEW RR., FURIE MB., BENACH JL. : *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayer, *Infect. Immun*., 1995, **63,** 2478-2484

26. CRANWELL MP., CUTLER SJ. : Lyme disease serology in cattle, *Vet. Rec.*, 1996, **138**, 551-552

27. DANIEL E., MCGINLEY-SMITH, SANDY S. TSAO : Dermatoses from ticks, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2003, **49**, 363-392

28. DECOSTER A. : Cours de bactériologie médicale, [en ligne], mise à jour en décembre 2004, [annedecoster.free.fr/spiro/spirochbo.htm], (consulté en juin 2006)

29. DEGEILH B. : La borréliose de Lyme chez l'homme, *In : Rickettsioses-Zoonoses et autres Arbo-Bactérioses-Zoonoses*, Colloque européen francophone, Ploufragan, 2003, 2-4

30. DE MIK EL., VAN PELT W., DOCTERS-VAN LEEUWEN B., VAN DERVEEN A., SCHELLEKENS JFP., BORGDOEFF MW.: The Geographical Distribution of Tick Bites and Erythema Migrans in General Practice in the Netherlands, *Int. J. Epidemiol.*, 1997, **26**, 451-457

31. DEMIRKAN I., WALKER RL., MURRAY RD., BLOWEY RW., CARTER SD. : Serological evidence of spirochetal infections associated with digital dermatitis in dairy cattle, *Vet. J.*, 1999, **157**, 69-77

32. DESHAYES F., SCHMITT M. : Résultats intermédiaires de la surveillance de la maladie de Lyme en Alsace, *Bull. Info. IVS*, 2002(juillet), n°3

33. DMV,13ème éd., Maisons-Alfort : Ed. point vét., 2005, 1776p.

34. DOBY JM., BETREMIEUX C., ROLLAND C., BARRAT J. : Les grands mammifères forestiers, réservoirs de germes pour *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme?, *Rec. Med. Vét.*, 1991, **167**, 55-61

35. DORWARD DW., FISCHER ER. : Lymphocyte invasion and host-cell membrane cloaking protects *Borrelia burgdorferi* from complement-mediated killing, *In : 97th general meeting of the american society for microbiology*, 1997(may 4-8), Miami beach FL, Washington DC, ASM Press, 1997, D-133

36. DRESSLER F., ACKERMANN R., STEERE A. : Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorfe*ri in european Lyme borreliosis, *J. Inf. Dis.,* 1994, **169,** 313-318

37. a. EUZEBY JP : *Borrelia burgdorferi* et la maladie de Lyme chez les animaux. Revue générale, *Rev. Méd. Vét.*, 1989, **140**, 371-388

37. b. EUZEBY JP. : Dictionnaire de Bactériologie Médicale, [en ligne], (mise à jour le 10 Mai 2006), [http://bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html], (consulté en juin 2006)

38. FIKRIG E., FENG W., AVERSA J., SCHOEN RT., FLAVELL RA. : Differential expression of *Borrelia burgdorferi* genes during erythema migrans and Lyme arthritis, *J. Inf. Dis.*, 1998, **178**, 1198-1201

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

39. FRASER CM. et al. : Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, *Nature*, 1997, **390**, 580-586

40. GARRITY GM., BELL JA., LIBURN TG.: Taxonomic outline of the procaryotic genera Bergey's manual® of systematic bacteriology, 2nd ed., release 5.0, [en ligne], 2004 (mai)
[http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310]

41. GILMORE RD.jr, MBOW ML., STEVENSON B. : Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector Ixodes scapularis, *Microb. Inf.*, 2001, **3**, 799-808

42. GOURREAU JM. : La maladie de Lyme *, In : Maladie des bovins, Institut de l'élevage,* 3ème ed., Paris : édition france agricole, 2000, 114-115

43. GUERRA MA., WALKER ED., KITRON U. : Quantitative Approach for the Serodiagnosis of Canine Lyme Disease by the Immunoblot Procedure, *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**(7), 2628-2632

44. HABICHT G., BECK G., BENACH J. : Lyme disease, *Sci. Am.*, 1987, **257**(1), 78-83

45. HARVEY WT., SALVATO P. : "Lyme disease":ancient engine of an unrecognize borreliosis pandemic?, *Med. Hypoth.*, 2003, **60**, 742-759

46. HENGGE UR., TANNAPFEL A., TYRING SK., ERBEL R., ARENDT G., RUZICKA T. : Lyme disease, *Lancet Infect. Dis.*, 2003, **3**, 489-500

47. HILTON E., TRAMONTANO A., DeVOTI J., SOOD SK. : Temporal study of immunoglobin M seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme borreliosis, *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 774-776

48. HOVIUS PWR., HOVIUS KE., OEI A., HOUWERS DJ. VANDAM AP. : Antibodies against Specific Proteins of an Immobilizing Activity against Three Strains of *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* Can Be Found in Symptomatic but Not in Infected Asymptomatic Dogs, *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38** (7), 2611-2621

49. HOVMARK A., ASBRINK E., SCHWAN O., HEDERSTEDT B., CHRISTENSSON D. : Antibodies to *Borrelia* spirochetes in sera from Swedish cattle and sheep, *Acta. Vet. Scand.*, 1986, **27**, 479-485

50. HUMAIR PF., GERN L. : The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe, *Microb. Inf.*, 2000, **2**, 915-922

51. HUNFELD KP., RUZIC-SABLJIC E., NORRIS DE., KRAICZY P., STRLE F. : Risk of culture-confirmed borrelial persistence in patients treated for erythema migrans and possible mechanisms of resistance, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, **296**, 233-241

52. JAULHAC B., MONTEIL H.:Actualités du diagnostic microbiologique des infections à *Borrelia burgdorferi, La lettre de l'infectiologue*, 1997,**3**, 87-93

53. JI B., COLLINS MT. : Seroepidemiologic survey of *Borrelia burgdorferi* exposure of dairy cattle in Wisconsin, *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55,** 1228-1231

54. JI B., THOMAS CB., COLLINS MT. : Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses the 41-kd flagellin as the antigen for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cattle, *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55** (9) 1213-1221

55. KARCH H., SCHWARZKOPF A., SCHMIDT H. : Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected samples), *J. Microbiol. Methods*, 1995, **23**, 55-73

56. KAUFMANN P., GOURREAU JM., JONCOUR G., BOULOUIS HJ. : Ehrlichiose, borréliose de Lyme et staphylococcie, *Bull. GTV*, 2003 (sept), **21**, 72

57. KEITA A. : *La borréliose de Lyme en France : enquête sérologique chez le chien. Comparaison de deux méthodes : ELISA et Western blot*, Thèse Med. Vét., Toulouse, 1994, n°030

58. KLEMPNER MS. *et al*. : Two controlled trials of antibiotic treatement in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease, *N. England J. Med.*, 2001, **345**, 85-92

59. KRAMPITZ HE., BARK S. : Epidemiology of *Ixodes*-Borreliosis in Southern Germany, *Immun. Inf.*, 1987, **15**, 141-145

60. KURTENBACH K., DE MICHELIS S., ETTI S., SCHAFER SM., SEWELL HS., BRADE V., KRAICZY P. : Host association of *Borrelia burgdorferi sensu lato*- the key role of host complement, *Trends Microbiol.*, 2002, **10**, 74-79

61. La maladie de Lyme : données du réseau de surveillance de la maladie en Alsace, [en ligne], mars 2001-fevrier 2003, [http://www.invs.sante.fr/publications/2005/lyme_alsace/rapport_lyme.pdf], (consulté en juin 2006)

62. LAM TT., NGUYEN TPK., MONTGOMERY RR., KANTOR FS., FIKRIG E., FLAVELL RA. : Outer surface eproteins E and F of Borrelia burgdorferi, the agent of Lyme disease, *Inf. Immun.*, 1994, **62**, 290-298

63. LAMOURAUX C. : *La borréliose de Lyme chez le cheval*, Thèse Méd. Vét.,Alfort, 2005, 107p.

64. Les Nymphéas, association française pour la maladie de Lyme, [en ligne] [http://www.lesnympheas.org/index.htm] (consulté en juin 2006)

65. LISCHER CJ., LEUTENEGGER CM., BRAUN U., LUTZ H. : Diagnosis of Lyme disease in two cows by the detection of *Borrelia burgdorferi* DNA, *Vet. Rec.*, 2000, **146**, 497-499

66. LISSMAN BA., BOSLER EM., CAMAY H., ORMISTON BG., BENACH JL. : Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1984, **185**, 219-220

67. Lyme disease association home page, [en ligne], (mise à jour juin 2006) [http://www.lymediseaseassociation.org/], (consulté en juin 2006)

68. Lyme disease network, [en ligne], (mise à jour mars 2006) [http://www.lymenet .org/], (consulté en novembre 2006)

69. MAGNARELLI LA., BUSHMICH SL., SHERMAN BA., FIKRIG E. : A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle, *Can. Vet. J.*, 2004, **45**, 667-674

70. MAILLARD R., BOULOUIS HJ. :Maladie de Lyme chez les bovins, *In : Rickettsioses-Zoonoses et autres Arbo-Bactérioses-Zoonoses*, Colloque européen francophone, Ploufragan, 2003, 5-6

71. MARASPIN V., LOTRIC-FURLAN S., STRLE F. : Developpement of *erythema migrans* in spite of treatment with antibiotics after after a tick bite, *Wien. Klin. Wochenschr.*, 2002, **114**, 616-619

72. Microbe!, American society for microbiology, SLEUTH S., [en ligne],1999, [http://www.microbe.org/microbes/bacterium1.asp], (consulté en juin 2006)

73. Microbiology and immunology on-line, University of south carolina, EWING EP. Jr, [en ligne], oct 2003 [http://www.med.sc.edu:85/fox/spiro-neisseria.htm], (consulté en juin 2006)

74. Microbiology, University of Texas southwestern medical center at Dallas, NORGARD MV., [en ligne], avril 2003, [www3.utsouthwestern.edu/…/faculty_art/Norgard_figs/N1.jpg], (consulté en juin 2006)

75. MONTEIL H., JAULHAC B., PIEMONT Y. : La maladie de Lyme et infections à *Borrelia burgdorferi* en Europe, *Ann. Biol. Clin.*, 1989, **47**, 428-437

76. Morbidity and mortality weekly report (MMWR),2002, **51,** 29-31, n°2 (18 janvier)

77. MOUGEOT I. : *La borréliose de Lyme*, Thèse Méd. Vét., Nantes, 2000, n°039, 67p.

78. MURRAY RD., DOWNHAM DY., DEMIRKAN I., CARTER SD.: Some relationships between spirochaete infections and digital dermatitis in four UK dairy herds, *Res. Vet. Sci.*, 2002, **73**, 223-230

79. National institute of allergy and infectious diseases, National institute of health, [en ligne], (mise à jour juin 2006), [http://www.niaid.nih.gov/], (consulté en juin 2006)

80. NORISS J., CARTER CJ., HOWELL JK., BARBOUR AG. :Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31 : characterization and molecular cloning of OspD, a surface exposed plasmid encoded lipoprotein, *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 4662-4669.

81. PAL U., FIKRIG E. : Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host, *Microb. Inf.*, 2003, **5**, 659-666

82. PARKER JL., WHITE KK. : Lyme borreliosis in cattle ans horses:a review of the litterature, *Cornell Vet.*, 1992, **82**, 253-274

83. PAROLA P., RAOULT D. : Ticks and Tickeborne Bacterial Diseases in Humans : An Emerging Infectious Threat, *Clin. Inf. Dis*., 2001, **32**, 897-928

84. PELTOMAA M.: Borrelioosi, [en ligne], (mise à jour mai 2006), [http://www.reumaliitto.fi/punkki/kuva5.html], (consulté en juin 2006)

85. PEROLAT P., PHILIPPON A. : Campus de microbiologie médicale, bactériologie-virologie- Hygiène hospitalière, [en ligne], (mise à jour 2005), [microbes-edu.org/etudiant/spirochete.html], (consulté en juin 2006)

86. PILLOT J., DAGUET G., PELOUX Y., DUPOUEY P., BERCHE P. : Spirochètes, *In : Bactériologie médicale*, 2ème éd., Paris : Flammarion Médecine-Science, 1989, 1021-1046

87. POSTIC D., BARANTON G. : Borrelia, *In : Précis de bactériologie clinique*, Paris : Ed. ESKA, 2000, 1521-1531

88. PURSER JE., NORRIS SJ. : Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi* , *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 2000 (5 Décembre), **97**, 13865-13870

89. RADOSTITS OM., GAY CC., BLOOD DC., HINCHCLIFF KW : Borreliosis (Lyme borreliosis, Lyme disease), In : Veterinary medecine – A textbook of the diseases of Cattle, sheep, pigs, goats and horses, 9th Ed., London : WB. SAUNDERS Compagny Ltd, 2000, 994-996

90. RAFFI E. : *Contribution à l'étude de la maladie de Lyme: Etude bibliographique et enquête sérologique chez les chiens en Midi Pyrénées*, Thèse de doctorat vétérinaire, ENVT, 1990, n°007, 120p.

91. RAGON B., HANSLIK T., LETRILLIART L. : Maladie de Lyme en France : 5500 nouveaux cas par an diagnostiqués en médecine générale, *Quot. Méd*., [en ligne], 2000, **6792** (jeudi 2 nov.), 8, [http://rhone.b3e.jussieu.fr/senti/archives/6792_02-11-2000.pdf], (consulté en juin 2006)

92. ROGERS AB., SMITH RD., KAKOMA I. : Serologic cross-reactivity of antibodies against Borrelia theileri, Borrelia burgdorferi, and Borrelia coriaceae in cattle, *Am. J. Vet. Res.*, June 1999, **60**, 694-697

93. ROTHWELL JT., CHRISTIE BM., WILLIAMS C., WALKER KH. : Suspected Lyme disease in a cow, *Aust. Vet. J.*, 1989, **66**, 296-298

94. SCHEIBLHOFER S., WEISS R., DURNBERGER H., MOSTOCK S., BREITENBACH M., LIVEY I., THALHAMER J. : A DNA vaccine encoding the outer surface proteinC from *Borrelia burgdorferi* is able to induce protective immune responses, *Microb. Inf.*, 2003, **5**, 939-946

95. SCHMIDTMANN ET., SCHLATER JL., MAUPIN GO., MERTINS JW. : Vegetational associations of host-seeking adult blacklegged ticks, *Ixodes scapularis* say (Acari:Ixodidae), on dairy farms in Northwestern Wisconsin, *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 718-721

96. SHIH CM., CHAO LL., YU CP. : Chemotactic migration of the Lyme disease spirochete (Borrelia burgdorferi) to salivary gland extracts of vector ticks, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002, **66**, 616-621

97. SIBILIA J., JAULHAC B., LIMBACH FX. : Les manifestations rhumatologiques de la borréliose de Lyme, *Rév. Méd. Int.*, 2002, **23**, 378-385

98. SIGAL LH. : Lyme Borreliosis : interactions of *Borrelia burgdorferi sensu lato* with human (and other mammalian) hosts, *Bull. Inst. Pasteur*, Paris, 1998, **96**, 189-206

99. SIMON M., SCHAIBLE UE., WALLICH R., KRAMER MD. : A mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection : approach to a vaccine against Lyme disease, *Immunol.Today*, 1991, **12**, 11-16

100. Site de l'institut Pasteur, la maladue de Lyme, [en ligne], (mise à jour Avril 2006) [http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/Lyme.html], (consulté en juin 2006)

101. Site de l'Institut Pasteur, serveur génétique moléculaire de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, [en ligne], (mise à jour mai 2001), [http :www.pasteur.fr/recherche/borrelia/Welcomefr.html], (consulté en juin 2006)

102. Site du groupe d'écoépidémiologie de l'Université de Neuchatel, [en ligne], PERRET JL., février 2003, [http://www.unine.ch/], (consulté en juin 2006)

103. SMITH M., GRAY J., GRANTROM M., REVIE C., GETTINBY G.: EUCALB, [en ligne], 1997 (mise à jour 2005), [http://vie.dis.strath.ac.uk/vie/lymeEU/], (consulté en juin 2006)

104. STEERE AC. : Forestry :Forest Health, Natural Ressources and Silvicultures Images, [en ligne], (mise à jourfévrier 2002), [http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=0001053], (consulté en juin 2006)

105. STEERE AC., GROSS D., MEYER AL., HUBER BT. : Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant lyme arthritis, *J. Autoimmun.*, 2001, **16**, 263-268

106. STEERE AC., COBURN J., GLICKSTEIN L. : The emergence of Lyme disease, *J. Clin. Inv.*, [en ligne], 2004, **113** (8), 1093-1101, [http://www.jci.org/cgi/reprint/113/8/1093], (consulté en juin 2006)

107. STEFANCIKOVA A., STEPANOVA G., DERDAKOVA M., PET'KO B., KYSEL'OVA J., CIGANEK J., STROJNY L., CISLAKOVA L., TRAVNICEK M. : Serological evidence for *Borrelia burgdorferi* infection associated with clinical signs in dairy cattle in Slovakia, *Vet. Res. Commun.*, 2002, **26**, 601-611

108. STEVENSON B. : *Borrelia burgdorferi* erp (OspE –related) gene sequences remain stable during mammalian infection, *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5307-5311

109. SUNG SY., McDOWELL JV., CARLYON JA., MARCONI RT. : Mutation and recombination in the upstream homology box-flanked OspE-related genes of the Lyme disease spirochetes result in the development of new antigenic variants during infection, *Infect. Immun*., 2000, **68**, 1319-1327

110. Syndicat national des ophtalmologistes de France, maladie de Lyme, [en ligne], fevrier 2000 ,
[http://www.snof.org/maladies/lyme.html], (consulté en juin 2006)

111. TAKAHASHI K., ISOGAI E., ISOGAI H., TAKAGI T., SASAKI K., FUJII N., KIMURA K. : Serological survey for *Borrelia burgdorferi* infection in cattle in southern Hokkaido, *J. Vet. Med. Sci.*, 1993, **55**, 921-924

112. The Lyme disease fundation home page, [en ligne], [http://www.lyme.org], (consulté en juin 2006)

113. THANASSI WT., SCHOEN RT. : The Lyme disease vaccine : conception, development and implementation, *Ann. Intern. Med*., 2000, **132**, 661-668

114. TRAP D. : Aspects cliniques et épidémiologiques de la maladie de Lyme chez les bovins, *Bull. Soc. Vét. Prat. (Fr)*, mai 1990, **74**, 283-296

115. TUOMI J., RANTAMAKI LK., TANSKANEN R. : Experimental infection of cattle with several *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains ; immunological heterogeneity of strains as revealed in serological tests, *Vet. Microbiol.*, 1998, **60**, 27-43

116. UILENBERG G., HINADY HK., PERIE NM., FEENSTRA T. : *Borrelia* infections of ruminants in Europe, *Vet. Quart*., 1988, **10**, 63-67

117. VANDENBROUCKE P. : La maladie de Lyme chez les bovins, enquête séro-épidémiologique dans l'Est de la France, Thèse Méd. Vét., Alfort, 2004, 200p.

118. WEBER K., BURGDORFERI W. : Aspects of Lyme borreliosis. Springer-verlag, Berlin, 1993

119. WELLS SJ., TRENT AM., ROBINSON RA., KNUTSON KS., BEY RF. : Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows, *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 398-405

120. WILSKE B., PREAC-MURSIC V., GOBEL UB., GRAF B., JAURIS S. et al. : An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis, *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 340-350

121. WILSKE B., PREAC-MURSIC V., JAURIS S., HOFMANN A., PRADEL I., SOUTSCHEK E et al. : Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*, *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 2182-2191

122. WILSKE B. et al.:MIQ Lyme borreliosis , [en ligne], décembre 2000 [http://bioinformatix.org/alpha1/nrz-borrelia/miq-lyme/frame-miq-lyme.html]

123. WORMSER GP., RAMANATHAN R., NOWAKOWSKI J., McKENNA D., HOLMGREN D., VISINTAINER P., DORNBUSH R., SINGH B., NADELMAN RB. : Duration of Antibiotic Therapy for Early Lyme Disease. A Randomized, Double-Blind, Placebo- Controlled Trial, *Ann. Int. Med.*,2003, **138**, 697-704

124. YU Z., CARTER JM., SIGAL LH., STEIN S. : Multi-well ELISA based on independent peptide antigens for antibody capture. Application to Lyme disease serodiagnosis, *J. Immunol. Methods*, 1996, **198**, 25-33

Annexes

Rapport-Gratuit.com

Annexe 1

Préparation du milieu B.S.K. II d'après Barbour.

Pour 1300ml de milieu :

Eau distillée autoclavée	500mL
Néopeptone B	5.0g
TC Yéastolate	2.0g
HEPES	6.0g
D(+) glucose	5.0g
Citrate de sodium	0.7g
Pyruvate de sodium	0.8g
N-acétyl (D) glucosamine	0.4g
Bicarbonate de sodium	2.2g

Mélanger la solution obtenue pendant quelques dizaines de minutes à température ambiante, puis ajouter stérilement :

CMLR 1066 medium sans glutamine (10x conc.)	100.0mL
Sérum albumine bovine fraction V à 100g/L	450.0mL

Après mélange du milieu, ajuster le pH à 7.5 avec une solution de soude à 2N puis filtrer sur membrane de porosité 0.22µm.

Dissoudre :

Gélatine	14g
Eau distillée	200.0mL
Sérum de lapin inactivé 30 min à 56°C	60.0mL

Dissoudre de la gélatine à 7% dans de l'eau bouillante puis la ramener à 50°C et l'ajouter au milieu.
On peut alors adjoindre des inhibiteurs pour les isolements à partir de prélèvements contaminés.
Filtrer sur membranes de porosité 1.20µm, 0.45µm et 0.22µm en maintenant le milieu à 45°C dans un bain-marie.
Répartir en tubes stériles.
Contrôle de la stérilité 48H à 37°C.

Conservation possible à 4°C si utilisation différée (péremption inférieure à 3mois).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Annexe 2

Activité des principales classes d'antibiotiques vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi*, d'après [14]

Classe pharmacologique	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
Bêta lactames		
• **pénicillines**		
o pénicilline G	0.5-0.8	12.5-25.6
o amoxicilline	0.25-1.0	0.8-3.2
• **céphalosporines**		
o 2ème génération (céfuroxime)		1.0-2.0
o 3ème génération		
▪ ceftriaxone	0.06-0.25	0.08-0.016
▪ cefotaxime	0.06-0.25	
o 4ème génération (céfipime)	1.0	
• **Pénèmes**		
o imipénem	0.06-1.0	
méropénem	0.25	
Macrolides et streptogramines	0.03-0.12	0.08-0.16
	0.015-0.12	
• érythromycine	0.015-0.12	0.03-0.25
• clerithromycine	0.015-013	0.02-0.04
• roxithromycine	1.0	
• azithromycine		
• Synercid (quinupristine x dalfopristine)		
Tétracyclines	0.12-1.0	0.8-3.2
	0.12-0.25	1.35-5.43
• tétracycline	0.25-0.2	1.6-6.4
• minocycline		
• doxycycline		
Phénicolés (chloramphénicol)	1.0-3.0	
Fluoroquinolones	1.0-8.0	
Nouveaux dérivés (expérimentaux)	0.06-0.5	
• Everninomycine		
Les aminoglycosides (gentamicine,..) les ansamycines (rifampicine, ...) et les sulfamides (même combinés aux inhibiteurs de la THF-réductase [cotrimoxazole, ...] sont INACTIFS		

Annexe 3

Sites d'action préférentiels des antibiotiques utilisés d'après [14].

Antibiotiques	Site d'action		
	Peau et tissus mous	Articulations	Système nerveux central
β-lactames			
Pénicilline G		+/-	+/-à+++
Pénicilline V	+à+++	+/-	
Amoxicilline	++à+++		
Cefuroxime	+à+++		
Ceftriaxone	+++	+++	+++
Cefotaxime		+++	++
Macrolides			
Erythromycine	+/-		
Azithromycine	++		
Tétracyclines			
Tétracycline	++		
Doxycycline	+à+++	+	+++

Annexe 4

Légende : = : même intensité que la bande témoin (considérée comme bande positive)
- : intensité plus faible
-- : intensité très faible
++ : intensité très supérieure

pointillés : on devine une bande

Borrelia EcoLine Protokollblatt / recordsheet

BV+ = 05-18
BV- = 05-64-1

Bearbeiter/processor: _____ Datum/date: _____

CE

Serum-Nr./no.:	IgM (markline, serum control, conjugate control (IgG, IgA, IgM); Cut off Bande/ band: OspC, VlsE, p39, EBV)	IgM-Interpretation (-/?/+)	IgG (markline, serum control, conjugate control (IgG, IgA, IgM); Cut off Bande/ band: VlsE, p39, p83, iv1 (BBA36), iv2 (BBO323), iv3 (Crasp3), iv4 (pG); in vivo (iv1-4) Antigene/antigen)	IgG-Interpretation (-/?/+)	Interpretation (IgM+IgG) -	?	+	Bemerkungen/ remarks
1		30	T+					
2		29	T-					
3		28	BV+ 1000					
4		27	BV-					
5		26	T-					
6		25	BV+ 2500					
7		24	BV-					
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								

LOT

Cut off Kontrolle/control: _____ Verd.- Waschpuffer/dil.-washbuffer: _____ Konjugat/conjugate: _____ Substrat/e: _____

© by Genzyme Virotech GmbH Version Lyme 040818-03

Genzyme Virotech GmbH, Löwenplatz 5, 65428 Rüsselsheim, Tel. 06142-69090, Fax 06142-966613

Rapport-Gratuit.com

Annexe 4.a

Borrelia EcoLine Protokollblatt / recordsheet

BV+ = 05-18
BV- = 05-64-1

Bearbeiter/processor: _____ Datum/date: _____

CE

Serum-Nr./no.:	IgM (markline, serum control, conjugate control (IgG, IgA, IgM); Cut off Bande/ band: OspC, VlsE, p39, EBV)	IgM-Interpretation (-/?/+)	IgG (markline, serum control, conjugate control (IgG, IgA, IgM); Cut off Bande/ band: VlsE, p39, p83, iV1 (BBA36), iV2 (BBO323), iV3 (Crasp3), iV4 (IpG); in vivo (iv1-4) Antigene/antigen)	IgG-Interpretation (-/?/+)	Interpretation (IgM+IgG) -	?	+	Bemerkungen/ remarks
	G1 Lyme M-280-020		G1 Lyme G-560-010					
	X X X X		X X X X X X X					
1		23	T+					
2		22	BV+ 50 ā 250					
3		21	BV+ 50 ā 500					
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								

LOT

Cut off Kontrolle/control: _____ Verd.- Waschpuffer/dil.-washbuffer: _____ Konjugat/conjugate: _____ Substrat/e: _____

genzyme VIROTECH

= même intensité
– intensité plus faible
intensité très faible
++ intensité très superieure

© by Genzyme Virotech GmbH Version Lyme 040818-03

Genzyme Virotech GmbH, Löwenplatz 5, 65428 Rüsselsheim, Tel. 06142-69090, Fax 06142-966613

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Annexe 4.b

Borrelia EcoLine Protokollblatt / recordsheet

BV+ = 04-117
BV- = 05-64-1

Bearbeiter/processor: _____ Datum/date: _____

CE

Serum-Nr./no.:	IgM	markline / serum control / conjugate control (IgG, IgA, IgM)	Cut off Bande/ band: OspC	VlsE	p39	EBV	IgM-Interpretation (-/?/+)	IgG	markline / serum control / conjugate control (IgG, IgA, IgM)	Cut off Bande/ band: VlsE	p39	p83	in vivo (iv1-4) Antigene/antigen: iv1 (BBA36)	iv2 (BBO323)	iv3 (Crasp3)	iv4 (pG)	IgG-Interpretation (-/?/+)	Interpretation (IgM+IgG): -	?	+	Bemerkungen/ remarks
			X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X					
1							20	BV+ 1/100	ā 1/500	- X	++ X	- X	-- X	- X	X	-- X					
2							19	BV+ 1/100	ā 1/1000	-- X	++ X	-- X		X		X					
3							18	BV- 1/100	ā 1/500	- X	++ X	- X	-- X	-- X		-- X					
4							17	BV- 1/100	ā 1/1000	- X	++ X		X	X							
5							16	T ⊖	ā 1/1000	-- X	++ X	-- X		X							
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					

Annexe 4.c

LOT

Cut off Kontrolle/control: _____ Verd.- Waschpuffer/dil.-washbuffer: _____ Konjugat/conjugate: _____ Substrat/e: _____

© by Genzyme Virotech GmbH Version Lyme 040818-03

Genzyme Virotech GmbH, Löwenplatz 5, 65428 Rüsselsheim, Tel. 06142-69090, Fax 06142-966613

X = on "devine" la bande

Borrelia EcoLine Protokollblatt / recordsheet

BV+ = 05-18
BV- = 05-64-1

Bearbeiter/processor: _____ Datum/date: + tampon BSA

CE

Serum-Nr./no.:	IgM markline	IgM serum control	IgM conjugate control (IgG IgA IgM)	IgM Cut off Bande/ band: OspC	VlsE	p39	EBV	IgM-Interpretation (-/?/+)	IgG markline	IgG serum control	IgG conjugate control (IgG IgA IgM)	IgG Cut off Bande/ band: VlsE	p39	p83	iv1 (BBA36)	iv2 (BBO323)	iv3 (Crasp3)	iv4 (pG)	IgG-Interpretation (-/?/+)	Interpretation (IgM+IgG) -	?	+	Bemerkungen/ remarks
				X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	X					
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							
12																							
13																							
14																							
15																							
								15	BV+ 50ème		+ à 1000ème	X	++ X	= X		= X	-- X						
								14	BV- 50ème		+ à 1000ème		++ X	-- X	-- X	-- X							
								13	T		+ à 1000ème		++ X	X		X							

LOT

Cut off Kontrolle/control: _____ Verd.- Waschpuffer/dil.-washbuffer: _____ Konjugat/conjugate: _____ Substrat/e: _____

genzyme VIROTECH

© by Genzyme Virotech GmbH Version Lyme 040818-03

Genzyme Virotech GmbH, Löwenplatz 5, 65428 Rüsselsheim, Tel. 06142-69090, Fax 06142-966613

Annexe 4.d

Borrelia EcoLine Protokollblatt / recordsheet

BV+ = 05-18
BV- = Bissy 653

Bearbeiter/processor: _____ Datum/date: _____

CE

Serum-Nr./no.:	IgM (markline, serum control, IgG, IgA, IgM, control; Cut off Bande/ band: OspC, VlsE, p39, EBV)	IgM-Interpretation (-/?/+)	IgG (markline, serum control, IgG, IgA, IgM, control; Cut off Bande/ band: VlsE, p39, p83, iv1 (BBA36), iv2 (BBC323), iv3 (Crasp3), iv4 (DbpG); in vivo (iv1-4) Antigene/antigen)	IgG-Interpretation (-/?/+)	Interpretation (IgM+IgG) -	?	+	Bemerkungen/ remarks
1		12	BV+ 1/50 ā 1/2000					
2		11	BV- 1/50 ā 1/2000					
3		10	T- ā 1/2000					
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								

LOT

Cut off Kontrolle/control: _____ Verd.- Waschpuffer/dil.-washbuffer: _____ Konjugat/conjugate: _____ Substrat/e: _____

genzyme VIROTECH

© by Genzyme Virotech GmbH Version Lyme 040818-03

Genzyme Virotech GmbH, Löwenplatz 5, 65428 Rüsselsheim, Tel. 06142-69090, Fax 06142-966613

Annexe 4.e

Borrelia EcoLine Protokollblatt / recordsheet

Serums 1/50

Bearbeiter/processor: _____ Datum/date: à 1/2000

CE

BSA 5% = dilution sérique.

Serum-Nr./no.:	IgM (markline, serum control, conjugate control, IgG, IgA, IgM; Cut off Bande/ band: OspC, VlsE, p39, EBV)	IgM-Interpretation (-/?/+)	IgG (markline, serum control, conjugate control, IgG, IgA, IgM; Cut off Bande/ band: VlsE, p39, p83, iv1 (BBA36), iv2 (BBO323), iv3 (Crasp3), iv4 (pG) — in vivo (iv1-4) Antigene/antigen)	IgG-Interpretation (-/?/+)	Interpretation (IgM+IgG): -	?	+	Bemerkungen/ remarks
	S1 Lyme M-250-020		S1 Lyme G-340-010					
	X X X X		X X X X X X X					
1		9	BV+ 04-134					
2		8	BV+ 04-129					
3		7	BV+ 04-91					
4		6	BV+ 04-93					
5								
6		5	BV- 06-31-1					
7		4	BV- 06-31.5					
8		3	BV- 06-31.6					
9		2	BV- 05.77					
10								
11								
12								
13								
14								
15								

Annexe 4.f

LOT

Cut off Kontrolle/control: _____ Verd.- Waschpuffer/dil.-washbuffer: _____ Konjugat/conjugate: _____ Substrat/e: _____

genzyme VIROTECH

© by Genzyme Virotech GmbH Version Lyme 040818-03

Genzyme Virotech GmbH, Löwenplatz 5, 65428 Rüsselsheim, Tel. 06142-69090, Fax 06142-966613

Rapport-Gratuit.com

Annexe 5

N° animal	description	inconnu	monoarthrite	polyarthrite	biotope tique	amaigrissement	hyperthermie	engorgement postérieurs	poils piqués	myocardite	agalaxie	avortement	cas humain	problème respiratoire	animal couché	oedème mammaire	ictère	retard de croissance	hématurie	postif	negatif
7086/A03-139		1																		1/200	
2/A04-74	vache	1																		1/200	
1509/A04-86	vache	1																		1/200	
2080/A04-92					1															1/200	
2872/A04-96	taureau 2ans	1																		1/200	
2914/A04-103	genisse charolaise						1		1											1/200	
3325/A04-104					1		1		1				1							1/200	
/A04-116		1																		1/200	
7387/A04-118		1																		1/200	
4631/A04-120		1																		1/200	
2775/A04-125		1																		1/200	
6636/A04-126							1							1						1/200	
1348/A05-1	VL pie rouge			1			1													1/200	
5357/A05-15		1																		1/200	
9610/A05-18	VL		1				1													1/200	
9635/A05-18	VL		1				1													1/200	
9696/A05-18	VL		1				1													1/200	
9617/A05-18	VL		1				1													1/200	
/A05-42	TAUREAU			1	1															1/200	
6348/A05-44	genisse 18mois																	1		1/200	
5177/A05-46							1													1/200	
1120/A05-48							1													1/200	
1123/A05-48							1													1/200	
5184/A05-48								1		1										1/200	
5390/A05-48										1										1/200	
6910/A05-54		1																		1/200	
/A05-57		1																		1/200	
/A05-57		1																		1/200	
4412/A03-134	genisse		1			1				1										1/400	
2511/A04-91	taureau 2ans							1												1/400	
2402/A04-92					1															1/400	
7366/A04-101		1																		1/400	
5554/A04-102		1																		1/400	
6517/A04-119		1																		1/400	
6206/A04-121		1																		1/400	
4808/A04-134	VL primipare		1			1			1											1/400	
8056/A04-141		1																		1/400	
5186/A05-48																				1/400	
/A05-57		1																		1/400	
7447/A03-110	VL	1																		1/400 (1/400)	
7307/A03-111	genisse vêlée 3,5ans		1			1					1									1/400 (1/200)	
4813/A04-93	genisse de 6mois		1				1													1/400 (1/200)	
0397/A04-117		1																		1/800	
/A04-129		1																		1/800	
5993/A04-152	VL		1			1														1/800	
9696/A05-18	VL		1				1													1/800	
2723/A04-123		1																			1/100
2765/A04-123		1																			1/100
/A04-35	genisse FIPN		1		1				1												1/100
2213/A04-60	taureau	1																			1/100
5950/A04-82		1																			1/100
1698/A04-85		1																			1/100
5365/A04-105	genisse	1																			1/100
/A04-125						1	1														1/100
2027/A04-124							1							1							1/100
/A04-122															1						1/100
3062/A04-127	vache											1									1/100
6395/A04-128	primipare			1																	1/100
6398/A04-128	primipare			1		1	1														1/100
3473/A04-132			1				1							1							1/100
6935/A04-140												1									1/100
5481/A05-13		1																			1/100
/A05-21		1																			1/100
minnie/A05-43	vache						1					1									1/100
0883/A05-43	vache						1					1									1/100
0819/A05-43	vache						1					1									1/100
1211/A05-43	vache						1					1									1/100
1134/A05-48	vache						1					1									1/100
5523/A05-48							1														1/100
5322/A05-48							1														1/100
5397/A05-48							1														1/100
1079/A05-48										1											1/100
3386/A05-58	VL 2eme velage			1		1															1/100
7386/A05-13	vache			1			1														1/100 (1/100)
2077/A04-92					1																N
7908/A04-92					1																N
2427/A04-92					1																N
2071/A04-92					1																N
5307/A03-140	normande 2ans		1		1	1															N
4509/A04-63	VL		1																		N
2753/A04-77		1																			N
/A04-139																			1		N
1460/A05-23	vache						1										1	1	1		N
7448/A05-34		1																			N
/A05-57		1																			N
85		32	14	6	10	8	27	4	2	4	1	7	1	3	1	1	1	1	2	46	39

adpvt.free.fr

MALADIE DE LYME CHEZ LES BOVINS:

CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

NOM et Prénom : MASSÉ-MOREL Gaëlle

Résumé :

L'agent étiologique de la maladie de Lyme est une bactérie nommée *Borrelia burgdorferi sensu lato.* Cette bactérie est transmise par les tiques du genre *Ixodes* et possède des mécanismes d'adaptation à la transmission vectorielle et au système immunitaire très variés.

La maladie de Lyme est une zoonose d'importance mondiale.

Les principaux symptômes chez l'homme sont dermatologiques, articulaires, neurologiques ou cardiaques. Lorsque la maladie évolue de manière chronique, elle devient alors particulièrement invalidante.

Chez les bovins, la maladie de Lyme est le plus souvent subclinique, mais lorsqu'elle se manifeste cliniquement, c'est principalement par des signes généraux et des arthrites.

Le diagnostic, assez délicat, doit se fonder sur l'anamnèse, la clinique et des examens de laboratoire, tels que l'ELISA, le western blot et la PCR.

Le traitement antibiotique est assez long et la prophylaxie passe essentiellement par l'information et la lutte contre les tiques.

Cette étude avait pour principal but de tester une technique de western blot (à l'aide d'un kit commercialisé) comme test de diagnostic chez les bovins. Elle a porté sur 85 sérums de bovins suspects de maladie de Lyme. Un test de criblage reposant sur l'IFI a été réalisé. 54,25% % d'animaux se sont révélés positif avec ce test.

La mise au point d'un test de confirmation fondé sur la technique du Western blot n'a pu être menée à bien pour des raison techniques.

Mots clés :

- Maladie de Lyme
- *Borrelia burgdorferi*
- Arthrite
- Tique
- Diagnostic
- Immunofluorescence
- Immunoblot
- Bovin

Jury :

Président : M. …….., Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil
Directeur : M. Henri-Jean BOULOUIS, Professeur à l'ENVA
Assesseur : M. Renaud MAILLARD, Maître de conférences à l'ENVA

Adresse de l'auteur :

Gaëlle MASSÉ-MOREL
43 rue de la paix
94600 CHOISY LE ROI

LYME DISEASE IN COWS:

CONTRIBUTION TO SEROLOGICAL DIAGNOSTIC

SURNAME : MASSÉ-MOREL
Given name : Gaëlle

Summary :
The etiologic agent of Lyme disease is a bacterium named *Borrelia burgdorferi sensu lato*. This bacterium is transmitted by *Ixodes* ticks. Numerous adaptations to vector borne transmission and to immune system have been discovered.

Lyme disease is a worldwide zoonose.
The Lyme disease in humans is mainly characterised by cutaneous, articular, neurological or cardiac symptoms. Chronic evolution can occur and be very damaging.
In cattle, infection is mainly subclinical, but general signs or arthritis are possible outcomes.

Diagnosis is quite tricky, based on clinical history, physical findings and laboratory evidence like ELISA, western blot or PCR.

Antibiotic treatment is generally for long-term. Prevention is based on public information and avoidance of ticks.

The principal aim of this study was to test a western blot kit as a diagnostic test for cattle. We had to study about 85 sera of cows which were suspected of Lyme disease. A screening test, based on immunofluorescence assay, revealed 54.25% of seropositive cows.
We can't adjust a confirmation test based on western blot assay because of technical reasons.

Keywords :

- Lyme disease
- *Borrelia burgdorferi*
- Arthritis
- Tick
- Diagnostic
- Immunofluorescence assay
- Immunoblot
- Cattle

Jury :

President : Mr. …….., Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil
Director : Mr. Henri-Jean BOULOUIS, Professeur à l'ENVA
Assessor : Mr. Renaud MAILLARD, Maître de conférence à l'ENVA

Author's address:

Gaëlle MASSÉ-MOREL
43 rue de la paix
94600 CHOISY LE ROI